

**Т. М. Мишуніна, О. В. Калініченко, М. Д. Тронько**

*Державна установа “Інститут ендокринології та обміну речовин  
ім. В. П. Комісаренка НАМН України” 04114 Київ*

## **ГАЛЬМУВАННЯ ТРАНСЛОКАЦІЇ КАТЕПСИНІВ У ЦИТОЗОЛІ КЛІТИН ПАПІЛЯРНИХ КАРЦИНОМ ЩИТОПОДІБНОЇ ЗАЛОЗИ З АГРЕСИВНИМИ БІОЛОГІЧНИМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ**

Зважаючи на думку, що будь-які зміни у внутрішньоклітинному переміщенні лізосомальних катепсинів внаслідок порушення регуляції проникності мембран лізосом є чи причиною, чи наслідком виникнення та прогресії пухлин щитоподібної залози, досліджена активність трьох лізосомальних катепсинів (*H*, *B* і *L*) та розрахована частка їх активності (відносно загальної у гомогенаті) у цитозолі клітин папілярних карцином, які мають різні характеристики. Встановлено, що активність катепсинів *H* і *L* в цитозолі з тканини пухлин вища за таку в цитозолі з незміненої позапухлинної тканини (тканина порівняння) та істотно не залежить від клінічних особливостей перебігу хвороби та патогістологічних характеристик пухлин. Активність катепсину *B* у цитозолі з тканини пухлин категорії *N0*, в цитозолі пухлин гетерогенної будови з наявністю ділянок солідної структури, в цитозолі з карцином за інвазії пухлинних клітин у кровоносні судини та пухлин з ознаками оксифільноклітинних змін вища за відповідні значення в цитозолі з тканини порівняння. У той же час, відсоток активності катепсину *B* у цитозолі нижчий у разі інкапсульованих карцином, за кровоносної та лімфатичної інвазії, за розповсюдження пухлини по залозі і за її межі і вищий у разі присутності патогістологічних ознак оксифільноклітинних змін порівняно з пухлинами, для яких ці характеристики відсутні. Крім того, відсоток активності катепсину *B* нижчий в цитозолі з карцином категорії *T3* та у разі гетерогенної будови папілярної карциноми з наявністю солідних ділянок (порівняно з карциномами типової папілярної будови). Для катепсинів *H* і *L* подібне зменшення частки активності ферментів в цитозолі відмічено при інвазії пухлини до кровоносних судин та за розповсюдження її за межі залози. Зменшення транслокації катепсинів з лізосом до цитозолу може свідчити про гальмування лізосомального шляху апоптозу клітин папілярних карцином щитоподібної залози з агресивнішими біологічними характеристиками, що є одним з механізмів, які зумовлюють прогресію злоякісного процесу. Наявність в пухлині оксифільноклітинних змін (клітини Ашкеназі — Гюртле), певно, супроводжується активацією апоптозу останніх.

**Ключові слова:** лізосомальні цистеїнові катепсини, папілярна карцинома щитоподібної залози, апоптоз.

Упродовж багатьох років дослідження участі різних ферментів у механізмах реалізації апоптозу були сконцентровані переважно на вивченні каспаз (і шляхів їх активації) як головних виконавців цього процесу. Разом з тим, часто пухлини можуть продовжувати свій ріст навіть при запуску каспазного каскаду, що пов'язано з гетерогенністю їх клі-

тин і порушеннями у механізмах реалізації інших шляхів клітинної загибелі [21]. В останній час усе більшу увагу привертають каспазо-альтернативні шляхи апоптозу, зокрема, залучення до його реалізації інших протеолітичних ферментів, таких як кальпаїни, серинові протеази, лізосомальні катепсини [20]. Останні локалізуються переважно у

М. Д. Тронько — директор інституту, керівник відділу фундаментальних і прикладних проблем ендокринології, акад. НАМН України

**Лабораторія патофізіології радіаційних уражень ендокринної системи**

Т. М. Мишуніна — г.н.с., д.б.н. (mishunina@list.ru)

О. В. Калініченко — с.н.с.

© Т. М. Мишуніна, В. Калініченко, М. Д. Тронько, 2013.

лізосомах, складаються з ферментів, які належать до різних каталітичних типів і поділяються на три групи — цистеїнові (11 ферментів), аспартильні (*D* і *E*) та серинові (*G*) [27].

Аналізуючи в своїй роботі “*Lysosomes as suicide bags in cell death: myth or reality?*” роль лізосом у запрограмованій загибелі клітин, Turk B. і Turk V. дійшли висновку, що апоптоз не є основною функцією цих органел за фізіологічних умов. У той же час, проапоптозна роль лізосом та їх ферментів може ставати суттєвою за умов патології [30]. Цей висновок підтверджений чисельними даними літератури про роль цистеїнових катепсинів у реалізації апоптозу в різних клітинах при стресових впливах чи деяких патологічних станах, у т. ч. при злоякісному рості.

