

УДК 577.156:577.15.072

Г. П. Лабунец¹, соискатель**И. Л. Вовчук**¹, д.б.н., профессор**Н. А. Орел**², зав. онкологическим отделением ОПАБ**В. С. Вовчук**¹, соискатель¹Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова, кафедра биохимии, ул. Дворянская 2, Одесса, 65082, Украина, тел.: (0482) 68 78 75, e-mail: irvov@mail.ru;²Одесский областной онкологический диспансер, лаборатория патоморфологии, ул. Неждановой 32, Одесса, 65055, Украина, тел.: (0482) 23 43 87

АКТИВНОСТЬ КАТЕПСИНА *H* В ОПУХОЛЕВОЙ И ПОГРАНИЧНОЙ ТКАНЯХ У ЖЕНЩИН С ДОЛЬКОВО-ИНФИЛЬТРАТИВНОЙ ФОРМОЙ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Исследована активность катепсина *H* в дольково-инфильтративной опухоли и в пограничной с ней ткани молочной железы женщин. В опухоли молочной железы установлено повышение содержания белка, по сравнению с неизменной тканью молочной железы. Прогрессия опухоли сопровождается снижением активности катепсина *H* в опухолевой ткани. Максимальная его активность установлена на I–II стадии развития опухоли.

Ключевые слова: катепсин *H*, протеолиз, опухоль, молочная железа.

Рак молочной железы (РМЖ) занимает первое место в структуре онкологической заболеваемости женского населения планеты [4]. Прогрессирование РМЖ представляет собой мультистадийный процесс, включающий неоангиогенез, инвазию и метастазирование. Гистологическим барьером для инвазирующих клеток злокачественных опухолей являются внеклеточный матрикс (ВМ) и базальная мембрана, деструкция которых обусловлена совместным действием протеолитических ферментов [2, 5].

Одними из потенциальных мишеней в разработке лекарств для борьбы с этим заболеванием являются цистеиновые протеиназы, которые принимают участие во многих процессах, ассоциированных с раковой прогрессией: гиперпролиферации опухолевых клеток, апоптозе, опухоль-индуцированном ангиогенезе, инвазии и иметастазировании [10, 15]. Одной из цистеиновых протеиназ является лизосомальный катепсин *H* (КФ 3.4.22.16). Он принимает участие в регуляции внутриклеточного метаболизма, в посттрансляционной модификации белков, в клеточной дифференцировке, в процессах роста и старения, в активации и инактивации пептидных гормонов и нейропептидов, в процессе иммунного ответа [1] и в деструкции компонентов внеклеточного матрикса и базальной мембраны, тем самым способствуя пролиферации и метастазированию опухолевых клеток [9, 12].

Катепсин *H* обладает как протеиназной, так и экзопептидазной активностью [9]. Высокая активность катепсина *H* установлена в таких опухолях: глиобластоме,

анапластической астроцитоме, колоректальной карциноме [9, 14], в опухолях головы и шеи [7, 13]. Повышенный уровень активности фермента был обнаружен в плазме крови пациентов с раком легких, меланомой [12].

Однако, исследование активности катепсина *H* в опухолевой ткани молочной железы в современной научной литературе освещено недостаточно.

В связи с этим, цель работы состояла в исследовании активности катепсина *H* в ткани дольково-инфильтративной формы рака молочной железы для разработки дополнительного биохимического теста наличия новообразования.

Материалы и методы

В ходе работы были исследованы ткани: 1) из 70 образцов молочной железы без новообразований (пограничная ткань) и 2) из 76 образцов с дольково-инфильтративной формой рака молочной железы. Биохимические исследования в образцах злокачественного новообразования молочной железы были проведены на I-II, II, II-III и III стадиях развития дольково-протоковой формы рака молочной железы. Данная патология молочной железы по гистологической классификации представляет собой узловое образование без четких границ, плотной консистенции, серовато-желтого или белого цвета и имеет разную степень тканевой и клеточной атипии. Патоморфологическую и гистологическую верификацию диагнозов по международной классификации ВОЗ (Женева, 2003) с определением морфологического состояния и степени дифференцирования трансформированных клеток опухолевой ткани осуществляли специалисты сертифицированной и лицензированной патоморфологической лаборатории областного онкологического диспансера г. Одессы [3].

