

УДК 577.152.34:616.006

И. Л. Вовчук, канд. биол. наук, доцент
Одесский национальный университет им. И. И. Мечникова,
кафедра биохимии,
ул. Дворянская 2, Одесса, 65026. Украина,
Тел: (0482) 68-78-75, e-mail: irvov@mail.ru

АКТИВНОСТЬ КАТЕПСИН-L-ПОДОБНЫХ ПРОТЕИНАЗ В ТКАНЯХ И НОВООБРАЗОВАНИЯХ ЯИЧНИКОВ ЖЕНЩИН

Исследована активность катепсин-L-подобных протеиназ (в дальнейшем катепсин L) в немалигнизированном яичнике и в тканях доброкачественных и злокачественных новообразований яичников. Установлено, что в доброкачественных новообразованиях активность катепсина L увеличивается в зависимости от пролиферативного потенциала трансформированных клеток яичника. Максимальное увеличение активности катепсина L обнаружено в злокачественной эпителиальной опухоли яичника — цисаденокарциноме.
Ключевые слова: катепсин L, яичник, опухоль.

Способность опухолевых клеток при инвазии в окружающие ткани вызывать частичную деградацию соединительнотканых структур реализуется за счет активности ряда протеиназ: цистеиновых, сериновых, аспарагиновых и металлопротеиназ. Известно, что трансформированные клетки синтезируют протеиназы, которые обеспечивают прогрессирование опухоли и инвазирование на различных этапах онкогенеза [1].

Состав ферментов в нормальных и опухолевых клетках отличается как по количественному так и по качественному (изоферментному составу), что связано с перераспределением генной экспрессии на определенных этапах жизни как нормальной, так и опухолевой клетки. При многих формах новообразований, происходят нарушения в системе клеточного протеолиза, которые проявляются повышением активности лизосомальных ферментов в тканях опухоли [2, 3, 4], что позволило назвать некоторые из этих ферментов опухолеассоциированными. Так как высокие уровни катепсинов и снижение содержания их эндогенных ингибиторов были установлены в злокачественных новообразованиях молочной железы, желудка и простаты [4], эти ферменты были предложены в качестве биологических маркеров злокачественности опухолей и как прогностические маркеры болезни [5].

Изменения уровня цистеиновых протеиназ, нарушения процессинга и клеточной локализации этих ферментов обнаружены в опухолевых тканях различных форм рака человека [2, 5]. При злокачественных опухолях различной локализации повышенный

уровень катепсина L в опухолевой ткани обычно связывают с плохим прогнозом [2, 5, 6].

Было также показано, что высокие уровни катепсина L в цитозоле опухолевых клеток карциномы, первичного рака молочной железы [4, 7] и опухолевой ткани рака яичников [8] положительно коррелируют с метастазированием в лимфатические узлы.

Цель исследования состояла в изучении активности катепсин-L-подобных протеиназ (катепсина L) в немалигнизированном яичнике и в тканях новообразований яичников женщин с учетом их возраста.

Материалы и методы

Исследовали гомогенаты немалигнизированного яичника и образцы тканей доброкачественных и злокачественных новообразований яичников, полученных операционным путем у женщин, которые не получали дооперационного медикаментозного лечения.

Образцы тканей гомогенизировали в 0,9% растворе NaCl (в соотношении 1:10) и центрифугировали при 12000 об/мин при +4°C на протяжении 45 мин.

Патоморфологические диагнозы были верифицированы по международной классификации ВОЗ с определением морфологического состояния и степени дифференцировки трансформированных клеток опухолевой ткани [9].

В супернатанте образцов ткани яичников определяли активность катепсина L по гидролизу 1% азоказеина (рН 6,0) [10] и содержание белка — по методу Lowry [11].

Оптическую плотность определяли при длине волны 570 нм, относительную активность фермента выражали в ммольях тирозина на мг сырой массы ткани за мин инкубации при 37°C, удельную активность — в мкмольях тирозина на мг белка.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью критерия Стьюдента [12].

Результаты исследования и их обсуждение

Установлено, что в онтогенезе человека реализуются переключения одних изозимных систем на другие, что особенно заметно в процессе геронтогенеза.

Так, например, выяснилось, (табл. 1), что в тканях яичников без новообразований активность катепсин-L-подобных протеиназ максимальна у женщин позднего репродуктивного периода (41–50 лет).

Важно было выяснить, существуют ли общие и специфические закономерности количественных и качественных изменений функционирования систем протеолитических ферментов при доброкачественных и злокачественных заболеваниях репродуктивной системы женщин.