Певні сигнали апоптозу (такі, як активація специфічних рецепторів смерті чи *p53*, оксидативний стрес) можуть індукувати часткову проникність лізосомальної мембрани і вихід катепсинів у цитозоль [9, 14, 21, 32, 33]. У залежності від ступеня проникності лізосомальної мембрани, кількості та “набору” активних катепсинів, які вивільнюються у цитоплазму, а також активності їх внутрішньоклітинних інгібіторів, запускається той чи інший морфологічний тип клітинної загибелі. Катепсини, які секретуються з лізосом у цитозоль, ініціюють пермеабілізацію мітохондріальної мембрани, що, на думку деяких авторів, є раннім етапом механізму запрограмованої клітинної загибелі і передують змінам пермеабельності мембрани мітохондрій [11]. Активація класичного шляху апоптозу при цьому відбувається шляхом розщеплення під дією катепсинів білків-промоторів родини Bcl-2/Bax. Так, катепсини можуть розщеплювати Bid, переводячи його в активну форму, змінювати конформацію Bax і Bak і вбудову зазначених білків у мембрану мітохондрій, що ініціює вихід апоптоз-індукуючого фактора AIF і цитохрому *c*. Крім того, катепсини можуть прямо активувати каспази чи здійснювати протеоліз їх інгібіторів, а також брати безпосередню участь у деградації структурних білків клітини під час реалізації апоптозної програми [1, 17, 28].

Серед цистеїнових катепсинів, що залучені до розвитку злоякісних пухлин, відзначають у першу чергу катепсини *B* і *L*, які крім участі у процесах інвазії та метастазуванні [26], є також і медіаторами лізосомального шляху клітинної загибелі. Наприклад, на клітинах лінії раку шийки матки показано, що цитотоксичний вплив ресвератролу обумовлений індукцією вивільнення цитохрому *c*, активацією каспази-3 і інтенсифікацією апоптозу клітин, і ці ефекти препарату знімаються при застосуванні інгібіторів катепсинів *B* і *L* [19]. З ін-

шого боку, антиапоптозна дія білків теплового шоку (Hsp70) реалізується на домітохондріальній ланці регуляторного ланцюга апоптозу шляхом попередження змін проникності лізосомальної мембрани, блокади виходу катепсинів у цитозоль, зменшення транслокації Bax до мітохондрій і гальмування вивільнення цитохрому *c* [10].

У той же час, є свідчення, що порушення проникності лізосомальної мембрани і збільшення виходу катепсинів у цитозоль не підвищує чутливості клітини до проапоптозних сигналів [15]. Більш того, існують дані, що гальмування експресії чи активності катепсинів також може викликати апоптоз. Так, синтетичний інгібітор цистеїнових протеїназ *Z-Phe-Gly-NHO-Bz* індукує незалежно від гена *p53*, каспаз і протеїнази апоптоз пухлинних клітин людини, які є стійкими до дії хіміо- та променевої терапії [13]. При зниженні експресії катепсину *B* при дії siРНК спостерігали значне підвищення інтенсивності апоптозу пухлинних клітин, яку визначали за загальноприйнятими методами її реєстрації [25]. У мишей, дефіцитних по генам катепсинів *B* і *L* чи катепсину *H*, посилена самоіндукція апоптозу клітин у пухлинах підшлункової залози, проте дефіцит катепсину *B* не впливав на інтенсивність апоптозу клітин пухлин молочної залози [16, 31]. Подібні результати, на думку деяких авторів, можна пояснити компенсаторним підвищенням активності (експресії) інших цистеїнових катепсинів у відповідь на селективне гальмування одного з них [23].

Участь лізосомальних цистеїнових катепсинів у розвитку патології щитоподібної залози, зокрема онкологічної, вивчена недостатньо. Роботи з цього питання нечисельні, а результати досліджень експресії чи активності цистеїнових катепсинів у тканині злоякісних новоутворень не розглядаються з огляду на їх роль в апоптозі. У той же час, дані, які отримані на культурах нормального тиреоїдного епітелію та клітин карциноми, свідчать, що субклітинна локалізація протеолізу є важливим етапом у регуляції тканинного гомеостазу, і будь-яке втручання у внутрішньоклітинне переміщення катепсинів внаслідок змін регуляції проникності лізосомальних мембран є або причиною, або наслідком виникнення та прогресії пухлин щитоподібної залози [29].

Мета роботи — вивчення активності катепсинів *H*, *B* і *L* у цитозолі з клітин папілярної карциноми щитоподібної залози.

**Матеріал та методи.** Досліджено 21 зразок тканини папілярних карцином та 9 зразків позапухлинної незміненої тканини щитоподібної залози нормофолікулярної будови від пацієнтів з папі-

лярною карциною. На проведення досліджень був отриманий дозвіл від Комітету з питань біоетики Інституту.

Тканину щитоподібної залози промивали охолодженим фізіологічним розчином, зважували, подрібнювали та гомогенізували у 10-кратному об'ємі середовища наступного складу (ммоль/л): цукроза — 250, трис-НСІ-буфер — 20, ЕДТА- $\text{Na}_2$  — 1 (рН 7,4). Фракцію цитозолу виділяли загальноприйнятим методом диференціального центрифугування. Всі процедури проводили при 4 °С.

