

УДК 612.82.015.13:577.2

## АКТИВНОСТЬ КАТЕПСИНА В В ОПУХОЛЕВОЙ ТКАНИ РЕПРОДУКТИВНЫХ ОРГАНОВ ЖЕНЩИН

*Чернадчук С.С., Вовчук И.Л.*

Установлен оптимум рН катепсина В в образцах карциномы эндометрия – 6,0, в опухолях молочной железы – 5,5. Обнаружена обратнопропорциональная зависимость между степенью дифференциации злокачественных клеток эндометрия и активностью данного фермента и увеличение активности катепсина В при развитии в молочной железе пролиферативной формы фиброзно-кистозной болезни.

Ключевые слова: катепсин В, молочная железа, эндометрий.

Низкий уровень диагностики опухолей репродуктивных органов женщин приводит как к увеличению заболеваемости злокачественными новообразованиями и к высокой смертности, которая занимает лидирующее положение в статистике злокачественных новообразований органов [1].

Средний показатель заболеваемости раком тела матки по Украине составляет 23,0 случая на 100 тыс. женщин [2]. По данным Статистического управления Украины в структуре онкоболезней рак эндометрия составляет 6,7%, а среди злокачественных опухолей малого таза занимает первое место [3]. За последние 10 лет заболеваемость раком молочной железы увеличилась почти в 2 раза, что составляет сегодня 51,3 случая на 100 тыс населения [4].

Характерным признаком злокачественности опухолей является их способность к образованию метастатических узлов в других тканях. Определяющим процессом при этом является лизис внеклеточного матрикса, осуществляемый протеолитическими ферментами [5;6].

Поскольку протеолитический потенциал клеток в значительной степени определяется лизосомальным аппаратом, исследование этих эндопептидаз представляет немалый интерес.

Протеолитические ферменты играют особую роль в жизнедеятельности человека и животных. Они принимают участие не только в обмене молекул белков, деградации аномальных белков, пополнении аминокислотного пула клеток, но и в регуляторных процессах - активации проферментов, прогормонов, пролиферации и трансформации клеток [7;8], в морфогенезе, межклеточных взаимодействиях, миграции клеток, патогенности вирусов, оплодотворении, обмене соединительной ткани и др. [9].

В норме существует динамическое равновесие между протеолитическими ферментами и их ингибиторами, которое нарушается при различных патологических состояниях, одним из которых является процесс опухолеобразования [10].

На активность ряда протеиназ, обладающих чувствительностью к изменениям рН, могут оказывать влияние различия в рН разных участков тканевого микроокружения [11].

В процессе пролиферации и инвазии участвует 4 класса протеолитических ферментов: сериновые, аспартильные, металлопротеиназы и цистеиновые [9]. Наиболее изученными являются представители первых трех классов, функция которых заключается в деградации белков внеклеточного матрикса. Роль цистеиновых протеиназ в процессах канцерогенеза до настоящего времени остается малоисследованной.

Цистеиновые лизосомальные протеиназы ( катепсины В, Н, L, S) весьма похожи на папаин - мономерную протеиназу с молекулярной массой около 25 кДа. Возможно, что они эволюционно образовались путем мутации общего гена. В этих ферментах присутствуют остатки высококонсервативного цистеина ( цис-25 в папаине ), а также необходимого для активности - гистидина ( гис - 159 в папаине ) [12].

Некоторые авторы считают, что при злокачественном росте активируются не все протеиназы, а только некоторые, например катепсин В, специфичный для многих локализаций рака [13]. Так, например, в сыворотке крови у больных женщин с диагнозом рак шейки матки и влагалища, активность катепсина В оказалось в 45 раз выше, чем у здоровых женщин [14]. Однако его физиологическое значение до конца не выяснено.

В связи с этим цель настоящего исследования состояла в изучении активности цистеиновой протеиназы - катепсина В в опухолевой ткани репродуктивных органов женщин.

#### **Материал и методы исследования**

Исследования проводили с образцами резекцированной опухолевой ткани репродуктивных органов женщин, не получавших до операции медикаментозного лечения. В супернатанте определяли активность катепсина В (по гидролизу синтетического субстрата – п-бензоил-р-нитроанилида (БАПНА), по методу Erlangera et al.) и содержание белка по методу Лоури [15;16]. В связи с тем, что методика была апробирована не на коммерческом препарате катепсина В (или папаине), а на crude экстракте мы подавляли активность других протеиназ с помощью синтетических и природных ингибиторов. Для подавления сериновых протеиназ использовали ингибитор Кунитца, выделенный из сои; для подавления металлопротеиназ — ЭДТА; для восстановления дисульфидных связей в молекулах катепсина В - дитиотреитол ( ДТТ). Активность фермента выражали в условных единицах за 4 часа инкубации при 37°C при 382,5 нм на 1 мг белка. Результаты были обработаны с применением t-критерия Стьюдента.