Наличия доброкачественных или злокачественных новообразований в тканях яичников характеризовались значительным увеличением активности катепсин-L-подобных протеиназ (табл. 1), что свидетельствует о неспецифической ответной реакции организма на процесс неотрансформации.

Таблица 1
Активность катепсина L в немалигнизированной и опухолевых тканях яичников в разные физиолого-возрастные периоды женщин (мкмоль/мг белка в мин)

Физиолого-возрастные периоды	Немалигнизированная ткань	Доброкачественная опухоль	Злокачественная опухоль
Репродуктивный период (31-40 лет)	0.41±0.03 (n = 25)	0.58±0.06* (n 11)	0.72±0.06* (n 11)
Поздний репродуктивный период (41-50 лет)	0.60±0.05* (n = 25)	0.45±0.04 (n=24)	0.63±0.06* (n=49)
Менопаузальный период (51-60 лет)	0.36±0.04 (n = 25)	0.44±0.04 (n=47)	0.46±0.04 (n=31)
Климактерический период (61-70 лет)	0.37±0.03 (n = 25)	0.46±0.04 (n=41)	0.44±0.03 (n=11)

Примечание: n — количество исследуемых женщин; * — достоверные ($P < 0,05$) различия активности исследуемых ферментов по сравнению с показателями женщин в возрасте 51–60 лет.

Наличие доброкачественного процесса в ткани яичников сопровождалось высокой активностью катепсин-L-подобных протеиназ у женщин в репродуктивный период (31–40 лет). Наличие злокачественного процесса в тканях яичников сопровождалось максимальной активностью катепсин-L-подобных протеиназ в репродуктивный период и поздний репродуктивный периода, по мере дальнейшего увеличения возраста женщин активность этих протеиназ снижалась (табл. 1).

В тканях доброкачественных новообразований наибольшая активность катепсин-L-подобных протеиназ была установлена в склеротически измененном яичнике (рис. 1).

Активность катепсин-L-подобных протеиназ увеличивалась по мере снижения степени дифференциации опухолевых клеток эндометриальной карциномы яичников (рис. 1).

Данный факт свидетельствует о существовании различных механизмов регуляции ферментов при развитии доброкачественных и злокачественных новообразований в тканях яичников, в частности о наличии ингибиторного контроля. Кроме того, изменение активности эндопептидаз в тканях репродуктивных органов по мере развития опухоли может быть связано с изменением скорости метаболических процессов в данных органах, нарастанием эндокринно-обменных нарушений, прогрессией иммуносупрессии и др. [13, 14, 15].

