УДК 577.15

АКТИВНОСТЬ ТКАНЕВЫХ КАТЕПСИН-L-ПОДОБНЫХ ПРОТЕИНАЗ У ЖЕНЩИН С ОНКОПАТОЛОГИЕЙ ТЕЛА МАТКИ

И. Л. ВОВЧУК, С. С. ЧЕРНАДЧУК

Одесский национальный университет им. И. И. Мечникова, Украина;
e-mail: irvov@mail.ru

Вивчено активність та визначено оптимум pH катепсин-L-подібних протеїназ у доброякісних та злоякісних новоутвореннях тіла матки.

У доброякісних новоутвореннях активність катепсин-L-подібних протеїназ змінюється залежно від поширення та глибини процесу новоутворення, а також від проліферативного потенціалу пухлинних клітин ендометрію та міометрію.

Активність катепсин-L-подібних протеїназ у злоякісній епітеліальній пухлині ендометрію – аденокарциномі зворотньо пропорційна ступеню диференціації пухлинних клітин.

Ключові слова: ендометрій, міометрій, аденокарцинома, протеїнази, пухлина.

В настоящее время тканевые цистеиновые катепсин-L-подобные протеиназы рассматриваются как инструмент внутриклеточного деструктивного и ограниченного протеолиза и как пусковой механизм каскадной активации протеиназ, которые играют важную роль в деградации долгоживущих белков с периодом полужизни 4–24 часа [1].

Катепсин L является важным протеолитическим ферментом, который вовлечен в процессы развития, роста, ремоделирования и ангиогенеза, в постсинтетическую модификацию предшественников пептидных гормонов и нейромедиаторов [2], а также в различные патологические процессы.

Расщепляя белки на поверхности клеточных мембран либо вблизи нее, катепсин-L-подобные протеиназы принимают участие в деградации внеклеточного матрикса и тем самым способствуют пролиферации опухолевых клеток и инвазии их в пограничные ткани [3, 4]. Данный катепсин участвует во взаимодействиях антиген–антитело, в процессах инвазии и метастазирования [5], в локализации и секреции интрацеллюлярных белков. Его активность повышается при таких заболеваниях как глиобластома, анапластическая астроцитома, колоректальная карцинома [6], меланома [3], рак молочной железы [7].

Следует отметить, что активность катепсин-L-подобных протеиназ при онкопроцессе в тканях тела матки практически не изучена, не исследована активность данных протеиназ с учетом возрастных особенностей женщин.

Для определения активности катепсина L используют такие эндогенные субстраты как миозин [8], актин, коллаген, ламинин, фибронектин, протеогликан [8, 9], Р-70-фосфорилированную протеинкиназу С, миелин нервного волокна [10], брадикинин [11], гормоны белковой природы – инсулин, тиреоглобулин [12] и наиболее часто азоказеин [13].

В настоящей статье приведены данные об активности катепсин-L-подобных протеиназ, расщепляющих азоказеин в неизмененных и трансформированных тканях тела матки.

Материалы и методы

В ходе работы были исследованы 102 образца тканей без патологии, предоставленные кафедрой судебной медицинской экспертизы Одесского медицинского университета им. В. И. Пирогова и 233 образца резецированной ткани с новообразованиями эндометрия и миометрия у женщин, не получавших медикаментозного дооперационного лечения.

Образцы тканей замораживали при -18 °С непосредственно после взятия их при оперативном вмешательстве или вскрытии. Ткань гомогенизировали с 0,9%-м раствором NaCl (в соотношении 1 : 10) и центрифугировали при 12 000 оборотов/мин (при + 4 °С) в течение 45 мин.

В супернатанте определяли активность катепсин-L-подобных протеиназ по методу В. И. Черной [14] и концентрацию белка по методу O. H. Lowry [15]. Метод определения активности ферментов основан на определении количества продуктов гидролиза 1%-го азоказеина, синтезированного по методу Суринова [16], не осаждаемых 10%-м раствором трихлоруксусной кислоты.

Для подавления активности сериновых протеиназ использовали соевый ингибитор Куница,

0,8 мг/мл, а для подавления активности металлопротеиназ – 5 мМ ЭДТА («Reanal», Венгрия); для восстановления дисульфидных связей в молекулах катепсин-L-подобных протеиназ – дитиотрейтол 200 мМ («Sigma», США).

