ДОПОВІДІ
НАЦІОНАЛЬНОЇ
АКАДЕМІЇ НАУК
УКРАЇНИ

11 • 2012

МЕДИЦИНА

УДК 616.441-006.5:611.441.018.72:612.015.1

© 2012

О. В. Калініченко, Т. М. Мишуніна,
член-кореспондент НАН України **М. Д. Тронько, Л. Ю. Зурнаджи**

Активність цистеїнових катепсинів у тканині щитоподібної залози хворих з еутиреоїдним вузловим зобом

Зниження активності катепсину H та її частки в цитозолі зі зобнозміненої тканини щитоподібної залози хворих з мікрофолікулярним еутиреоїдним зобом може свідчити про гальмування лізосомального шляху програмованої загибелі клітин. Навпаки, на активацію її вказують дані про підвищену активність катепсинів H і L та їх відсотка у цитозолі зі зобнозміненої тканини з ознаками оксифільноклітинних змін.

Серед протеолітичних ферментів, які відіграють центральну роль у ремоделюванні білкового складу клітини, особливий інтерес викликають цистеїнові катепсини, які належать до родини папаїноподібних ферментів (група CA, родина C1) з локалізацією переважно в лізосомальних компартментах [1]. Завдяки участі в загальному та селективному протеолізі ці ферменти залучені в реалізацію таких життєво важливих процесів, як репарація та/чи реконструкція внутрішньоклітинних структур, презентація антигенів і взаємодія антиген–антитіло, прогресія клітинного циклу, диференціювання і старіння клітин, зміна проникності мембран і деградація позаклітинного матриксу, ангіогенез, процесинг пептидних медіаторів, гормонів, їх секреція, гормональні ефекти, апоптоз, взаємодія статевих клітин і, навіть, формування інтелекту. Конкретне значення вказаних ферментів у розвитку патологічних процесів до кінця не з'ясоване, але відомо, що порушення балансу катепсини–інгібітори катепсинів є одним із центральних чинників у виникненні тканинних пошкоджень в органах та системах організму і, отже, у розвитку та перебігу багатьох захворювань: вірусних, автоімунних, алергічних, нейродегенеративних, кардіоваскулярних, онкологічних тощо [2].

Участь цистеїнових катепсинів у механізмах формування тиреоїдної патології (автоімунні захворювання, вузлоутворення, злоякісна трансформація клітин, прогресія пухлинного росту) багато в чому залишається нез'ясованою. Основну увага при цьому зосереджено на вивченні активності чи експресії катепсинів у тканині злоякісних пухлин щитоподібної залози [3, 4], з огляду на роль цих ферментів у процесах інвазії і метастазування [5]. Мало що

відомо про можливі зміни активності цих ферментів у тканині залози при вузлоутворенні. Так, було показано, що в зобнозміненій тканині щитоподібної залози активність катепсину В чи експресія мРНК ферменту незмінена відносно позавузлової [6], проте загальна активність катепсинів знижена в тканині залози хворих з мікро-макрофолікулярним вузловим колоїдним зобом [7]. За іншими даними, у різних зразках тканини багатовузлового еутиреоїдного зоба активність катепсину В змінювалася від 10-разового зменшення до 6-разового підвищення порівняно з активністю ферменту в незміненій тканині залози [3].

Наша мета полягала в дослідженні активності трьох лізосомальних цистеїнових катепсинів (H, B, L) у лізосомах і цитозолі з позавузлової незміненої тканини нормофолікулярної будови та зобнозміненої тканини залози хворих з еутиреоїдним вузловим зобом.

На проведення досліджень був отриманий дозвіл від Комітету з біоетики ДУ "Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка НАМН України". Досліджено 20 зразків вузлової та 8 зразків позавузлової тканини щитоподібної залози, що були отримані після оперативного втручання у хворих з приводу еутиреоїдного вузлового зобу.