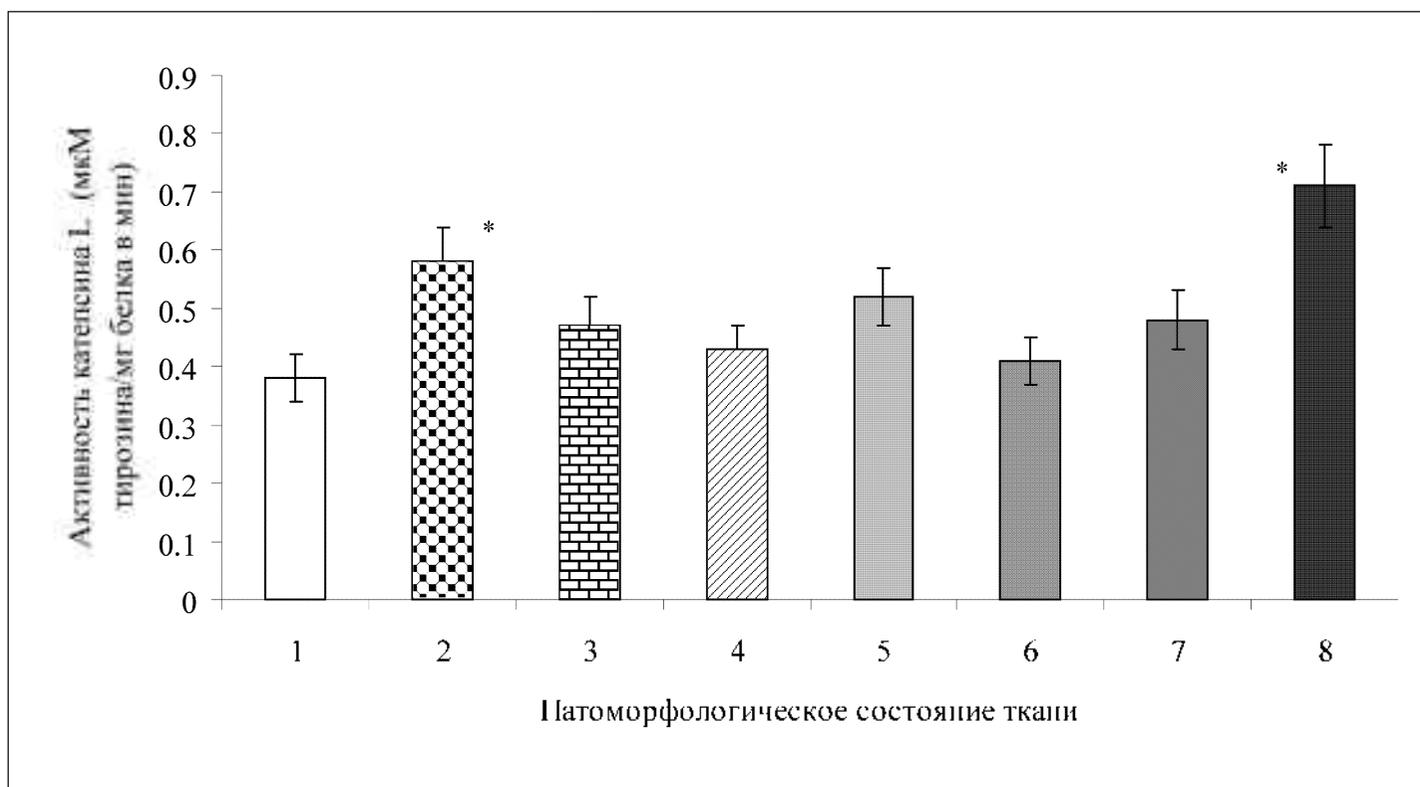


Рис. 1. Активность катепсин L-подобных протеиназ в ткани яичников

Примечание: * — $P < 0,05$ по отношению к ткани без новообразований: 1 — ткань немалигнизированного яичника (n=100); 2 — рубцовый склероз (n=48); 3 — киста (n=21); 4 — рубцовые белые тела (n=22); 5 — цисаденома — доброкачественная опухоль (n=37); 6 — высокодифференцированная цисаденокарцинома (n=17); 7 — умереннодифференцированная цисаденокарцинома (n=46); 8 — низкодифференцированная цисаденокарцинома (n=24).

Повышение активности катепсин-L-подобных протеиназ при развитии доброкачественного патологического процесса в ткани яичников может свидетельствовать о прогрессировании данного процесса, который сопровождается нарушением морфологии ткани, стабильности клеточных и лизосомальных мембран.

Увеличение активности исследуемой цистеиновой протеиназы можно объяснить нарушением регуляции ее эндогенными ингибиторами — стефинами и цистатином, а дисбаланс этих компонентов может быть ассоциирован с развитием малигнизированного фенотипа клеток.

Кроме того, нарастание активности катепсина L в ткани яичника может сопровождаться усилением биосинтеза изучаемых протеиназ в результате действия эндогенных эстрогенов [16, 17, 18], снижением биосинтеза их эндогенных ингибиторов, а также активацией протеиназ под действием метаболитов опухоли.

Полученные результаты совпадают с результатами других исследователей и еще раз показывают, что вне зависимости от локализации опухоли и ее гисто-морфологического строения наличие новообразований в яичнике и их развитие сопровождаются увеличением активности катепсин-L-подобных протеиназ [19, 20, 21, 22, 23, 24].

Обнаруженные нами изменения активности катепсин-L-подобных протеиназ вполне корректны относительно прогрессирующей карциномы яичника [25] и карциномы желудка [8, 20], но отличаются от данных, полученных при исследовании опухолей других органов, [8, 20], что может свидетельствовать о тканеспецифичности реагирования этих ферментов на опухолевый процесс.

Сравнительная оценка степени увеличения активности исследуемых протеиназ в тканях доброкачественных и злокачественных опухолей свидетельствует об участии данных протеолитических ферментов в процессе малигнизации и пролиферации трансформированных клеток.

Полученные данные позволяют предположить, что в низкодифференцированных, быстроделющихся, бластоматозных клетках злокачественных опухолей происходит нарушение функций данных ферментов, необходимых для нормального процесса дифференциации клеток и тканей.

