

В-, Н- ТА L-КАТЕПСИНОПОДІБНА АКТИВНІСТЬ У ПЛАЗМІ КРОВІ ПАЦІЄНТІВ ІЗ ЗАХВОРЮВАННЯМИ ЩИТОВИДНОЇ, ПАРАЩИТОВИДНИХ ТА НАДНИРКОВИХ ЗАЛОЗ

О. В. КАЛІНІЧЕНКО, Т. М. МИШУНІНА, М. Д. ТРОНЬКО

*ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка АМН України», Київ;
e-mail: mishunina@list.ru*

У плазмі крові хворих із різними захворюваннями щитовидної, паращитовидних та надниркових залоз досліджували В-, Н- та L-катепсиноподібну активність по відношенню до Na-бензоїл-D,L-аргінін-4-нітроаніліду, L-лейцин-4-нітроаніліду та азоказеїну відповідно. Показано, що у плазмі крові хворих з усіма зазначеними захворюваннями має місце підвищення Н-катепсиноподібної активності. Це підтверджує думку про те, що за будь-якої патології, яка супроводжується тканинним ростом, відбувається активація секреції катепсину Н у кров. Висока В-катепсиноподібна активність у плазмі крові хворих із захворюваннями щитовидної залози зафіксована виключно при вузлових формах тиреоїдної патології, тоді як характер змін L-катепсиноподібної активності при цих захворюваннях був не таким закономірним. При захворюваннях надниркових залоз зміни В- та L-катепсиноподібної активності спостерігали тільки у плазмі крові хворих з пухлинами мозкового шару, але не кори залоз: В-катепсиноподібна активність була підвищеною у плазмі крові хворих як із доброякісними, так і злоякісними пухлинами, а L-катепсиноподібна активність зменшеною за наявності доброякісної пухлини із хромафінної тканини. Схожа картина змін ензиматичної активності у плазмі крові хворих не дозволяє вважати, що визначення В- та L-катепсиноподібної активності у крові можна рекомендувати з метою одержання додаткової інформації у разі встановлення чи уточнення діагнозу, зокрема при захворюваннях щитовидної залози.

Ключові слова: цистеїнові катепсини В, Н, L, патологія щитовидної, паращитовидних та надниркових залоз, кров.

У літературі широко дискутується питання про доцільність із діагностичною чи прогностичною метою визначення у крові хворих вмісту певних сполук чи активності різних ензимів, значення яких у розвитку тих чи інших захворювань доведено. Це, певною мірою стосується і визначення у крові активності лізосомних цистеїнових катепсинів. З одного боку, встановлена участь цих ензимів у регуляції багатьох життєво важливих функцій організму (імунна відповідь, активація ремоделювання та деградації екстрацелюлярного матриксу, біосинтез та секреція низки гормонів, диференціювання, старіння та апоптоз клітин тощо), а з другого, вже відомо, що активація лізосомного шляху регуляції метаболізму у клітинах є суттєвою для окремих ланок патогенезу багатьох захворювань: ішемії, нейродегенеративних процесів, токсичних уражень печінки, силікозу, подагри, атеросклерозу, артеріальної гіпертензії, діабету, злоякісної трансформації та формування резистентності організму до ліків [1–3].

У нормі цистеїнові лізосомні катепсини, зокрема Н, В та L, при рН вище 7,0 швидко інактивуються, тому реєстрація активності цих ензимів у крові, де присутні їхні ендogenous інгібітори, можлива лише за масивного виходу ензимів із тканин при виражених гострих запальних, некротичних або деструктивних процесах [4]. У разі зв'язування катепсинів з інгібіторами (які належать до α -макроглобулінів) активний центр ензимів залишається вільним, при цьому вони зберігають активність по відношенню до субстратів з невеликою масою, що дозволяє реєструвати її у плазмі крові ензиматичними методами [2, 8]. Крім того, для пухлинних клітин встановлено важливу особливість – вони продукують цистеїнові пептидгидролази зі зміненими властивостями молекули [5, 6], зокрема такі ензими є стабільними при нейтральних та слабколужних значеннях рН [7].