Тканину щитоподібної залози промивали охолодженим фізіологічним розчином, зважували та гомогенізували в 10-кратному об'ємі середовища такого складу: цукроза — 250 ммоль/л, трис-HCl-буфер — 20 ммоль/л, натрієва сіль етилендіамінтетраоцтової кислоти — 1 ммоль/л (при pH 7,4). Для виділення лізосомальної та цитозольної фракцій гомогенат центрифугували протягом 7 хв при 2,5 тис. об./хв, а отриманий надосад — при 12 тис. об./хв протягом 15 хв. Осад, який містить лізосоми, суспендували в середовищі виділення (без натрієвої солі етилендіамінтетраоцтової кислоти, при pH 7,0), а надосад використовували як цитозольну фракцію.

Активність катепсинів визначали по відношенню до синтетичних субстратів: L-лейцин-4-нітроаніліду (катепсин H), N_2-бензоіл-DL-аргінін-4-нітроаніліду (катепсин B) і азоказеїну (катепсин L), 6% розчин якого попередньо був денатурований 6-молярним розчином сечовини. Інкубаційне середовище містило калій-натрій фосфатний буфер (0,1 моль/л — катепсин H (pH 6,8), 0,1 моль/л — катепсин B (pH 6,0) чи 0,066 моль/л — катепсин L (pH 5,0)), 2 ммоль/л 2-меркаптоетанолу, 0,2% тритону X-100 і натрієву сіль етилендіамінтетраоцтової кислоти (4 ммоль/л — катепсин H, 1,33 ммоль/л — катепсин B) [8]. Реакцію зупиняли 10% розчином трихлороцтової кислоти. Активність катепсинів H і B виражали у мкмолях паранітроаніліну, який відщепився від субстрату за 1 год інкубації, на 1 мг білка, а активність катепсину L — в одиницях абсорбції низькомолекулярних пептидів, що утворилися за 1 год інкубації і не осаджуються трихлороцтовою кислотою, на 1 мг білка. Загальну активність ферментів розраховували на 1 мг тканини. Вміст білка в суспензії лізосом та цитозолі визначали за однією з модифікацій загальноприйнятого методу Лоурі.

Одержані дані наведено в табл. 1 у вигляді $M \pm m$ та опрацьовано статистично з використанням критерію t Стьюдента і непараметричного критерію U Вілкоксона–Манна–Уїтні. Критичний рівень значущості приймали за 0,05.

Загальна активність цистеїнових катепсинів H, B і L (не показано) і активність ферментів у лізосомальній фракції, що була отримана зі зобнозміненої тканини щитоподібної залози хворих з еутиреоїдним вузловим зобом, не відрізнялися від такої в незміненій позавузловій тканині щитоподібної залози нормофолікулярної будови (табл. 1). У той же час у цитозолі з клітин зобнозміненої тканини щитоподібної залози відмічена дещо менша активність катепсинів H і B, проте статистично значущі зміни підтверджені лише для активності катепсину H у цитозольній фракції з тканини мікрофолікулярного, а для катепсину B — з тканини макрофолікулярного зоба. За наявності в зобнозміненій тканині оксифільноклі-

тинних змін активність катепсинів H і L у цитозольній фракції з такої тканини істотно вища (див. табл. 1). Розрахунки відсотка активності катепсинів у цитозолі відносно загальної активності ферментів показали збільшення його порівняно з таким у позавузловій незміненій тканині щитоподібної залози для катепсинів H і L у разі наявності оксифільноклітинних змін у вузловій тканині, а також зменшення — для катепсину H у разі мікрофолікулярної будови зобнозміненої тканини.

Таким чином, результати дослідження загальної активності та активності цистеїнових катепсинів у лізосомах зі зобнозміненої тканини щитоподібної залози збігаються з тими, де відмічена відсутність у такій тканині істотних зрушень у вмісті мРНК і активності катепсину B [6].

Відомо, що катепсини є медіаторами лізосомального шляху клітинної загибелі. Різні сигнали апоптозу, такі як активація специфічних рецепторів смерті чи p53, оксидативний стрес чи ішемія можуть індукувати часткову проникність лізосомальної мембрани і вихід цих ферментів у цитозоль. Залежно від ступеня проникності лізосомальної мембрани, кількості і "набору" активних катепсинів, які вивільнюються в цитоплазму, активності їх внутрішньоклітинних інгібіторів, запускається той чи інший морфологічний тип клітинної загибелі. Активація "класичного" шляху апоптозу відбувається шляхом розщеплення катепсинами білка Bid, зміни конформації білка Bax та підвищення інтенсивності транслокації цих білків до мітохондрій, за умови прямої активації під дією катепсинів каспаз чи протеолізу їх інгібіторів. Крім того, катепсини безпосередньо беруть участь у деградації структурних білків клітини під час реалізації апоптозної програми [9].