Активність катепсинів визначали, враховуючи методичні принципи, які викладені в роботі А. Barret і Н. Kirschke [8], із субстратами — *L*-лейцин-4-нітроанілід (катепсин *H*),  $\text{N}_2$ -бензоіл-*DL*-аргінін-4-нітроанілід (катепсин *B*) і азоказеїн, 6 % розчин якого був денатурований 6 М сечовиною (катепсин *L*). Активність катепсинів *H* і *B* виражали у мкмоль паранітроаніліну, який відщепився від субстрату за 1 годину інкубації, на 1 мг білка, а активність катепсину *L* — в одиницях абсорбції низькомолекулярних пептидів, що утворилися за 1 годину інкубації і не осаджуються трихлороцтовою кислотою, на 1 мг білка. Вміст білка встановлювали за однією з модифікацій методу Лоурі [18]. Відсоток активності катепсинів у цитозолі розраховували відносно загальної активності ферментів, яку визначали в гомогенатах, враховуючи об'єм отриманого цитозолу.

Одержані дані опрацьовані статистично з використанням критерію *t* Стьюдента чи непараметричного критерію *U* Вілкоксона — Мана — Уїтні.

При аналізі отриманих результатів були використані дані щодо концентрації ТТГ і тиреоїдних гормонів у крові хворих, яку визначали імуноферментним та радіоімунним методами, відповідно, у клінічній лабораторії Інституту при обстеженні пацієнтів до оперативного втручання, а також деякі характеристики клінічних діагнозів і висновки патолога щодо результатів дослідження післяопераційного матеріалу.

**Результати та їх обговорення.** Перед викладенням та аналізом результатів досліджень зазначимо, що при розподілі зразків тканин по групах враховували лише один із показників (будова тканини, категорія пухлини за *TMN*, наявність капсули, а також інвазії у кровоносні і лімфатичні судини, розповсюдження пухлинних клітин по залозі та за її межі у м'якій тканині), розуміючи при цьому, що поряд із досліджуваною характеристикою зразки тканини мають і інші. Проте у реальних умовах неможливо скласти вибірки, в яких зразки пухлинної тканини щитоподібної залози у кожній групі мали б лише одну з таких характеристик;

тому, на нашу думку, подібним аналізом, незважаючи на його певну гетерогенність, можна все ж отримати адекватну інформацію.

Концентрація ТТГ і вільного тироксину в крові пацієнтів з папілярними карциномами щитоподібної залози знаходилася у межах референтних значень; вона коливалася у крові різних хворих від 0,93 до 2,50 мкОД/мл (ТТГ) та від 14,4 до 19,2 пмоль/л (тироксин), тобто усі пацієнти, тканина щитоподібної залози яких досліджена, були у стані еутиреозу.

Активність катепсинів *H* і *L* у цитозолі, отриманого з тканини папілярних карцином щитоподібної залози, була вища ніж у цитозолі, отриманого з незміненої позапухлинної тканини (табл. 1). При цьому активність зазначених ферментів у цитозолі з тканини папілярних карцином не залежала від клінічних особливостей перебігу хвороби та патогістологічних характеристик пухлин; відзначена лише більш висока активність катепсину *L* у цитозолі з тканини метастазуючих карцином. У той же час, активність катепсину *B* у цитозолі з тканини пухлин категорії *N0*, у цитозолі пухлин гетерогенної будови з наявністю ділянок солідної структури, у цитозолі з карцином за інвазії пухлинних клітин у кровоносні судини та пухлин з ознаками оксифільноклітинних змін була вища, ніж у цитозолі з тканини порівняння. За інших характеристик папілярних карцином активність катепсину *B* або не відрізнялася від контрольних значень, або була помірно підвищеною, проте це не підтверджено статистично.

Беручи до уваги, що модуляція активності катепсинів у цитозолі пов'язана зі змінами транслокації ферментів з лізосом (саме це відображає процес порушення проникності лізосомальних мембран), розраховували частку активності катепсинів у цитозолі відносно загальної активності ферментів у гомогенатах тканин щитоподібної залози. Як видно з даних, наведених в табл. 2, частка активності катепсинів *H* і *L* у цитозолі порівняно з відповідними значеннями для цитозолу з позапухлинної тканини є незміненою; для катепсину *B* відзначено зниження відсотка активності у цитозолі з тканини карцином, для яких доведена інвазія в лімфатичні судини чи розповсюдження пухлини за межі залози у прилеглі тканини.