В этом случае функция исследуемых протеиназ направлена в основном на распад тканевых белков и обеспечение клеток опухолей свободными аминокислотами. В то же время в интенсивно растущих, но малотрансформированных процессом малигнизации клетках протеазы, по-видимому, продолжают выполнять характерные для них физиологические функции.

Выводы

1. Наличие доброкачественного и злокачественного процесса в ткани яичников женщин сопровождается повышением активности катепсин-L-подобных протеиназ.
2. В доброкачественных новообразованиях яичников активность катепсин-L-подобных протеиназ увеличивается в зависимости от пролиферативного потенциала трансформированных клеток яичника.
3. Максимальное увеличение активности катепсин-L-подобных протеиназ наблюдается в клетках низкодифференцированной цисаденокарциномы яичников.

Литература

1. Nomura T., Katunuma N. Involvement of cathepsins in the invasion, metastasis and proliferation of cancer cells // *J. Med. Invest.* — 2005. — Vol. 52, N 1-2. — P. 1-9.
2. Cathepsin B and its endogenous inhibitors: the role in tumor malignancy / B. F. Sloane, K. Moin, E. Krepela, J. Rozhin // *Cancer Metastasis Rev.* — 1990. — Vol. 9, N 4. — P. 333-352.
3. Expression of cathepsins B and L in human lung epithelial cells is regulated by cytokines / A. Gerber, T. Welte, S. Ansorge, F. Buhling // *Adv. Exp. Med. Biol.* — 2000. — Vol. 477. — P. 287-292.
4. Significance of cathepsin B and D in physiologic and pathologic processes / D. Olszewska, T. Drewa, R. Makarewicz, J. Drewa, A. Wozniak, R. Maciak // *Pol. Merkurusz. Lek.* — 2001. — Vol. 10, N 55. — P. 65-70.
5. Kos J., Lah T. T. Cysteine proteinases and their endogenous inhibitors: target proteins for prognosis, diagnosis and therapy in cancer (review) // *Oncol. Rep.* — 1998. — Vol. 5, N 6. — P. 1349-1361.
6. Lah T. T., Kos J. Cysteine proteinases in cancer progression and their clinical relevance for prognosis // *Biol. Chem.* — 1998. — Vol. 379, N 2. — P. 125-130.
7. Comparison of potential biological markers cathepsin B, cathepsin L, stefin A and stefin B with urokinase and plasminogen activator inhibitor-1 and clinicopathological data of breast carcinoma patients / N. Levicar, J. Kos, A. Blejec, R. Golouh, I. Vrhovec, S. Frkovic-Grazio, T. T. Lah // *Cancer Detect. Prev.* — 2002. — Vol. 26, N 1. — P. 42-49.
8. Cathepsin B and L activities in gastric cancer tissue: correlation with histological findings / M. Watanabe, T. Higashi, A. Watanabe, T. Osawa, Y. Sato, Y. Kimura, S. Tominaga, N. Hashimoto, Y. Yoshida, S. Morimoto // *Biochem. Med. Metab. Biol.* — 1989. — Vol. 42, N 1. — P. 21-29.
9. Хмельницкий О. К. Патоморфологическая диагностика гинекологических заболеваний. — С.Пб.: Сотис, 1994. — С. 155-300.
10. Черная В. И., Рева А. Д. Активность катепсина Н в мозге и опухолях мозга человека // *Укр. биохим. журн.* — 1989. — Т. 61, № 5. — С. 47-50.
11. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O. H. Lowry, N. I. Rosenbrough, A. Z. Fan, R. J. Randol // *J. Biol. Chem.* — 1951. — Vol. 193. — P. 265-275.
12. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика. Минск: Высшая школа, 1967. — 326 с.
13. Дильман В. М. Гормональные аспекты опухолей яичников // *Эндокрино-логическая онкология.* — Л.: Медицина, 1983. — С. 333-336.
14. Hansen L. J., Manghorkhanok/Mark M., Reddy J. Immunohistochemical localization of pancreatic exocrine enzymes in normal neoplastic pancreatic acinar epithelium of rat // *J. Histochem. Cytochem.* — 1981. — Vol. 29, N 2. — P. 309-313.
15. Matsumura Y., Maeda H., Kato H. Degradation pathway of kinins in tumor ascites and inhibition by kininase inhibitors: analysis by HPLC // *Agents Actions.* — 1990. — Vol. 29, N 3-4. — P. 172-180.