Дані літератури щодо апоптозу клітин зобнозміненої тканини щитоподібної залози нечисленні і свідчать про невеликий відсоток клітин, які експресують рецептори смерті. До

Таблиця 1. Активність катепсинів H, B (мкмоль паранітроаніліну/(год·мг білка)) і L (од. абсорбції/(год·мг білка)) у лізосомах і цитозолі незміненої позавузлової тканини та зобнозміненої тканини щитоподібної залози хворих з еутиреоїдним вузловим зобом

Позапухлинна тканина	n	Лізосоми	Цитозоль	Відсоток активності у цитозолі
		Катепсин H		
Позавузлова незмінена	8	$34{,}6 \pm 2{,}3$	$12{,}33 \pm 1{,}56$	$65{,}8 \pm 4{,}2$
Зобнозмінена, у т. ч.	20	$32{,}5 \pm 10{,}5$	$9{,}07 \pm 2{,}14$	$60{,}0 \pm 5{,}4$
макрофолікулярної будови	13	$33{,}3 \pm 14{,}9$	$7{,}52 \pm 2{,}10$	$61{,}3 \pm 5{,}9$
мікрофолікулярної будови	4	$28{,}9 \pm 3{,}3$	$6{,}05 \pm 2{,}16^*$	$44{,}1 \pm 4{,}5^*$
з оксифільноклітинними змінами	3	$34{,}0 \pm 14{,}5$	$25{,}88 \pm 5{,}41^*$	$83{,}0 \pm 6{,}2^*$
		Катепсин B		
Позавузлова незмінена	8	$30{,}1 \pm 5{,}4$	$33{,}2 \pm 6{,}5$	$83{,}5 \pm 4{,}2$
Зобнозмінена, у т. ч.	20	$32{,}2 \pm 8{,}0$	$20{,}8 \pm 2{,}9$	$80{,}3 \pm 3{,}0$
макрофолікулярної будови	13	$34{,}9 \pm 11{,}1$	$19{,}2 \pm 4{,}1^*$	$78{,}3 \pm 4{,}0$
мікрофолікулярної будови	4	$20{,}1 \pm 3{,}3$	$24{,}4 \pm 2{,}5$	$87{,}6 \pm 2{,}1$
з оксифільноклітинними змінами	3	$37{,}5 \pm 9{,}2$	$24{,}2 \pm 3{,}9$	$79{,}1 \pm 6{,}6$
		Катепсин L		
Позавузлова незмінена	8	$0{,}734 \pm 0{,}051$	$0{,}082 \pm 0{,}008$	$40{,}7 \pm 4{,}9$
Зобнозмінена, у т. ч.	20	$0{,}687 \pm 0{,}092$	$0{,}077 \pm 0{,}013$	$41{,}0 \pm 4{,}3$
макрофолікулярної будови	13	$0{,}603 \pm 0{,}111$	$0{,}064 \pm 0{,}012$	$42{,}6 \pm 5{,}4$
мікрофолікулярної будови	4	$1{,}008 \pm 0{,}188$	$0{,}090 \pm 0{,}030$	$33{,}1 \pm 8{,}9$
з оксифільноклітинними змінами	3	$0{,}627 \pm 0{,}177$	$0{,}183 \pm 0{,}041^*$	$59{,}8 \pm 1{,}8^*$

*Різниця порівняно з активністю ферменту в позавузловій незміненій тканині щитоподібної залози нормофолікулярної будови вірогідна ($P < 0{,}05$).