У той же час, аналіз отриманих даних виявив істотну різницю для частки активності ферменту в цитозолі між карциномами за відсутності і за наявності певних біологічних характеристик: відсоток активності катепсину *B* був нижчим у інкапсульованих карциномах, при кровоносній та лімфатичній інвазії, при розповсюдженні пухлини по залозі та за її межі і вищим при оксифільних змі-

Таблиця 1

Активність цистеїнових катепсинів у цитозолі з незміненої тканини щитоподібної залози та тканин її папілярних карцином,  $M \pm m$ 

Тканина	n	H, мкмоль паранітроаніліну/(год-мг білка)	B, мкмоль паранітроаніліну/(год-мг білка)	L, одиниці абсорбції/(год-мг білка)
Позапухлинна незмінена	9	7,5 ± 2,8	16,1 ± 4,7	0,063 ± 0,006
Папілярних карцином	21	23,8 ± 3,0*	26,7 ± 4,9	0,153 ± 0,018*
категорії T1	8	22,1 ± 6,0*	26,0 ± 7,6	0,138 ± 0,026*
категорії T2	4	30,2 ± 7,1*	33,8 ± 12,6	0,166 ± 0,033*
категорії T3	9	22,3 ± 3,4*	24,2 ± 8,0	0,161 ± 0,028*
категорії N0	13	22,6 ± 4,4*	33,7 ± 6,3*	0,129 ± 0,017*
категорії N1	8	25,6 ± 4,0*	15,4 ± 1,8 <sup>†</sup>	0,192 ± 0,028* <sup>†</sup>
типової папілярної будови	4	24,5 ± 5,7*	15,1 ± 3,1	0,138 ± 0,043
фолікулярно-папілярної будови	10	23,4 ± 1,3*	19,5 ± 3,0	0,161 ± 0,035*
з солідними ділянками у будові	7	23,8 ± 6,5*	43,7 ± 7,1* <sup>а</sup>	0,151 ± 0,018*
інкапсульована	8	22,0 ± 5,7*	28,7 ± 6,7	0,120 ± 0,025*
неінкапсульована	13	24,5 ± 3,6*	25,4 ± 6,9	0,174 ± 0,025*
без інвазії у кровоносні судини	17	21,8 ± 3,0*	22,4 ± 3,9	0,151 ± 0,022*
з інвазією у кровоносні судини	4	32,1 ± 9,5*	44,8 ± 18,8*	0,165 ± 0,027*
без інвазії у лімфатичні судини	12	21,1 ± 4,1*	25,8 ± 4,8	0,142 ± 0,024*
з інвазією у лімфатичні судини	9	27,3 ± 4,6*	27,9 ± 9,9	0,161 ± 0,031*
без розповсюдження по залозі	4	19,1 ± 7,7	22,4 ± 5,7	0,105 ± 0,031
з розповсюдженням по залозі	17	24,8 ± 3,4*	27,7 ± 5,9	0,165 ± 0,021*
без інвазії у прилеглі тканини	15	23,8 ± 3,9*	26,6 ± 5,1	0,142 ± 0,021*
з інвазією у прилеглі тканини	6	23,7 ± 5,1*	27,0 ± 12,2	0,181 ± 0,037*
без оксифільноклітинних змін	15	24,3 ± 3,7*	23,2 ± 5,0	0,150 ± 0,021*
з оксифільноклітинними змінами	6	22,3 ± 5,7*	35,4 ± 11,7*	0,162 ± 0,042*
без склеротичних змін строми	8	24,8 ± 6,0*	30,5 ± 8,6	0,160 ± 0,035*
зі склеротичними змінами строми	13	23,1 ± 3,5*	24,4 ± 6,0	0,149 ± 0,022*

Примітки: \* —  $P < 0,05$  порівняно із незміненою щитоподібною залозою нормофолікулярної будови, <sup>†</sup> —  $P < 0,05$  порівняно із папілярними карциномами категорії N0, <sup>а</sup> —  $P < 0,05$  порівняно із пухлинами типової папілярної будови.

нах порівняно з пухлинами, в яких ці характеристики відсутні (див. табл. 2). Крім того, відсоток активності катепсину B був нижчим у цитозолі з карцином категорії T3 (порівняно з пухлинами категорії T2) та у папілярних карциномах гетерогенної будови з наявністю солідних ділянок (порівняно з карциномами типової папілярної будови). Для катепсинів H і L подібне зменшення частки активності у цитозолі відзначено при інвазії пухлини до кровоносних судин та при розповсюдженні її за межі залози, а також у пухлинах категорії T3 порівняно з пухлинами категорії T1 (відсоток активності катепсину L).

Активність катепсинів H, B і L у гомогенатах тканини папілярних карцином [5], у лізосомах [3] та у цитозолі (див. табл. 1), які виділені з них, істотно збільшена. Відзначена у тканині папілярних карцином щитоподібної залози висока активність цистеїнових катепсинів, ключова роль яких у протеолізі тиреоглобуліну та утворенні тиреоїдних гормонів доведена, не пов'язана зі змінами тиреоїдного статусу пацієнтів, бо рівень тиреоїдних гормонів і ТТГ у крові пацієнтів знаходилися у межах норми. Це цілком відповідає уявленням, що у разі виникнення

злоякісної пухлини у щитоподібній залозі рівень тиреоїдних гормонів, білків, що їх зв'язують, анти-тиреоїдних антитіл та ТТГ у крові пацієнтів не знають критичних змін [2]. Раніше ми обговорили можливі причини невідповідності змін активності ферментів протеолізу тиреоглобуліну та інтенсивності утворення тиреоїдних гормонів у папілярних карциномах щитоподібної залози [5].