Аналізуючи дані літератури, необхідно відмітити різні висновки авторів щодо цінності визначення активності катепсинів у

крові, зокрема онкологічних хворих. На думку одних такі дослідження можуть надати додаткову біохімічну інформацію для диференційного діагнозу [9, 10], свідчити про реакцію організму на пухлинну інвазію і бути показниками ступеня тяжкості та напрямку перебігу патологічного процесу [11, 12], дозволяють оцінити ефективність терапії [13] чи слугувати для передбачення прогнозу захворювання [11, 13–15]. Тенденцію до стійкого зниження активності лізосомних цистеїнових катепсинів після лікування розглядають як позитивну ознаку нормалізації процесів регуляції тканинного протеолізу, який тісно пов'язаний з імунологічними механізмами [16]. Інші вважають, що зниження активності катепсинів характеризує тяжкість онкологічного процесу та метастатичний потенціал пухлини [17]. Є і така думка: зміна активності лізосомних цистеїнових катепсинів у крові онкологічних хворих не є маркером малігнізації, проте може свідчити про особливий стан організму в період підготовки до тканинної трансформації та під час неї [16]. Отже, питання про значення та доцільність дослідження активності цих ензимів у крові хворих залишається до кінця не визначеним.

Щодо змін активності катепсинів В, Н та L у крові хворих з патологією щитовидної залози, то такі роботи поодинокі [10, 12, 18]. Показано, що активність катепсинів Н та В не змінювалася у крові хворих із тиреоїдними захворюваннями. Активність катепсину L у крові хворих з карциномами щитовидної залози була істотно підвищеною, а у хворих із еутиреоїдним зобом залишалася на рівні її у здорових осіб. Проте після оперативного втручання активність цього катепсину у крові хворих як з еутиреоїдним зобом, який автори вважають доброякісною пухлиною, так і з папілярною карциномою, різко зменшувалася і була істотно нижчою, ніж активність ензиму у крові здорових осіб. Дотепер мало що відомо про активність катепсинів у крові хворих з іншими ендокринними захворюваннями.

Зважаючи на вищенаведене, метою роботи було – визначення активності катепсинів В, Н та L у плазмі крові хворих із різними захворюваннями щитовидної, парашитовидних та надниркових залоз. Слід зазначити, що оскільки властивості цистеїнових катепсинів, що знаходяться у крові, неможливо відповідно порівняти із властивостями очищених катепсинів, то коректніше говорити про «Н-, В- та L-катепсиноподібну активність у плазмі крові».

Матеріали і методи

На проведення досліджень був отриманий дозвіл від Комітету з біоетики Інституту. Хворі, які перебували на лікуванні у хірургічному відділенні Інституту, були поінформовані щодо мети дослідження та дали згоду на використання їхньої крові для наукових цілей.

Досліджено 191 зразок плазми крові хворих із різними захворюваннями щитовидної (вік пацієнтів $36,7 \pm 3,0$ років, серед них 133 жінки та 26 чоловіків), парашитовидних ($57,0 \pm 3,5$ років, 4 жінки) і надниркових залоз ($49,0 \pm 5,7$ років, 19 жінок і 9 чоловіків) та 12 зразків крові практично здорових добровольців ($44,8 \pm 3,0$ років, 9 жінок та 3 чоловіки). Кров відбирали з ліктьової вени пацієнтів натщесерце у пробірці, що містила 100 мкл насиченого розчину ЕДТА. Через 30 хв ($2-4^\circ\text{C}$) після забору кров центрифугували при 3000 об./хв упродовж 15 хв. Плазму зберігали при -20°C .

В- та Н-катепсиноподібну активність визначали відповідно в 1,0 і 0,75 мл інкубаційної суміші (0,1 М К-На фосфатний буфер, рН 6,0 та 0,2 М фосфатний буфер, рН 6,8) у присутності 2-меркаптоетанолу (2 мМ), тритону X-100 (0,2%) та ЕДТА (1,33 мМ та 4 мМ) по відношенню до синтетичних субстратів $\text{Na}\alpha$ -бензоїл-D,L-аргінін-4-нітроаніліду та L-лейцин-4-нітроаніліду. Час інкубації становив відповідно 1 та 2 год [19]. Ензиматичну активність виражали у мкмолях паранітроаніліну, який відщепився від субстрату, за 1 год інкубації, на 1 мл плазми крові.