Активность ферментов выражали в нмоль тирозина за 1 ч на 1 мг белка при 37 °С инкубации и определяли при длине волны 366 нм.

Морфологическое состояние измененных тканей, обширность и глубина онкопроцесса с учетом дифференциации и пролиферации опухолевых клеток были верифицированы патоморфологической лабораторией Одесского хирургического онкологического диспансера по международной классификации ВОЗ [17].

Статистическую обработку результатов исследований проводили в соответствии с *t*-критерием Стьюдента [18].

Результаты и обсуждение

По данным литературы, оптимальные условия для гидролиза белковых субстратов данным катепсином формируются при pH 6,5 – 7,2 [13].

Наши исследования показали, что максимальная активность катепсин-L-подобных протеиназ в опухолях гормонозависимых органов – молочной железы и яичника определяется при pH 6,5, а в образцах тканей тела матки – при pH 6,0 (рис. 1), что позволяет предположить наличие тканеспецифичных катепсин-L-подобных протеиназ.

В тканях тела матки без патологии нами достоверных возрастных изменений активности катепсин-L-подобных протеиназ обнаружено не было (таблица).

В образцах доброкачественных и злокачественных опухолей тела матки активность катепсин-L-подобных протеиназ снижалась у женщин после 70 лет (по сравнению с другими возрастными группами) в 1,5–2,1 раза и 1,1–1,6 раза соответственно, что может быть связано с возраст-

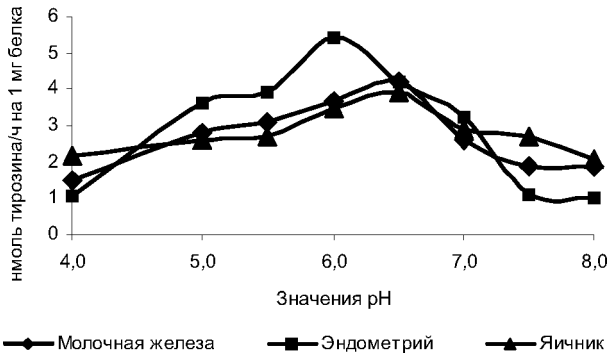

Рис. 1. Оптимум pH катепсин-L-подобных протеиназ в трансформированной ткани репродуктивных органов женщин.

ной инволюцией данного органа. Вне зависимости от возраста активность катепсин-L-подобных протеиназ достоверно увеличивалась в доброкачественных и в злокачественных новообразованиях тела матки по сравнению с тканями без патологии.

В связи с тем, что для каждого периода жизни женщин характерно наличие определенных патологий тела матки, нами были исследованы наиболее часто встречающиеся новообразования тела матки (рис. 2).

Исследование активности катепсин-L-подобных протеиназ в образцах доброкачественных новообразований тела матки показало достоверное увеличение активности данного фермента при наличии воспалительных и гиперпластических процессов, характерных для возрастного периода женщин от 40 до 50 лет, по отношению к тканям тела матки без патологии (таблица). Активность катепсин-L-подобных протеиназ в доброкачественных новообразованиях миометрия достоверно увеличивается (по отношению к показателям ткани без патологии) в 1,7–2,1 раза по мере воз-

Активность катепсин-L-подобных протеиназ (нмоль тирозина/ч на 1 мг белка) в тканях тела матки у женщин разного возраста

Возраст обследуемых	Ткань без патологии	Доброкачественные новообразования	Злокачественные опухоли
31–40 лет	0,223 ± 0,026 (n = 27)	0,330 ± 0,040 ↑ (n = 45)	0,640 ± 0,060 ↑ (n = 5)
41–50 лет	0,258 ± 0,030 (n = 25)	0,410 ± 0,046 ↑ (n = 55)	0,556 ± 0,053 ↑(n = 10)
51–60 лет	0,210 ± 0,023 (n = 25)	0,373 ± 0,039 ↑ (n = 52)	0,450 ± 0,042 ↑ (n = 14)
61–70 лет	0,280 ± 0,031 (n = 25)	0,461 ± 0,051 ↑ (n = 37)	0,502 ± 0,050 ↑ (n = 7)
Более 70 лет	–	0,210 ± 0,024 ↓(n = 25)	0,380 ± 0,041 ↓(n = 5)

Примечание: ↑ – достоверное увеличение активности фермента по отношению к ткани без патологии; ↓ – достоверное снижение активности фермента в опухолевых тканях у женщин после 70 лет по сравнению с другими возрастными группами.