Вища активність катепсинів H і L у цитозолі з тканини папілярних карцином певно пов'язана з високою експресією цих ферментів у пухлинних клітинах. Про збільшену експресію мРНК і активність катепсинів B і L у цитозольній фракції, отриманої з тканини різних пухлин людини (карцинома молочної залози, пухлин легень, шлунку, прямої кишки, меланоми, тощо), свідчать дані літератури (наприклад, [12, 22]). У той же час, таке підвищення не можна априорі розглядати як свідчення активації лізосомального шляху апоптозу, бо катепсини у клітині мають широкий спектр функцій — вони є ключовими елементами, які запускають значну низку інших біохімічних процесів шляхом селективного протеолізу різних поліпептидів. Проте, визначення частки активності ферментів у

Таблиця 2

Частка від загальної активності цистеїнових катепсинів у цитозолі з незміненої тканини щитоподібної залози та тканин її папілярних карцином, % ( $M \pm m$ )

Тканина	<i>n</i>	<i>H</i>	<i>B</i>	<i>L</i>
Позапухлинна незмінена	9	44,7 ± 7,2	36,7 ± 3,6	36,5 ± 4,6
Папілярних карцином	21	43,0 ± 4,5	32,8 ± 2,2	35,2 ± 3,3
категорії T1	8	50,2 ± 7,9	34,3 ± 2,3	39,7 ± 4,5
категорії T2	4	46,3 ± 6,8	41,9 ± 1,6	36,5 ± 4,6
категорії T3	9	35,1 ± 7,4	27,4 ± 4,2 <sup>α</sup>	27,1 ± 3,3 <sup>#</sup>
категорії N0	13	44,8 ± 6,4	34,8 ± 2,9	35,3 ± 5,0
категорії N1	8	40,0 ± 6,1	29,6 ± 3,5	35,0 ± 3,8
типової папілярної будови	4	42,6 ± 1,7	38,0 ± 3,4	40,8 ± 6,8
фолікулярно-папілярної будови	10	46,2 ± 2,3	33,3 ± 3,5	35,2 ± 6,0
з солідними ділянками у будові	7	38,6 ± 8,8	28,5 ± 2,5 <sup>β</sup>	32,0 ± 4,1
інкапсульована	8	48,5 ± 5,9	38,3 ± 2,5	31,0 ± 2,8
неінкапсульована	13	39,6 ± 6,3	29,4 ± 2,9 <sup>γ</sup>	37,7 ± 5,1
без інвазії у кровоносні судини	17	45,7 ± 3,0	42,4 ± 2,5	41,2 ± 4,0
з інвазією у кровоносні судини	4	34,2 ± 1,8 <sup>γ</sup>	24,8 ± 5,8 <sup>γ</sup>	25,2 ± 4,5 <sup>γ</sup>
без інвазії у лімфатичні судини	12	45,6 ± 5,8	40,6 ± 3,2	34,8 ± 4,9
з інвазією у лімфатичні судини	9	39,4 ± 7,5	25,3 ± 2,9 <sup>*γ</sup>	35,7 ± 4,6
без розповсюдження по залозі	4	50,0 ± 11,2	39,5 ± 2,0	28,7 ± 4,0
з розповсюдженням по залозі	17	41,4 ± 5,0	29,7 ± 2,6 <sup>γ</sup>	35,2 ± 3,9
без інвазії у прилеглі тканини	15	48,5 ± 4,2	36,5 ± 1,7	38,6 ± 3,2
з інвазією у прилеглі тканини	6	23,3 ± 10,6 <sup>γ</sup>	25,6 ± 3,6 <sup>*γ</sup>	26,7 ± 4,0 <sup>γ</sup>
без оксифільноклітинних змін	15	41,5 ± 4,7	30,6 ± 2,9	32,4 ± 3,5
з оксифільноклітинними змінами	6	49,8 ± 11,3	38,5 ± 1,4 <sup>γ</sup>	42,1 ± 7,4
без склеротичних змін строми	8	54,3 ± 7,7	28,7 ± 3,5	37,2 ± 6,7
зі склеротичними змінами строми	13	41,5 ± 5,8	30,3 ± 2,8	33,9 ± 3,7

Примітки: \* —  $P < 0,05$  порівняно з щитоподібною залозою нормофолікулярної будови, # —  $P < 0,05$  порівняно з папілярними карциномами категорії T1, α —  $P < 0,05$  порівняно з папілярними карциномами категорії T2, β —  $P < 0,05$  порівняно з пухлинами типової папілярної будови, γ —  $P < 0,05$  порівняно з пухлинами без цієї відзнаки.

цитозолі відносно загальної може дати певну інформацію про зміни проникності лізосомальних мембран та інтенсивності транслокації катепсинів із лізосом до цитозолу.