L-катепсиноподібну активність визначали в 0,75 мл інкубаційної суміші (0,066 М К-На-фосфатний буфер, рН 5,0) у присутності 2-меркаптоетанолу (2 М) та тритону X-100 (0,2%) по відношенню до азоказеїну, 6%-й розчин якого був попередньо денатурований 6 М сечовиною. Після двогодинної інкубації реакцію зупиняли 10%-м розчином ТХО [19]. Ензиматичну активність виражали в умовних одиницях абсорбції низькомолекулярних пептидів, що утворюються за 1 год інкубації і не осаджуються ТХО, на 1 мл плазми.

Одержані дані статистично обробляли з використанням *t*-критерію Стьюдента і непараметричного *U*-критерію Вількоксона-Манна-Уїтні. Критичний рівень значимості приймали, якщо *P* становило 0,05.

Під час виконання досліджень були використані: азоказеїн, $\text{Na}\alpha$ -бензоїл-D,L-аргінін-4-нітроанілід, L-лейцин-4-нітроанілід, диметилсульфоксид (усі реактиви фірми Sigma, США), тритон X-100 (Loba Chemi, Австрія),

ЕДТА (Reanal, Угорщина), 2-меркаптоетанол (Ferak laborat GMBH Berlin, Німеччина). Інші реактиви вітчизняного виробництва.

Результати та обговорення

Внаслідок проведених досліджень встановлено, що у плазмі крові здорових добровольців В-, Н- та L-катепсиноподібна активність має низький рівень, при цьому її величина суттєво не залежить від статі. Визначення Н-катепсиноподібної активності у крові пацієнтів показало, що вона вища в усіх хворих (таблиця). За величиною цього підвищення у крові (мінімальне – на 79%, максимальне – на 166%) групи хворих із тиреоїдною патологією склали наступний ряд: хвороба Грейвса > еутиреоїдний вузловий зоб > папілярна карцинома > фолікулярна аденома = хронічний автоімунний тиреоїдит = змішаний токсичний зоб > токсична аденома > фолікулярна карцинома.

Найвищу Н-катепсиноподібну активність серед хворих з іншими ендокринними захворюваннями спостерігали у плазмі крові пацієнтів із феохромоцитомою (на 138%), менш значне підвищення – у крові хворих із феохромобластомою (на 72%) або гіперпаратиреозом (на 83%). Слід зазначити, що збільшений рівень ензиматичної активності у плазмі крові хворих з токсичною аденомою щитовидної залози, гіперпаратиреозом та феохромобластомою статистично не підтверджено у зв'язку з малою величиною вибірки та значними індивідуальними коливаннями величини показника.

В-катепсиноподібна активність у плазмі крові пацієнтів із різними захворюваннями щитовидної залози вища лише у разі вузлової патології – при еутиреоїдному вузловому зобі, змішаному токсичному зобі, токсичній аденомі, фолікулярній аденомі, папілярній чи фолікулярній карциномі (таблиця); в останньому

В-, Н- та L-катепсиноподібна активність у плазмі крові здорових осіб та хворих із захворюваннями щитовидної, паращитовидних і надниркових залоз