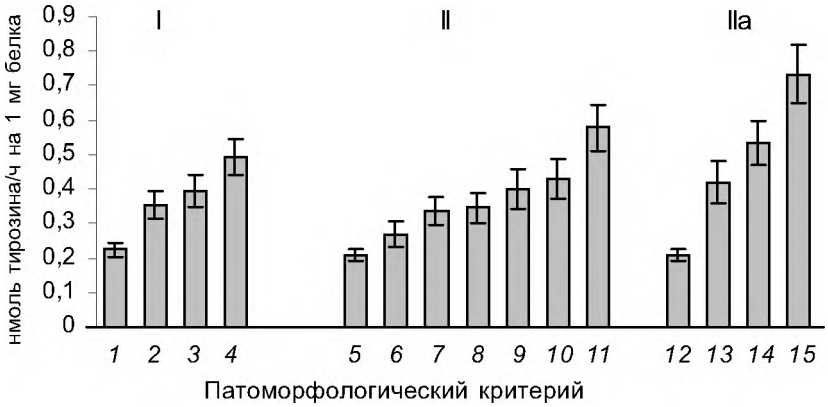

Рис. 2. Активность катепсин-L-подобных протеиназ в тканях тела матки.
I — ткань миометрия: 1 — ткань миометрия без патологии (n = 102); 2 — фибролейомиома + полип (n = 23); 3 — фибролейомиома (n = 42); 4 — фибролейомиома пролиферирующая (n = 31). II — ткань эндометрия: 5 — ткань эндометрия без патологии (n = 102); 6 — кистозная атрофия эндометрия (n = 16); 7 — железисто-кистозная гиперплазия (n = 12); 8 — эндометриоз + железисто-кистозная гиперплазия (n = 11); 9 — аденоматоз (n = 15); 10 — железисто-кистозная гиперплазия + аденоматоз (n = 15); 11 — железисто-кистозная гиперплазия + аденоматоз + эндометриоз (n = 27). IIa — ткань эндометрия: 12 — ткань эндометрия без патологии (n = 102); 13 — высокодифференцированная аденокарцинома (n = 14); 14 — умереннодифференцированная аденокарцинома (n = 19); 15 — низкодифференцированная аденокарцинома (n = 8).

растания пролиферативного потенциала опухолевых клеток фибролейомиомы (рис. 2, 1—4). Наличие доброкачественных новообразований в эндометрии характеризовалось достоверным увеличением активности катепсин-L-подобных протеиназ по сравнению с тканью без патологии, которая максимально увеличивалась (в 2,7 раза) при аденоматозе (cancer in situ), отягощенном железисто-кистозной гиперплазией и эндометриозом.

В ткани аденокарциномы — злокачественной эпителиальной опухоли эндометрия (по сравнению с эндометрием без патологии) активность катепсин-L-подобных протеиназ достоверно увеличивается в 2,0—3,5 раза и обратнопропорциональна степени дифференциации опухолевых клеток (рис. 2).

Увеличение активности данной цистеиновой протеиназы можно объяснить, с одной стороны, экспрессией гена, кодирующего данный фермент. Так, R. Sodestrom с соавторами (1999) на клонах цистеиновых катепсинов доказали возрастание уровня мРНК в цитоплазме трансгенных мышей [19]. С другой стороны, известно, что активность катепсин-L-подобных протеиназ регулируется уровнем их эндогенных ингибиторов: стефинами A, B, цистатином C. Дисбаланс компонентов этой системы может быть ассоциирован с увеличением инвазивности и развитием малигнизированного фенотипа клеток [20] и может находиться под гормональным контролем [21].