Взятие биопсийного материала для исследований производилось с соблюдением этических и правовых норм согласно: Хельсинской декларации (1964 г.), Конвенции о защите прав и достоинств человека в связи с использованием достижений биологии и медицины (Конвенция о правах человека и биомедицине 1996 г.), закона Украины «О трансплантации органов и других анатомических материалов человеку (1999 г.) и обеспечивалось Одесским онкологическим диспансером на основе договора о совместных исследованиях. Пациентки были информированы и дали письменное согласие на использование анатомического материала для биохимических исследований.

Образцы тканей замораживали при $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ непосредственно после взятия их при оперативном вмешательстве. Образцы гомогенизировали с 0,9 %-м раствором NaCl (в соотношении 1 : 10) и центрифугировали при 9000 g в мин (при $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$) в течение 30 мин. В супернатанте определяли содержание белка по биуретовому методу и активность катепсина *H* по модифицированному методу Бредшоу [8]. Метод определения активности фермента основан на спектрофотометрическом определении продуктов гидролиза белкового субстрата (окситоцина) при длине волны

570 нм. Активность фермента выражали в мкмоль лейцина, образующегося в процессе гидролиза окситоцина, на мг белка в мин при 37 °С. Статистическую обработку результатов исследований проводили в соответствии с t-критерием Стьюдента [6]. За статистически достоверное различие между образцами пограничной ткани и различными стадиями развития опухоли принимали уровень достоверности более 95 % ($p < 0,05$).

Результаты и их обсуждение

Исследование содержания белка показало, что при дольково-инфильтративной форме РМЖ на всех стадиях развития опухоли оно в образцах опухолевых тканей было в 1,6–2,6 раза выше, чем в тканях, пограничных с опухолями (рис. 1). Максимальное содержание белка было установлено в ткани опухоли молочной железы у женщин на II–III стадии ее развития ($63,67 \pm 5,86$). Повышенное количество белка в опухолевой ткани можно объяснить незначительным размером опухолевых клеток с уменьшенным содержанием цитоплазмы.

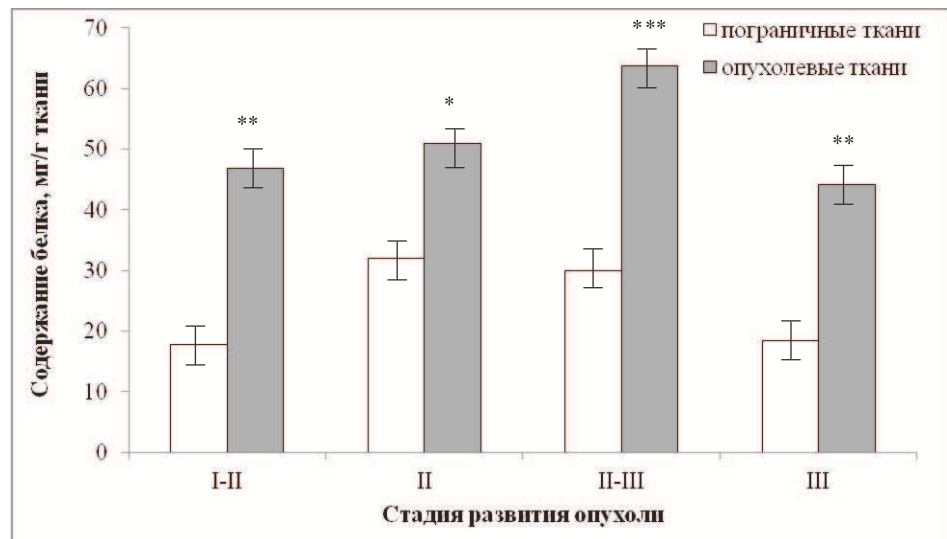


Рис. 1. Содержание белка в пограничных и опухолевых тканях дольково-инфильтративной формы рака молочной железы

Примечание: i–ii стадия (пограничная ткань $n=13$; опухолевая ткань $n=15$); ii стадия (пограничная ткань $n=18$; опухолевая ткань $n=21$); II–III стадия (пограничная ткань $n=28$; опухолевая ткань $n=28$); III стадия (пограничная ткань $n=11$; опухолевая ткань $n=12$). Здесь и далее: * – $p \leq 0,1$ (90 %), ** – $p \leq 0,05$ (95 %), *** – $p \leq 0,02$ (98 %), **** – $p \leq 0,01$ (99 %), ***** – $p \leq 0,001$ (99,9 %) по сравнению с пограничной тканью.