Характеристика груп обстежених	Катепсиноподібна активність					
	В-, мкмоль паранітроаніліну/год/мл		Н-, мкмоль паранітроаніліну/год/мл		L-, ум. од. абсорбції/год/мл	
	n	M ± m	n	M ± m	n	M ± m
Практично здорові добровольці	11	18,4 ± 2,82	10	29,0 ± 5,49	12	0,714 ± 0,129
Хворі: з вузловим еутиреоїдним зобом	25	36,2 ± 4,25*	26	72,2 ± 7,23*	21	1,281 ± 0,117*
з дифузним токсичним зобом	18	26,4 ± 3,78	21	76,9 ± 8,47*	20	1,181 ± 0,143*
зі змішаним токсичним зобом	10	31,8 ± 4,82*	11	64,4 ± 6,92*	9	0,784 ± 0,207
з токсичною аденомою	3	33,7 ± 6,95*	5	58,4 ± 17,9	5	1,184 ± 0,196*
із хронічним автоімунним тиреоїдитом	3	24,5 ± 2,37	4	65,5 ± 9,91*	3	0,457 ± 0,086
з фолікулярною аденомою	13	43,0 ± 10,8*	16	66,0 ± 8,0*	14	0,989 ± 0,137
з папілярною карциномою	59	30,7 ± 3,26*	64	69,7 ± 4,35*	57	1,101 ± 0,090*
прооперовані, з метастазами папілярної карциноми	8	18,6 ± 4,28	8	50,3 ± 5,25*	8	0,811 ± 0,158
з фолікулярною карциномою	3	38,7 ± 14,8	4	52,0 ± 4,69*	4	1,175 ± 0,208
з гіперпаратиреозом	4	31,8 ± 5,75	4	35,5 ± 8,53	4	0,212 ± 0,031*
з доброякісною пухлиною кори надниркових залоз	14	21,4 ± 5,89	14	64,3 ± 7,92*	11	0,667 ± 0,185
зі злякливою пухлиною кори надниркових залоз	4	17,9 ± 8,35	5	53,6 ± 9,68*	4	0,508 ± 0,179
з феохромоцитомою	7	29,7 ± 3,43*	6	67,7 ± 17,3*	6	0,246 ± 0,115*
з феохромобластомою	3	49,1 ± 13,9*	3	50,0 ± 19,4	3	0,992 ± 0,306

*Різниця порівняно з ензиматичною активністю у плазмі крові здорових осіб вірогідна ($P < 0,05$)

разі підвищення не підтверджене статистично. За хвороби Грейвса, хронічного автоімунного тиреоїдиту, та у разі наявності метастазів папілярної карциноми у хворих, в яких сама пухлина була вже видалена раніше, рівень ензиматичної активності у плазмі крові вірогідно не відрізнявся від такого у здорових осіб. Серед інших захворювань слід зазначити підвищення В-катепсиноподібної активності у плазмі крові хворих із доброякісними та злоякісними пухлинами мозкового шару надниркових залоз, проте як у хворих із гормонально неактивними пухлинами кори надниркових залоз та у разі гіперпаратиреозу вона залишається на рівні здорових осіб.

Вища за норму L-катепсиноподібна активність спостерігається у плазмі крові хворих із еутиреоїдним вузловим зобом, хворобою Грейвса, токсичною аденомою та папілярною карциномою (таблиця). У плазмі крові хворих зі змішаним токсичним зобом, хронічним автоімунним тиреоїдитом та фолікулярною аденомою ензиматична активність не змінюється, а у плазмі крові хворих із фолікулярною карциномою її підвищення не підтверджується статистично. Слід зазначити, що збільшення L-катепсиноподібної активності у плазмі крові хворих з іншими ендокринними захворюваннями не відбувається, більш того, у хворих із гіперпаратиреозом та із феохромоцитомою ензиматична активність виявляється нижчою, ніж у здорових осіб.

Отже, зважаючи на дані, одержані в ході дослідження, треба погодитися з думкою деяких дослідників про те, що зміни Н-катепсиноподібної активності у крові є маркером (за будь-якої патології, що супроводжується тканинним ростом) особливого стану організму, який пов'язаний з реорганізацією метаболічних циклів [16]. Кров пацієнтів саме з такими захворюваннями ендокринних залоз і досліджувалась нами. У хворих, прооперованих з приводу карциноми щитовидної залози, за наявності метастазів пухлини Н-катепсиноподібна активність залишається підвищеною, тоді як В- та L-катепсиноподібна активність, підвищена у хворих з карциномою, після операції повертається до значень її у здорових людей.