При використанні такого підходу було показано, що в клітинах папілярних карцином, які є більш агресивними за своїми біологічними характеристиками, має місце гальмування лізосомального шляху апоптозу. Про зниження проникності лізосомальних мембран та транслокації катепсинів з лізосом до цитозолу свідчить менша частка активності ферментів (чи усіх з досліджених, чи окремих з них) у цитозолі з тканини неінкапсульованих карцином, при інвазії пухлини до кровоносних чи лімфатичних судин, у разі розповсюдження пухлини по залозі чи за її межі, а також при зниженні ступеня диференціювання карцином (пухлини з ділянками солідної будови). Порівняння цих даних з тими, що були отримані нами раніше при дослідженні мітохондріальних механізмів апоптозу, підтверджує такий висновок. Так, істотне підвищення трансмембранного потенціалу мітохондрій ( $\Delta\Psi$ ) зафіксовано у папілярних карциномах з більш агресивною поведінкою, зокрема при на-

явності їх екстратиреоїдного розповсюдження та при інвазії у лімфатичні судини [7]. У випадку інвазії пухлини у кровоносні чи лімфатичні судини, при екстратиреоїдному розповсюдженні пухлинних клітин, а також при наявності ділянок солідної будови активність каспази-3 в папілярних карциномах нижча, ніж у тканині пухлин без таких характеристик [24].

Слід відзначити збільшення відсотка активності катепсину *B* у цитозолі пухлин з оксифільноклітинними змінами. Це дозволяє припустити, що за цих умов відбувається активація лізосомального шляху апоптозу клітин Ашкеназі — Гюртле, особливості метаболізму яких пов'язані зі стимуляцією мітохондріальної проліферації. Попередніми нашими дослідженнями встановлено, що в оксифільноклітинних аденомах підвищується активність катепсинів *H* і *L* у цитозолі одночасно зі значним підвищенням активності каспази-3 та різким зниженням трансмембранного потенціалу мітохондрій, що в сукупності свідчить про активацію і мітохондріального, і лізосомального шляхів апоптозу [6]. Останнє припустили і для зоб'язаної тканини щитоподібною залозою хворих з еутиреоїдним

вузловим зобом при реєстрації в ній оксифільно-клітинних змін, де поряд з високою активністю катепсинів *H* і *L* має місце підвищений відсоток їх активності в цитозолі [4].

Таким чином, зменшення транслокації катепсинів з лізосом до цитозолу і, отже, гальмування

лізосомального шляху апоптозу клітин папілярних карцином щитоподібної залози з агресивними біологічними характеристиками є одним з механізмів, що зумовлюють прогресію злоякісного процесу. Наявність в пухлині клітин Ашкеназі — Гюртле, певно, супроводжується активацією їх апоптозу.