16. Rochefort H. Oestrogens, proteases and breast cancer. From cell lines to clinical application // Eur. J. Obster. Gynecol. Reprod.Biol. — 1999. — N 85. — P. 71-74.
17. Rochefort H., Cavailles V., Augereau P. Overexpression and hormonal regulation of pro-cathepsin D in mammary and endometrial cancer // J. Steroid Biochem. — 1989. — N 32. — P. 177-182.
18. Estrogen regulated proteases and antiproteases in ovarian and breast cancer cells / H. Rochefort, D. Chabos, S. Cunat, A. Lucas, N. Platet, M. Garcia // J. Steroid Biochem. Mol. Biol. — 2001. — Vol. 76, N 1-5. — P. 119-124.
19. Prognostic impact of cysteine proteases cathepsin B and cathepsin L in pancreatic adenocarcinoma / M. Niedergethmann, B. Wostbrock, J. W. Sturm, F. Willeke, S. Post, R. Hildenbrand // Pancreas. — 2004. — Vol. 29, N 3. — P. 204-211.
20. Cysteine and serine proteases in gastric cancer / M. Plebani, L. Herszenyi, R. Cardin, G. Roveroni, P. Carraro, M. D. Paoli, M. Rugge, W. F. Grigioni, D. Nitti, R. Naccarato // Cancer. — 1995. — Vol. 76, N 3. — P. 367-375.
21. Cathepsin L in glioma progression: comparison with cathepsin B / T. Strojnik, R. Kavalari, M. Trinkaus, T. T. Lah // Cancer Detect. Prev. — 2005. — Vol. 29, N 5. — P. 448-455.
22. Cathepsins B and L are markers for clinically invasive types of meningiomas / T. Strojnik, B. Zidanik, J. Kos, T. T. Lah // Neurosurgery. — 2001. — Vol. 48, N 3. — P. 598-605.
23. Prognostic value of the cysteine proteases cathepsins B and cathepsin L in human breast cancer / C. Thomssen, M. Schmitt, L. Goretzki, P. Oppelt, L. Pache, P. Dettmar, F. Janicke, H. Graeff // Clin. Cancer Res. — 1995. — Vol. 1, N 7. — P. 741-746.
24. Cathepsins B and L and their inhibitors stefin B and cystatin C as markers for malignant progression of benign meningiomas / M. Trinkaus, A. Vranic, V. Dolenc Vol., T. T. Lah // Int. J. Biol. Markers. — 2005. — Vol. 20, N 1. — P. 50-59.
25. Determination of cathepsin B expression may offer additional prognostic information for ovarian cancer patients / A. Scorilas, S. Fotiou, E. Tsiambas, J. Yotis, F. Kotsiandri, M. Sameni, B. F. Sloane, M. Talieri // Biol. Chem. — 2002. — Vol. 383, N 7-8. — P. 1297-1303.

И. Л. Вовчук

Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова, кафедра біохімії,
вул. Дворянська 2, Одеса, 65026, Україна. Тел.: (0482) 68-78-75; e-mail:
irvov@mail.ru.

**АКТИВНІСТЬ КАТЕПСИН-Л-ПОДІБНИХ ПРОТЕЇНАЗ В
ТКАНИНАХ І НОВОУТВОРЕННЯХ ЯЄЧНИКІВ ЖІНОК**

Резюме

Досліджено активність катепсин-Л-подібних протеїназ (катепсина L) в неураз-
жених тканинах, а також в доброякісних і злоякісних новоутвореннях яєчників.
Встановлено, що в доброякісних новоутвореннях активність катепсину L збільшується
залежно від проліферативного потенціалу трансформованих клітин яєчника. Мак-
симальне збільшення активності катепсину L встановлено в злоякісній епітеліальній
пухлині яєчника — цисаденокарциномі.

Ключові слова: катепсин L, яєчник, пухлина.

I. L. Vovchuk

Odessa National I. I. Mechnikov University, Department of Biochemistry
Dvoryanskaya str. 2, Odessa, 65026, Ukraine. Tel.: +38 0482 687875; e-mail:
irvov@mail.ru.

CATEPSINE L ACTIVITY IN WOMEN'S OVARIAN AND TUMOUR TISSUES

Summary

Catepsine L activity in benign and malignant ovarian tumour tissues has been investigated. It is established that in benign tumours the activity of catepsine L increases depending on proliferative potential of transformed ovarian cells. The maximal increasing of catepsine L activity is established in ovarian epithelial malignant tumour — cysadenocarcinoma.

Keywords: catepsine L, ovary, tumour.