Водночас виявлено певну різницю у зміні В- та L-катепсиноподібної активності залежно

від патології. Привертає увагу той факт, що висока В-катепсиноподібна активність у плазмі крові хворих із захворюваннями щитовидної залози зафіксована виключно у разі вузлових форм тиреоїдної патології. Проте не знайдено будь-яких особливостей змін ензиматичної активності, які б могли бути суттєвими для характеристики чи уточнення діагнозу захворювання, зокрема в питанні: доброякісний чи злоякісний характер патологічного процесу. Характер змін L-катепсиноподібної активності не виявляє такої закономірності: підвищення ензиматичної активності спостерігали не при всіх вузлових формах тиреоїдної патології (еутиреоїдний вузловий зоб, токсична аденома, папілярна чи фолікулярна карцинома, але не змішаний токсичний зоб чи фолікулярна аденома), а також і при дифузних патологічних змінах у залозі (хвороба Грейвса). Величина обох показників у плазмі крові хворих із автоімунним тиреоїдитом та хворих із метастазами папілярної карциноми, яку видалено в них раніше, зафіксована на рівні такої у здорових осіб. Про незмінену загальну активність цистеїнових катепсинів у сироватці крові хворих з автоімунним тиреоїдитом свідчать також дані інших дослідників [18]. При захворюваннях надниркових залоз зміни В- та L-катепсиноподібної активності спостерігаються тільки у хворих з пухлинами мозкового шару: В-катепсиноподібна активність зростає у плазмі крові хворих як із доброякісними, так і злоякісними пухлинами, а L-катепсиноподібна активність зменшується за наявності доброякісної пухлини із хромафінної тканини.

Таким чином, одержана картина змін ензиматичної активності у плазмі крові хворих з тиреоїдними захворюваннями не дозволяє однозначно вважати, що визначення В- та L-катепсиноподібної активності у крові можна рекомендувати як метод додаткової оцінки під час встановлення чи уточнення діагнозу. Виявлені особливості змін катепсиноподібної активності у крові хворих з пухлинами надниркових залоз можуть свідчити про різну роль цистеїнових катепсинів В та L у пухлинній трансформації клітин кори та мозкового шару цих залоз.

**В-, Н- И L-КАТЕПСИНОПОДОБНАЯ
АКТИВНОСТЬ В ПЛАЗМЕ КРОВИ
ПАЦИЕНТОВ С ЗАБОЛЕВАНИЯМИ
ЩИТОВИДНОЙ,
ПАРАЩИТОВИДНЫХ ЖЕЛЕЗ
И НАДПОЧЕЧНИКОВ**

*Е. В. Калиниченко, Т. М. Мишунина,
Н. Д. Тронько*

ГУ «Институт эндокринологии и обмена веществ
им. В. П. Комиссаренко АМН Украины», Киев;
e-mail: mishunina@list.ru

В плазме крови больных с различными заболеваниями щитовидной, паращитовидных желез и надпочечников исследовали В-, Н- и L-катепсиноподобную активность по отношению к N α -бензоил-D,L-аргинин-4-нитроанилиду, L-лейцин-4-нитроанилиду та азоказеину соответственно. Показано, что в плазме крови больных с указанными заболеваниями имеет место повышение Н-катепсиноподобной активности, что подтверждает мнение о том, что при любой патологии, которая сопровождается тканевым ростом, происходит активация секреции катепсина Н в кровь. Высокая В-катепсиноподобная активность в плазме крови больных с заболеваниями щитовидной железы отмечена исключительно при узловых формах тиреоидной патологии, тогда как характер изменений L-катепсиноподобной активности при этих заболеваниях не является таким закономерным. При заболеваниях надпочечников изменения В- и L-катепсиноподобной активности наблюдали только в плазме крови больных с опухолями мозгового слоя, но не коры желез: В-катепсиноподобная активность была повышенной в плазме крови с доброкачественными или злокачественными опухолями, а L-катепсиноподобная активность сниженной в случае доброкачественной опухоли из хромоаффинной ткани. Изучение изменений энзиматической активности в плазме крови больных не дает оснований считать, что определение В- та L-катепсиноподобной активности в крови можно рекомендовать для получения дополнительной информации при диагностике заболеваний щитовидной железы.

Ключевые слова: цистеиновые катепсины В, Н, L, патология щитовидной, паращитовидных желез и надпочечников, кровь.