того ж клітини культури вузлового зоба резистентні до лігандів цих рецепторів. У той же час протеосомна активність у клітинах вузлового зоба підвищена, що може свідчити про порушення проходження апоптозу, бо відомо, що низка про- та антиапоптозних білків розщеплюється за участю протеосом [10]. За нашими попередніми даними, базальний рівень неспецифічної проникності мембран мітохондрій, виділених зі зобнозміненої тканини ЩЗ хворих на еутиреоїдний вузловий зоб, не відрізняється від такого мембран мітохондрій з позавузлової незміненої тканини, хоча зниження прикінцевої швидкості набряку може свідчити про збільшення кількості мітохондрій з порушеними механізмами індукції відкриття мітохондріальних пор. Про відсутність ініціації апоптозу на рівні мітохондрій свідчить також незмінена активність каспази-3 у зобнозміненій тканині щитоподібної залози хворих [10].

З огляду на думку, що активація лізосомального шляху ініціації апоптозу відбувається при підвищенні вмісту катепсинів у цитозолі внаслідок їх виходу з лізосом, звертають на себе увагу результати досліджень активності ферментів у цитозолі зі зобнозміненої тканини щитоподібної залози. Активність катепсину H у тканині мікрофолікулярної будови і катепсину B у тканині макрофолікулярної будови зменшена порівняно з такою в цитозолі з незміненої тканини. Проте про зниження інтенсивності транслокації ферменту з лізосом у цитозоль і, отже, про гальмування лізосомної складової ініціації апоптозу можна певно говорити лише в першому випадку, бо відсоток активності катепсину H у цитозолі зі зобнозміненої тканини залози зменшений лише за цих умов. Треба зазначити, що і в незміненій позавузловій чи позапухлинній тканині щитоподібної залози мікрофолікулярної будови також мають місце ознаки гальмування програмованої загибелі клітин [11].

Навпаки, у цитозолі зі зобнозміненої тканини залози за наявності оксифільноклітинних змін спостерігали вищу активність катепсинів H і L, при цьому підвищена також і частка активності ферментів у цитозолі щодо загальної їх активності. Явище метаплазії мітохондрій (при неоксифільноклітинних ураженнях залози) подекуди спостерігають при запальних чи автоімунних процесах, зокрема тиреоїдитах і хворобі Грейвса, чи у випадку клітинного стресу (наприклад, в опроміненій залозі чи в залозі пацієнтів похилого віку). Пріоритет у виникненні оксифілії дослідники віддають накопиченню у клітинах мутацій мітохондріальної ДНК, які викликають зміни у мітохондріальному диханні та синтезі АТФ при окисному фосфорилюванні, що призводить, зокрема, до підвищення утворення активних сполук кисню та азоту. Існують, проте, значні сумніви і складнощі у визначенні причинно-наслідкової ролі знайдених мутацій, бо часто такі генетичні зміни знаходять і в позапухлинній тканині контрольних зразків без ознак оксифілії [12].

Дані літератури щодо інтенсивності апоптозу за наявності оксифільноклітинних змін суперечливі: від інформації про інтенсивну фрагментацію як ядерної, так і мітохондріальної ДНК за відсутності активації каспаз і морфологічних змін, характерних для апоптозу [13], до реєстрації надекспресії генів каспази-3 і каспази-10, рецепторів смерті Fas і TRAIL без зміни експресії про- і антиапоптозних білків родини Bcl-2 та інтенсивності міжнуклеосомної фрагментації ДНК [14]. У попередніх наших дослідженнях ми встановили, що в оксифільноклітинних аденомах має місце значне підвищення активності каспази-3 одночасно з різким зниженням величини трансмембранного потенціалу мітохондрій та збільшення активності катепсинів H і L в цитозолі, що в сукупності свідчить про активацію апоптозу, зокрема його мітохондріального і лізосомального шляхів [12]. Останнє можна припустити і для зобнозміненої тканини щитоподібної залози хворих з еутиреоїдним вузловим зобом за умови оксифільноклітинних змін у ній.