Было показано, что относительная активность катепсина Н была достоверно выше в опухолевой ткани молочной железы (по сравнению с неизменной пограничной тканью), независимо от стадий развития дольково-инфильтративного

РМЖ. На всех стадиях развития опухоли относительная активность катепсина *H* в ткани опухоли была в 1,9–10,2 раза выше, чем в пограничной ткани (рис. 2).

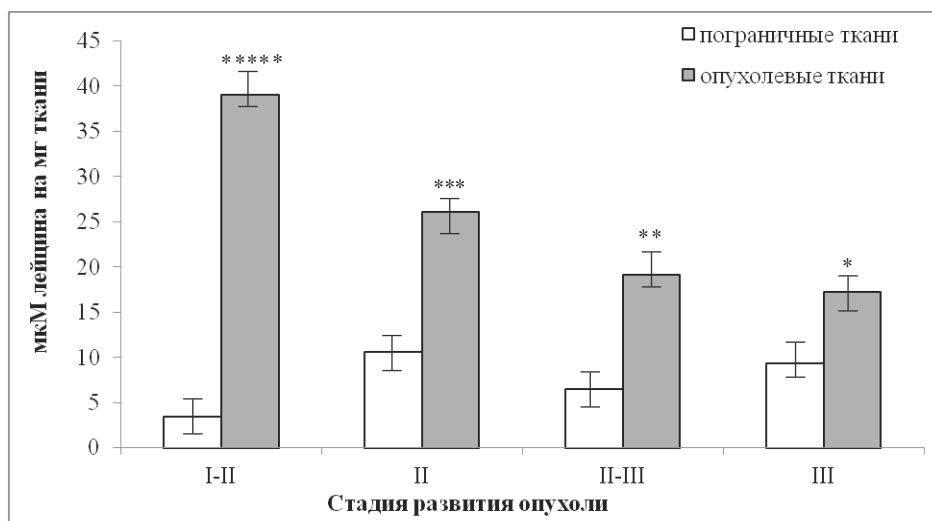


Рис. 2. Относительная активность катепсина *H* в пограничных и опухолевых тканях дольково-инфильтративной формы рака молочной железы. Обозначения те же, что на рис. 1.

Максимальная относительная активность катепсина *H* в опухолевой ткани была установлена на I–II стадии ее развития. С прогрессией опухоли относительная активность катепсина *H* достоверно снижалась: в 1,5 раза – на II стадии, в 2,0 раза на II–III стадии и в 2,3 раза, по сравнению с I–II стадией ее развития.

Удельная активность катепсина *H* также изменялась в зависимости от стадии развития дольково-инфильтративного РМЖ (рис. 3). Максимальная удельная активность катепсина *H* в опухолевой ткани была установлена на I–II стадии. С прогрессией опухоли относительная активность катепсина *H* достоверно снижалась: в 1,5 раза – на II стадии, в 1,9 раза на II–III стадии и в 2,1 раза, по сравнению с I–II стадией ее развития.

На II и II–III стадиях удельная активность катепсина *H* практически не отличалась от активности фермента в пограничной с опухолью ткани молочной железы, что может быть объяснено высоким содержанием белка в «солидной» по размеру ткани опухоли (рис. 1).

Следует отметить, что с прогрессией опухоли удельная активность катепсина *H* в пограничной ткани молочной железы не снижается, как было установлено в опухолевой ткани, а имеет тенденцию к повышению. Полученные результаты частично совпадают с результатами исследований активности катепсина *H* в глиобластоме, анапластической астроцитоме [9, 14], в опухолях головы и шеи [7, 13], в опухолях простаты [11] и меланоме [12], что свидетельствует о неспецифической ответной реакции организма на опухолевый процесс. Повышение активности