Таким образом, результаты наших исследований показали, что активность катепсин-L-подобных протеиназ увеличивается в тканях новообразований тела матки по сравнению с тканями без патологии и снижается у женщин после 70 лет. В доброкачественных новообразованиях активность этих ферментов изменяется в зависимости от обширности и глубины онкопроцесса и зависит от пролиферативного потенциала опухолевых клеток миометрия и эндометрия; в злокачественной эпителиальной опухоли эндометрия — аденокарциноме она обратно пропорциональна степени дифференциации опухолевых клеток. Оптимум pH катепсин-L-подобных протеиназ в тканях тела матки находится в пределах pH 6,0.

ACTIVITY OF TISSUE CATHEPSIN-L-LIKE PROTEINASES OF WOMEN WITH WOMB BODY ONCOPATHOLOGY

I. L. Vovchuk, S. S. Chernadchuk

Mechnikov Odessa National University, Ukraine;
e-mail: irvov@mail.ru

S u m m a r y

Activity and optimal pH of cathepsin-L-like proteinases was studied in benign and malignant tumours of the womb body.

In the benign tumors activity of cathepsin-L-like proteinases changes depending on the expansion and depth of extension benign tumour and is defined by proliferative potential of tumour cells of

myometrium and endometrium.

Activity of cathepsin-L-like proteinases in malignant epithelial tumour of endometrium – adenocarcinoma is inversely proportional to the level of differentiation of the tumour cells.

K e y w o r d s: endometrium, miometrium, adenocarcinoma, proteinases, tumour.

1. *Dean R. T.* // Coll. Ges. Biol. Chem. 1979. N 30. P. 49–54.
2. *Lazure C., Seidan N. G., Pelaprat D., Chretien M.* // Can. J. Biochem. Cell Biol. 1983. **67**, N 7. P. 501–515.
3. *Sloane B. F., K. V. Hoon, J. G.* // Cancer Res. 1982. **42**, N 4. P. 980–986.
4. *Hara K., Kominami E., Katunuma N.* // FEBS Lett. 1988. **231**, N 1. P. 229–231.
5. *Rozhin J., Wade R. L., Honn K. V., Sloane B. F.* // Biochem. Biophys. Acta. 1989. **164**, N 1. P. 556–561.
6. *Turk B., Turk D., Turk V.* // Cancer Lett. 1996. **104**. P. 121–126.
7. *Lah T. T., Calaf G., Kalman E. et al.* // Breast Cancer Res Treat. 1996. **39**, N 2. P. 221–233.
8. *Жлоба А. А.* // Укр. биохим. журн. 1986. **58**, № 4. С. 101–113.
9. *Marcs N., Berg M. J.* // Biochem Biophys. 1987. Nov. 15. **259**, N 1. P. 131–143.
10. *Kihara M., Kakegawa H., Matano Y. et al.* // Biol. Cheme. 2002. **383**, N 12. P. 1925–1929.
11. *Desmazes C., Galineau L. et al.* // Biochime. 2003. **270**, N 1. P. 171–178.
12. *Fredichs B., Tepel et al.* // Clin Invest. 2003. **111**, N 11. P. 1733–1745.
13. *Сологуб Л. І., Пашковська І. С., Антоняк Г. Л.* Протеази клітин та їх функція. К: Наукова думка. 1992. 195 с.
14. *Черная В. И., Рева А. Д.* // Укр. биох. журн. 1989. **61**, № 5. С. 47–50.
15. *Lowry O. H., Rosenbrough N. I., Fan A. Z., Randol R. J.* // J. Biol. Chem. 1951. **193**. P. 265–275.
16. *Суринов Б. П., Манойлов С. Е.* // Вопр. мед. хим. 1965. **11**, № 5. С. 55–58.
17. *Всемирная* Организация Здравоохранения / Материалы ежегодных отчетов. Санкт-Петербург. 1981. 286 с.
18. *Рокицкий П. Ф.* Биологическая статистика. Минск: Высш. школа. 1967. 326 с.
19. *Sodestrom R. et al.* // Biochime Biophys Acta. 1996. 7. **1446**, N 1–2. P. 35–46.
20. *Bervar A., Zajc C. et al.* // Biol. Chem. 2003. **384**, N 3. P. 447–455.
21. *Katanura N.* // Revis. Biol. Cellular. 1989. **20**. P. 35–61.

Получено 10.11.2003