### Список використаної літератури

1. Бакай Т. С., Громакова І. А., Сорочан П. П. Лізосомальний шлях апоптозу. Нові перспективи протипухлинної терапії // Укр. радіол. журн. — 2005. — 13, № 4. — С. 586-591.
2. Берштейн Л. М. Онкоэндокринология: традиции, современность и перспективы. — СПб: Наука, 2004. — 343 с.
3. Калініченко О. В., Мишуніна Т. М., Тронько М. Д. Зміни активності цистеїнових катепсинів в лізосомах з тканини папілярних карцином щитоподібної залози з різними біологічними характеристиками // Фізіол. журн. — 2013. — 59, № 5. — С. 11-19.
4. Калініченко О. В., Мишуніна Т. М., Тронько М. Д., Зурнаджи Л. Ю. Активність цистеїнових катепсинів у тканині щитоподібної залози хворих з еутиреоїдним вузловим зобом // Доповіді НАН України. — 2012. — № 11. — С. 191-196.
5. Мишуніна Т. М. Чи дійсно зростання концентрації ТТГ у крові хворих з карциномою щитоподібної залози може бути наслідком підвищеної активності катепсину L? // Ендокринологія. — 2013. — 18, № 1. — С. 18-22.
6. 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.
7. Мишуніна Т. М., Калініченко О. В., Тронько М. Д., Зурнаджи Л. Ю. Характеристика змін проникності мембран мітохондрій з тканини папілярних карцином щитоподібної залози та з тканини останньої за інвазією пухлинних клітин // Журн. АМН України. — 2010. — 16, № 1. — С. 5-22.
8. Barret A., Kirschke H. Cathepsins B, H, and L // Methods in Enzymology / Ed. L. Loran. — New-York, London: Acad. Press., 1981. — 80, part C. — P. 535-561.
9. Baumgartner H., Gerasimenko J., Thorne C. et al. Caspase-8-mediated apoptosis induced by oxidative stress is independent of the intrinsic pathway and dependent on cathepsins // Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. — 2007. — 293, № 1. — P. 296-307.
10. Bivik C., Rosdahl I., Ollinger K. Hsp70 protects against UVB induced apoptosis by preventing release of cathepsins and cytochrome c in human melanocytes // Carcinogenesis. — 2007. — 28, № 3. — P. 537-544.
11. Brunk U., Zhao Ming. Septic shock and the lysosomal-mitochondrial axis theory of apoptosis // Molecular Mechanism of Severe Shock. — Kerala, India: Research Signpost, 2009. — P. 91-106.
12. Cystock J. Cathepsin B, cathepsin H, cathepsin X and cystatin C in sera of patients with early-stage and inflammatory breast cancer // Int. J. Biol. Markers. — 2008. — 23, № 3. — P. 161-168.
13. De-Min Zhu, Fatih M. Z-Phe-Gly-NHO-Bz, an inhibitor of cysteine cathepsins, induced apoptosis in human cancer cells // Clin. Cancer Res. — 2000. — 6, № 5. — P. 2064-2069.
14. Erdal H., Berndtsson M., Castro J. et al. Induction of lysosomal membrane permeabilization by compounds that activate p53-independent apoptosis // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2005. — 102, № 1. — P. 192-197.
15. Gewies A., Grimm S. Cathepsin-B and cathepsin-L expression levels do not correlate with sensitivity of tumour cells to TNF- $\alpha$ -mediated apoptosis // Br. J. Cancer. — 2003. — 89, № 8. — P. 1574-1580.
16. Gocheva V., Chen X., Peters C. et al. Deletion of cathepsin H perturbs angiogenic switching, vascularization and growth of tumors in a mouse model of pancreatic islet cell cancer // Biol. Chem. — 2010. — 391, № 8. — P. 937-945.
17. Guicciardi M., Bronk S., Werneburg N. et al. Bid is upstream of lysosome-mediated caspase 2 activation in tumor necrosis factor alpha-induced hepatocyte apoptosis // Gastroenterology. — 2005. — 129, № 1. — P. 269-284.
18. Hartree T. Determination of protein: A modification of Lowry method that gives a linear photometric response // Anal. Biochem. — 1972. — 48, № 2. — P. 422-427.
19. Hsu K., Wu C., Huang S. et al. Cathepsin L mediates resveratrol-induced autophagy and apoptotic cell death in cervical cancer cells // Autophagy. — 2009. — 5, № 4. — P. 451-460.
20. Ivanova S., Repnik U., Bojic L. et al. Lysosomes in apoptosis // Methods Enzymol. — 2008. — 442. — P. 183-199.
21. Jaattela M. Multiple cell death pathways as regulators of tumour initiation and progression // Oncogene. — 2004. — 23, № 16. — P. 2746-2756.
22. Kuester D. The cathepsin family and their role in colorectal cancer // Pathol. Res. Pract. — 2008. — 204, № 7. — P. 491-500.
23. Lankelma J., Voorend D., Barwari T. et al. Cathepsin L, target in cancer treatment? // Life Sci. — 2010. — 86, № 7-8. — P. 225-233.
24. Mishunina T., Kalinichenko O., Tronko M., Statsenko O. Caspase-3 activity in papillary thyroid carcinomas // Exp. Oncol. — 2010. — 32, № 4. — P. 269-272.
25. Nalla A., Gorantla B., Gondi C. et al. Targeting MMP-9, uPAR, and cathepsin B inhibits invasion, migration and activates apoptosis in prostate cancer cells // Cancer Gene Ther. — 2010. — 17, № 9. — P. 599-613.
26. Nomura T., Katunuma N. Involvement of cathepsins in the invasion, metastasis and proliferation of cancer cells // J. Med. Invest. — 2005. — 52, № 1-2. — P. 1-9.
27. Rawlings N., Morton F., Barrett A. MEROPS: the peptidase database // Nucleic Acids Res. — 2006. — 34, Suppl. 1. — P. D270-D272.
28. Stoka V., Turk B., Schendel S. et al. Lysosomal protease pathways to apoptosis. Cleavage of bid, not procaspases, is the most likely route // J. Biol. Chem. — 2001. — 276, № 5. — P. 3149-3157.

29. *Tedelind S., Jordans S., Resemann H. et al.* Cathepsin B trafficking in thyroid carcinoma cells // *Thyroid Res.* — 2011. — 4, Suppl. 1. — P. S2.
30. *Turk B., Turk V.* Lysosomes as suicide bags in cell death: Myth or reality? // *J. Biol. Chem.* — 2009. — 284, № 33. — P. 21783-21787.
31. *Vasiljeva O., Korovin M., Gajada M. et al.* Reduced tumor cell proliferation and delayed development of high-grade mammary carcinomas in cathepsin B-deficient mice // *Oncogene.* — 2008. — 27, № 30. — P. 4191-4199.
32. *Wattiaux R., Wattiaux-de Coninck S., Thirion J. et al.* Lysosomes and Fas-mediated liver cell death // *Biochem J.* — 2007. — 403, № 1. — P. 89-95.
33. *Werneburg N., Guicciardi M., Bronk S. et al.* Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand activates a lysosomal pathway of apoptosis that is regulated by Bcl-2 proteins // *J. Biol. Chem.* — 2007. — 282, № 39. — P. 28960-28970.