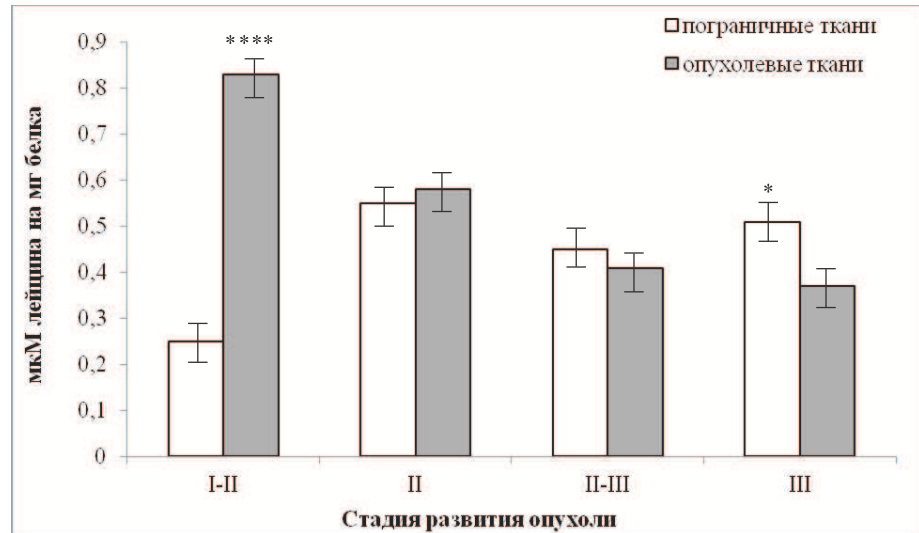


Рис. 3. Удельная активность катепсина *H* в пограничных и опухолевых тканях дольково-инфильтративной формы рака молочной железы. Обозначения те же, что на рис. 1.

лизосомального цистеинового катепсина *H* в опухолевой ткани можно объяснить снижением активности его эндогенного ингибитора, либо экспрессией этого фермента, либо изменением биохимических свойств фермента.

Выводы

При дольково-инфильтративной форме РМЖ, содержание белка в опухолевой ткани на всех стадиях ее развития в 1,6–2,6 раза превышало содержание белка в пограничной ткани.

Активность катепсина *H* изменялась в зависимости от стадии развития дольково-инфильтративного РМЖ.

Максимальная относительная и удельная активность катепсина *H* в опухолевой ткани установлена на I–II стадии развития опухоли.

С прогрессией опухоли относительная и удельная активность катепсина *H* в опухолевой ткани достоверно снижалась.

Список использованной литературы

1. Васильева О. С. Изучение механизма аутокаталитической активации прокатепсина *H in vitro* / О. С. Васильева, В. Ю. Серебров, Б. Турк, В. Турк // Исследовано в России. – 2002. – С. 1092–1102.
2. Веремеенко К. Н., Заболотный Д. И., Кизим А. И. Роль протеолиза в инвазии и метастазировании злокачественных опухолей // Журн. АМН України. – 2002. – Т. 8, № 2. – С. 217–237.
3. Всемирная Организация Здравоохранения / Материалы ежегодных отчетов. Санкт-Петербург. 1981. – 286 с.