### Результаты и их обсуждение

На первом этапе наших исследований мы разработали оригинальную методику определения активности катепсина В в образцах карциномы различных репродуктивных органов женщин. В результате проведенных исследований нами было установлено (рис. 1), что оптимум рН данного фермента, за исключением рака молочной железы, находится при рН 6,0, что совпадает с результатами других исследователей [17]. Для образцов молочной железы данное значение находится при рН 5,5, что может быть объяснено тканевой специфичностью данного объекта исследований.

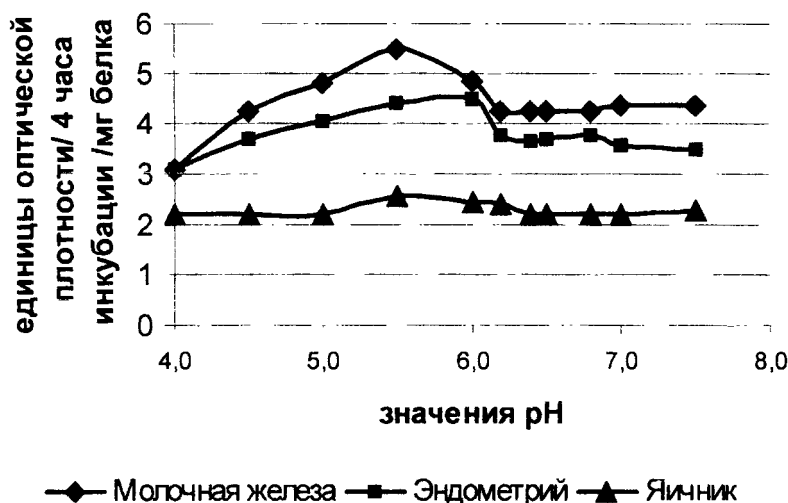


Рис. 1. Активность катепсина В при различных значениях рН

Исследование активности катепсина В в опухолевой ткани молочной железы (рис.2) показало, что наибольшая активность данного фермента определяется в образцах интенсивнопролиферирующих опухолей. Так, активность катепсина В была в 2,5 раза выше в образцах пролиферирующей фиброзно-кистозной опухоли по сравнению с непролиферирующей формой, что свидетельствует об участии данного фермента в обеспечении гиперпластических процессов.

По мнению некоторых авторов, пролиферирующая форма фиброзно-кистозной болезни является переходной формой между доброкачественными и злокачественными опухолями [18]. В пользу этого предположения свидетельствует тот факт, что активность катепсина В остается такой же высокой при 0 стадии развития рака молочной железы (cancer in situ). Дальнейшее развитие злокачественной опухоли характеризуется снижением активности катепсина В 2-3 раза, по сравнению с переходными формами рака молочной железы и постепенным увеличением активности

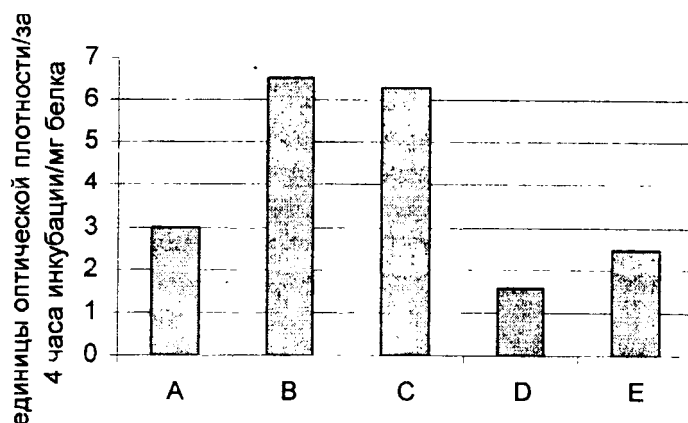


Рис.2. Активность катепсина В в ткани доброкачественных и злокачественных опухолей молочной железы (n=10)

- A - фиброзно-кистозная болезнь (не пролиферирующая форма)
- B - фиброзно-кистозная болезнь (пролиферирующая форма)
- C - cancer in situ (0 стадия)
- D - cancer (I-II стадия)
- E - cancer (II-III стадия)

фермента на II-III стадии развития опухоли.

Аналогичная тенденция была нами обнаружена при исследовании активности катепсина В в образцах аденокарциномы эндометрия (рис.3). Максимальная

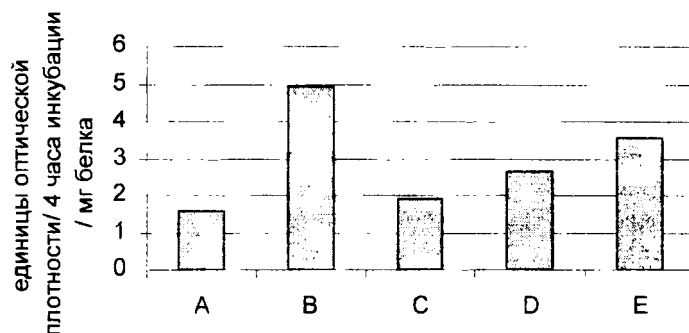


Рис. 3. Активность катепсин-В подобных протеиназ в ткани аденокарциномы эндометрия при различной степени дифференциации опухолевых клеток (n= 10).