Одержано 4.06.2013

## ТОРМОЖЕНИЕ ТРАНСЛОКАЦИИ КАТЕПСИНОВ В ЦИТОЗОЛЬ КЛЕТОК ПАПИЛЛЯРНЫХ КАРЦИНОМ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ С АГРЕССИВНЫМИ БИОЛОГИЧЕСКИМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ

Т. М. Мишуніна, Е. В. Калиніченко, Н. Д. Тронько

Государственное учреждение “Институт эндокринологии и обмена веществ  
им. В. П. Комиссаренко НАМН Украины”, 04114 Киев

Учитывая мнение, что любые изменения внутриклеточного перемещения лизосомальных катепсинов вследствие нарушения регуляции проницаемости мембран лизосом является или причиной, или следствием возникновения и прогрессии опухолей щитовидной железы, исследовали активность трех лизосомальных катепсинов (*H*, *B* и *L*) и рассчитали часть их активности (относительно общей в гомогенате) в цитозоле клеток папиллярных карцином с разными характеристиками. Установлено, что активность катепсинов *H* и *L* в цитозоле из ткани опухолей выше таковой в цитозоле из неизменной внеопухолевой ткани (ткань сравнения), но не зависит существенно от клинических особенностей протекания болезни и патогистологических характеристик опухолей. Активность катепсина *B* в цитозоле из ткани опухолей категории *N0*, в цитозоле опухолей гетерогенного строения с присутствием участков солидной структуры, в цитозоле из карцином при инвазии опухолевых клеток в кровеносные сосуды и опухолей с признаками оксифильноклеточных изменений выше соответственных значений в цитозоле из ткани сравнения. В той же время, процент активности катепсина *B* в цитозоле ниже в случае инкапсулированных карцином, при кровеносной и лимфатической инвазии, при распространении опухоли по железе и за ее пределы и выше в случае присутствия патогистологических признаков оксифильноклеточных изменений в сравнении с опухолями, для которых эти характеристики отсутствуют. Кроме того, процент активности катепсина *B* ниже в цитозоле из карцином категории *T3* и в случае гетерогенного строения с присутствием солидных участков (в сравнении с карциномами типичного папиллярного строения). Для катепсинов *H* и *L* подобное уменьшение доли активности ферментов в цитозоле отмечено при инвазии опухоли в кровеносные сосуды и при распространении ее за пределы железы. Уменьшение транслокации катепсинов из лизосом в цитозоль может свидетельствовать о торможении лизосомального пути апоптоза клеток папиллярных карцином щитовидной железы с агрессивными биологическими характеристиками, что является одним из механизмов, которые обуславливают прогрессию опухолевого процесса. Присутствие в опухоли оксифильноклеточных изменений (клетки Ашкенази — Гюртле), возможно, сопровождается активацией апоптоза последних.

## INHIBITION OF CATHEPSIN TRANSLOCATION TO THE CYTOSOL OF THE THYROID PAPILLARY CARCINOMA CELLS WITH AGGRESSIVE BIOLOGICAL CHARACTERISTICS

Т. М. Myshunina, О. V. Kalinichenko, N. D. Tronko

State Institution “V. P. Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism  
NAMS Ukraine”, 04114 Kyiv

Given the view that any changes in intracellular movement of lysosomal cathepsins due to violation of regulation of permeability of lysosomal membranes are either a cause or consequence of formation and

progression of tumors of the thyroid gland, a study was made of the activity of three lysosomal cathepsins (H, B and L), and calculated was a share of their activity (relative to the total in homogenates) in the cytosol of cell papillary carcinomas with varying biological characteristics. The activity of cathepsins H and L in the cytosol from tumor tissue was found to be higher than that from intact extratumoral tissue (comparison tissue), but does not essentially depend on the clinical features of disease and histopathological characteristics of tumors. Cathepsin B activity in the cytosol from tumor tissue of 0 category, in the cytosol of tumor from a heterogeneous structure with the presence of solid structure areas, in the cytosol from carcinomas at tumor cell invasion into blood vessels and tumors with signs of

At the same time, the percentage of cathepsin B activity in the cytosol is lower in the encapsulated carcinomas, in tumor with blood and lymphatic invasion, in tumor proliferation within the gland and beyond, and is higher in case of presence of pathohistological signs of oxyphilic changes vs. tumors for which these characteristics are absent. In addition, the percentage of cathepsin B activity was lower in the cytosol from carcinomas of 3 category and in case of a heterogeneous structure of carcinomas with presence of solid areas (compared with typical papillary carcinoma). For cathepsins H and L similar decrease in the proportion of enzyme activity in the cytosol was observed in tumor with invasion into the blood vessels and expanding beyond the gland. A decrease in translocation of lysosomal cathepsins into the cytosol may indicate inhibition of lysosomal apoptosis of the thyroid papillary carcinoma cell with aggressive biological features, which is one of the mechanisms that condition the progression of cancer. Possibly, the presence of oxyphilic changes (Ashkenazi — Hurthle cell) in the tumor is accompanied by activation of apoptosis of the latter.