**В-, Н- AND L-CATHEPSIN-LIKE
ACTIVITY IN BLOOD PLASMA
OF PATIENTS WITH DISEASES
OF THYROID, PARATHYROID AND
ADRENAL GLANDS**

*O. V. Kalinichenko, T. M. Myshunina,
M. D. Tronko*

State Institution «Komissarenko Institute
of Endocrinology and Metabolism,
Academy of Medical Sciences of Ukraine», Kyiv;
e-mail:mishunina@list.ru

S u m m a r y

В-, Н- and L-catepsin-like activity regarding N α -benzoyl-D,L-arginine-4-nitroanilide, L-leucine-4-nitroanilide and azocasein was studied in the blood plasma of patients with different diseases of thyroid, parathyroid and adrenal glands. It has been shown that the high Н- catepsin-like activity confirming the activation of blood catepsin Н secretion accompanied by the tissue growth under any pathology took place in the blood plasma of patients with all the above diseases. High В- catepsin-like activity in the blood plasma of patients with thyroid diseases was exceptionally fixed under the nodular forms of thyroid pathology, while the character of changes in L catepsin-like activity under these diseases was not so natural. In diseases of the adrenal glands the changes in the В- and L-catepsin-like activity were only shown in the blood plasma of patients with cerebral layer tumors but not the gland cortex: В-catepsin-like activity increased in the blood plasma of patients with benign or malignant tumors, and L-catepsin-like activity decreased under benign tumor from chromaffin tissue. The established picture of changes in enzymatic activity in the blood plasma of patients does not allow to think that the determination of blood В- and L- catepsin-like activity can be recommended for obtaining additional information at diagnosis thyroid diseases.

Key words: cysteinic cathepsins В, Н, L, pathology of thyroid, parathyroid and adrenal glands, blood.

1. Gocheva V. // Cell Cycle. – 2007. – 6. – P. 60–64.
2. Веремеенко К. Н., Голобородько О. Л., Кизим А. И. Протеолиз в норме и при патологии / К.: Здоров'я, 1988. – 200 с.

3. Ефремов А. В., Руюткина Л. А., Цыганкова О. В., Бондарева З. Г. // Патол. физиол. и эксперим. терап. – 2007. – № 1. – С. 18–21.
4. Assfalg-Machleidt I., Johum M., Nast-Kolb D. et al. // Hopple-Seyler. Z. Physiol. Chem. – 1990. – Bd. 371. – S. 221–222.
5. Mort J., Leduc M., Recklies A. // Biochim. Biophys. Acta. – 1983. – 755. – P. 369–375.
6. Recklies A., Tiltman K., Stoker T., Poole A. // Cancer Res. – 1980. – 40. – P. 550–556.
7. Recklies A., Poole A., Mort J. // Biochem. J. – 1982. – 207. – P. 633–636.
8. Starkey P. // Biochem. Soc. Trans. – 1973. – 1. – P. 381–382.
9. Leto G., Tumminello F., Pizzolanti G. et al. // Pancreas. – 1997. – 14. – P. 22–27.
10. Чорна В. І., Лянна О. Л., Хворостенко М. І., Бразалук О. В. // Вісн. Львів. ун-ту. – 2008. – Вип. 47. – С. 58–62.
11. Strojjan P., Budihna M., Smid L. et al. // Neoplasma. – 2001. – 48. – P. 66–71.
12. Лянна О. Л., Хворостенко М. І., Чорна В. І. // Укр. радіол. журн. – 2008. – № 3. – С. 314–316.
13. Kos J., Stabuc B., Schweiger A. et al. // Clin. Cancer Res. – 1997. – 3. – P. 1815–1822.
14. Nishida Y., Kohno K., Kawatata T. // Gynecol Oncol. – 1995. – 56. – P. 357–361.
15. Staack A., Koenig F., Daniltchenko D. et al. // Urology. – 2002. – 59. – P. 308–312.
16. Жлоба А. А., Дунаевский В. А. // Вопр. онкол. – 1996. – № 1. – С. 70–76.
17. Халикова Т. А., Потеряева О. Н., Поспелова Т. И., Короленко Т. А. // Гематол. и трансфузиол. – 2004. – № 4. – С. 18–27.
18. Курпиченюк Л. Н., Гидранович Л. Г., Шиленок В. Н. // Вопросы мед. химии. – 2000. – № 5. – С. 518–519.
19. Barret A., Kirschke H. / In: Methods in enzymology. Ed.: L. Loran. New-York, London: Academic Press. – 1981. – 80. – P. 535–561.

Отримано 19.02.2010