- A- гиперплазия
- B- аденоматоз (cancer in situ)
- C- высокодифференцированная аденокарцинома
- D- умереннодифференцированная аденокарцинома
- E- низкодифференцированная аденокарцинома

---

активность данного фермента ( в 2 – 3 раза превышающая значения катепсина В при других стадиях развития опухоли) была обнаружена в образцах при аденоматозе, который по мнению многих авторов является 0 стадией развития злокачественной опухоли или. cancer in situ [18]. Нами была также обнаружена обратнопропорциональная зависимость между степенью дифференциации опухоли и активностью данного фермента в тканях аденокарциномы эндометрия (рис.3) По мере снижения степени дифференциации активность фермента значительно повышается, но ее уровень активности остается ниже, чем при интенсивном пролиферативном процессе.

### **Выводы**

Полученные нами результаты свидетельствуют о значительной роли катепсина В в процессах неотрансформации, особенно на этапах пролиферации и метастазирования, и могут иметь диагностическое и прогностическое значение для профилактики и лечения злокачественных новообразований.

### **Список литературы**

1. Cancer incidence in five continents // International Agency for Research on Cancer. – Lyon. – 1982. – P. 112.
2. Федоренко З.П., Тобілевич В.П., Міщенко А.Н., Гулак Л.О. // Розповсюдженість новоутворень у популяції України в 1991 – 1996 р. Епідеміологія та організаційні аспекти проблеми. – Київ, 1997. – С. 35 – 40.
3. Злоякісні новоутворення в Україні 1993-1994 р. р. - Київ. - 1999. - С. 15 – 17.
4. Тарутинов В.И. Рак молочной железы // Лікування та діагностика. 1998. – № 2. - С. 22.
5. Синицын И.Ф., Колесников Ю.Н., Тоскин К.Д. Активность панкреатических ферментов в крови и моче при опухолях различных локализаций // Вопросы онкологии. 1978. - № 10. - С. 46 – 49.
6. Сологуб Л.І., Пашковська І.С., Антоняк Г.Л. Протеази клітин та їх функції. - Київ: Наукова думка. - 1992. - 195 с.
7. Веремеенко К.Н., Кизим А.И. О наличии двух ингибиторов трипсина в сыворотке крови человека // Биохимия. - 1964. - 29, вып. 1. - С. 132 – 137.
8. Палладин А.В., Белик Я.В., Полякова Н.М. Белки головного мозга и их обмен. - Киев: Наукова думка. - 1972. - 316 с.
9. De Clerk Y.A., Jemren S. Protease inhibitors: role and potential therapeutic use in human cancer // Eur. J. Cancer. - 1994. - 30 A. N 14. – P.2170 – 2180.
10. Веремеенко К.Н. Протеолитические ферменты и их ингибиторы. Новые области применения в клинике // Врачебное дело. - 1994. № 1. - С. 8-13.
11. Sordat B., Piffaretti J., Weiss L. // Invasion Metastasis. - 1990. - Vol. 10. - P.178 – 192.
12. Веремеенко К.Н., Заболотный Д.И., Кизим А.И. Роль протеолиза в инвазии и метастазировании злокачественных опухолей // Журн. АМН Украины. – Т.8. – №2. – С. 217 – 237.
13. Sloane B., Rozhin J., Hatfield J., Crissman G., Honn K. Plasma membrane associated cysteine proteinases in human and animal tumors // Expl. Biol. – 1987. – Vol.55. – N4. – P. 209 – 224.

14. Pietras R.I., Szego C., Momgan C.E., Seeler B.I., Burtnett M. Elevated serum cathepsin B-like activity in women with neoplastic disease // *Gynecol. Oncol.* – 1979. – Vol. 7 – P. 1 – 20.
15. Erlanger B. et all. The preparation endopeptidases of two new chromogenic substrates of trypsin // *Arch. Biochtm. Biophys.* – 1961. – №95. – P. 271 – 278.
16. Lowry O.H. et all. Protein measurement with the Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* – 1951. – Vol. 193. – P. 265 – 275.
17. Черная В.И., Рева А.Д. Активность катепсина Н в мозге и опухолях мозга человека // *Укр. биох. журн.* – 1989. – Т.61. – №5. – С. 47 – 50.
18. Трапезников Н.Н., Побудная И.В. Справочник по онкологии. - М.: Каппа, 1996. – С. 376 – 389.

Поступила в редакцию 19.03.2003 г.