4. Грибач С. М. Клініко-біологічні особливості перебігу раку молочної залози у хворих похилого віку / С. М. Грибач, Н. В. Бородай, В. Ф. Чехун // Онкологія. – 2011. – Т. 13, № 4. – С. 260–265.
5. Кушлинский Н. Е. Современные возможности клинической биохимии в онкологии. Последние факты и новые концепции / Н. Е. Кушлинский, Н. Н. Трапезников // Клини. лаб. диагностика. – 2000. – № 9. – С. 3–5.
6. Лапач С. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / С. Н. Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич – К.: Морион, 2000. — 320 с.
7. Потеряева О. Н. Иммуноферментный анализ цистатина С и его роль в динамике развития и лечения опухоли / О. Н. Потеряева, О. В. Фаламеева, В. И. Каледин и др. // Бюллетень СО РАМН. – 2001. – № 1. – С. 34–37.
8. Bradshaw R. S. The amino acid sequence of bovine carboxypeptidase A / Bradshaw R. S., Ericsson L. H., Walsh K. A. [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1969. – Vol. 63, № 4. – P. 1389–1394.
9. Chornaya V., Lyannaya O. Some physicochemical properties of cathepsin H from human meningioma // Exp Oncol. – 2004. – Vol. 26, № 4. – P. 278–281.
10. Coussens L.M., Werb Z. Inflammation and cancer // Nature. – 2002. – V. 420. – P. 860–867.
11. Friedrich B. Cathepsins B, H, L and cysteine protease inhibitors in malignant prostate cell lines, primary cultured prostatic cells and prostatic tissue / Friedrich B., Yung K., Lein M., Turk I., Rudolph B., Hampel G., Schnorr D., Loening S. A. // Eur J Cancer. – 1999. – Vol. 35. – P. 138–144.
12. Kageshita T. Biochemical and immunohistochemical analysis of cathepsins B, H, L and D in human melanocytic tumors / Kageshita T., Yoshii A., Kimura T., Maruo K., Ono T., Himeno M., Nishimura Y. // Arch Dermatol Res. – 1995. – Vol. 87. – P. 266–272.
13. Kos J., Schweiger A. Cathepsins and cystatins in extracellular fluids – useful biological markers in cancer // Radiol Oncol. – 2002. – Vol. 36. – P. 176–179.
14. Sivaparvathi M. Expression and the role of cathepsin H in human glioma progression and invasion / Sivaparvathi M., Sawaya R., Gokaslan Z., Chintala S. K., Rao J. S., Chintala K. S. // Cancer Lett. – 1996. – Vol. 104. – P. 121–126.
15. Sloane B. F. Cathepsin B and tumor proteolysis: contribution of the tumor microenvironment / B. F. Sloane, S. Yan, I. Podgorski et al // Semin. Cancer Biol. – 2005. – V. 5, № 2. – P. 14–157.

Г. П. Лабунец¹, И. Л. Вовчук¹, Н. А. Орел², В. С. Вовчук¹

¹Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, кафедра біохімії, вул. Дворянська 2, Одеса, 65082, Україна, тел.: (0482)68 78 75, e-mail: irvov@mail.ru;

²Одеський обласний онкологічний диспансер, лабораторія патоморфології, вул. Нежданової, 32, Одеса, 65055, Україна, тел.: (0482) 23 43 87

АКТИВНІСТЬ КАТЕПСИНУ H В ПУХЛИННІЙ І СУМІЖНІЙ ПУХЛИНІ ТКАНИНАХ У ЖІНОК З ДОЛЬКОВО-ПРОТОКОВОЮ ФОРМОЮ РАКУ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ

Резюме

Досліджено активність катепсину H в дольково-протоковій пухлині та в суміжній пухлинній тканині молочної залози жінок. В пухлині молочної залози встановлено підвищення вмісту білка, порівняно з незміненою тканиною молочної залози. Прогресія пухлини супроводжується зниженням активності катепсину H в пухлинній тканині. Максимальна його активність встановлена на I–II стадії розвитку пухлини.

Ключові слова: катепсин H, протеоліз, пухлина, молочна залоза

G. P. Labunets¹, I. L. Vovchuk¹, N. A. Orel², V. S. Vovchuk¹

¹Odessa National Mechnikov University, Department of Biochemistry,
2, Dvoryanskaya Str., Odessa, 65082, Ukraine, tel.: (0482) 68 78 75, e-mail: irvov@mail.ru,

²Odessa regional oncologic dispensary, laboratory of patomorphology, 32, Nezdanovoi str.,
Odessa, 65055, Ukraine, tel.: (0482) 23 43 87

**ACTIVITY OF CATHEPSIN *H* IN THE TUMOR AND CIRCUMFERENTIAL
TISSUES AT WOMEN WITH LOBULE-CHANNEL FORM OF BREAST
CANCER**

Summary

Activity of cathepsin H in lobule-channel tumor and in boundary with it fabric of suckling gland of women has been investigated. Increase of maintenance of protein in the tumoral tissues in comparison with not changed tissue of a mammary gland is determined. Progression of tumour is accompanied with the decline of activity of its enzyme in tumour's tissue. The maximal activity of cathepsin H at I-II stages of development of tumour was established.

Key words: cathepsin *H*, proteolysis, tumor, mammary gland.

Статья поступила в редакцию 20.10.13