1. *Rawlings N., Morton F., Barrett A.* MEROPS: the peptidase database // Nucleic Acids Res. – 2006. – No 34. – P. D270-D272.
2. *Reiser J., Adair B., Reinheckel T.* Specialized roles for cysteine cathepsins in health and disease // J. Clin. Invest. – 2010. – **120**, No 10. – P. 3421–3431.
3. *Shuja S., Ca J., Iacobuzio-Donahue C. et al.* Cathepsin B activity and protein levels in thyroid carcinoma, Graves' disease, and multinodular goiters // Thyroid. – 1999. – **9**, No 6. – P. 569–577.
4. *Лянна О. Л., Чорна В. І., Хворостенко М. І.* Особливості регуляції активності цистеїнових протеїназ та визначення їх клінічного значення за канцерогенезу щитоподібної залози // Укр. радіол. журн. – 2011. – № 1. – С. 308–311.
5. *Васильева О. С.* Комплексное участие цистеиновых катепсинов в раковой прогрессии // Электрон. науч. журн. "Исследовано в России". – http://zhurnal.ape.relarn.ru./articles/2009/055.
6. *Srisomsap C., Subhasitanont P., Otto A. et al.* Detection of cathepsin B up-regulation in neoplastic thyroid tissues by proteomic analysis // Proteomics. – 2002. – **2**, No 6. – P. 706–712.
7. *Кирпиченюк Л. Н., Гидранович Л. Г., Шиленок В. Н.* Активность протеолитических процессов при заболеваниях щитовидной железы // Вопр. мед. химии. – 2000. – № 5. – С. 45.
8. *Barret A., Kirschke H.* Cathepsins B, H, and L // Methods in enzymology / Ed. L. Loran. – New-York; London: Academic Press, 1981. – Vol. 80, pt. C. – P. 535–561.
9. *Guicciardi M., Leist M., Gores G.* Lysosomes in cell death // Oncogene. – 2004. – **23**, No 16. – P. 2881–2890.
10. *Myshunina T., Kalinichenko O., Tron'ko N.* Mechanism of apoptosis in thyroid cells under thyroid pathology // Int. J. Physiol. Pathophysiol. – 2010. – **1**, No 2. – P. 81–96.
11. *Мишуніна Т. М., Калініченко О. В.* Особливості проникливості мембран мітохондрій клітин з ділянок нормальної тиреоїдної паренхіми мікро- та нормофолікулярної будови // Ендокринологія. – 2008. – **13**, № 1. – С. 35–44.
12. *Мишуніна Т. М., Калініченко О. В., Тронько М. Д.* Оксифільноклітинні пухлини щитоподібної залози: генетичні порушення, особливості метаболізму, апоптоз (огляд літератури і власних досліджень) // Журн. НАМН України. – 2011. – **17**, № 4. – С. 330–342.
13. *Volante M., Papotti M., Gugliotta P. et al.* Extensive DNA fragmentation in oxyphilic cell lesions of the thyroid // J. Histochem. Cytochem. – 2001. – **49**, No 8. – P. 1003–1011.
14. *Allia E., Cassoni P., Marrocco T. et al.* Oxyphilic and non-oxyphilic thyroid carcinoma cell lines differ in expressing apoptosis-related genes // J. Endocrinol. Invest. – 2003. – **26**, No 7. – P. 660–667.

ДУ "Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка НАМН України", Київ

Надійшло до редакції 15.02.2012

Е. В. Калиниченко, Т. М. Мишунина,
член-корреспондент НАН Украины **Н. Д. Тронько, Л. Ю. Зурнаджи**

Активность цистеиновых катепсинов в ткани щитовидной железы больных с эутиреоидным узловым зобом

Снижение активности катепсина H и ее доли в цитозоле из зобноизмененной ткани щитовидной железы больных с микрофолликулярным эутиреоидным зобом может свидетельствовать о торможении лизосомального пути программированной гибели клетки. Напротив, на активацию ее указывают данные о повышении активности катепсинов H и L и процента их в цитозоле из зобноизмененной ткани с признаками оксифильноклеточных изменений.

O. V. Kalinichenko, T. M. Myshunina,
Corresponding Member of the NAS of Ukraine **M. D. Tronko, L. Yu. Zurnadzhi**

Activity of cysteine cathepsins in thyroid tissue of patients with euthyroid goiter

The results of studies show a decrease of the activity of cathepsin H and its fraction in cytosol from the goiter tissue microfollicular structure, indicating the inhibition of lysosomic ways for the apoptosis initiation. Conversely, its activation indicates the increased activity of cathepsins H and L and their fraction in cytosol from the goiter tissue with oxyphilic changes.