УДК 612.015.13:152.34:611

О. Л. Лянна, к.б.н., доцент кафедри біохімії, медичної та фармацевтичної хімії
ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України»,
кафедра біохімії, медичної та фармацевтичної хімії.
пл. Жовтнева, 4, Дніпропетровськ, 49027, Україна,
моб. тел.: 067 567 30 86, e-mail: olga_313@mail.ru

АКТИВНІСТЬ ЦИСТЕЇНОВИХ КАТЕПСИНІВ У ТКАНИНАХ ТА БІОЛОГІЧНИХ РІДИНАХ ХВОРИХ ІЗ ОНКОЛОГІЧНИМИ ЗАХВОРЮВАННЯМИ ГОЛОВНОГО МОЗКУ

При канцерогенезі головного мозку відбуваються зміни функціонального стану лізосомного апарату клітин організму, які проявляються у змінах рівнів активності досліджуваних ферментів: максимальний рівень активності катепсину L визначено у тканинах доброякісних пухлин; активність катепсину B зростає у тканинах пухлин зі ступенем злоякісності; встановлено зростання рівня активності катепсину L у сироватці крові хворих з менінгеомами та астроцитомами; визначено підвищені рівні активності усіх досліджуваних катепсинів у сечі хворих з менінгеомами та гліобластомами.

Ключові слова: цистеїнові катепсини, онкологічні захворювання головного мозку, плазма крові, сеча.

Перетворення нормальної клітини на інвазивну ракову з метастатичним потенціалом представляє собою процес, який складається з декількох стадій. Ці етапи розрізняються чіткими гістологічними та часовими періодами [10]. Передумовою для неопластичних клітин/капілярів та інвазії запальних клітин під час процесу канцерогенезу є ремоделюючі події, які мають місце в стромі або екстрацелюлярному матриксі (ЕЦМ) [8]. Кількісні зміни в матриксних компонентах можуть бути пов'язані з дисбалансом між їх синтезом та деградацією [9]. Ці процеси опосередковані дією протеолітичних ферментів і потребують скоординованої роботи протеїназ з різною специфічністю. Діють дані ферменти у суворому порядку згідно до черги активації [11]. Слід зазначити, що на особливу увагу заслуговують лізосомні цистеїнові протеїнази – катепсини. Їх роль у розвитку та перебігу патологічних станів всебічно вивчається. На сьогодні відомо, що в пухлинній клітині порушення функціонування катепсинів на одному чи більше рівнях призводить до підвищення їх мРНК та білкової експресії, підвищення активності та зміни внутрішньоклітинної локалізації [5]. Серед усіх лізосомних цистеїнових катепсинів катепсини B (КФ 3.4.22.1), H (КФ 3.4.22.16) та L (КФ 3.4.22.15) є найбільш потужними, активними та вивченими протеїназами у розвитку патологічних станів, зокрема канцерогенезу [12].

Метою роботи було визначення рівнів активності лізосомних цистеїнових катепсинів B, H та L у плазмі крові, сечі у здорових і хворих людей із доброякісними (доброякісні менінгеоми, невриноми, ангіоми) і злоякісними пухлинами головного мозку (гліобластоми, астроцитоми) до та після операції, а також у післяопераційному матеріалі хворих для з'ясування можливості застосування цього

© О. Л. Лянна, 2013

показника в якості інформативного показника пухлинної трансформації головного мозку людини.

Матеріали та методи дослідження

Матеріалом дослідження були: плазма крові та сеча хворих (віком 35–70 років) із пухлинами головного мозку (ангіома, невринома, менінгеома, астроцитома, гліобластома). В процесі виконання роботи було передбачено заходи щодо безпеки здоров'ю пацієнтів, дотримання їх прав та морально-етичних норм у відповідності до конвенції Ради Європи про права людини і біомедицини, Гельсінської декларації прав людини та відповідних законів України [1–3]. Матеріал для дослідження отримували до операції та через 1–3 тижня після операції у відділенні «Нейрохірургія» лікарні ім. І. І. Мечникова, там же пухлини типували за гістоструктурою, гістогенезом та ступенем злоякісності. Активність катепсину В у дослідних пробах встановлювали відносно субстрату N,α-бензоїл-D,L-аргініну-р-нітроаніліду (FluKa, Switzerland) і виражали в мкМ р-нітроаніліну за 1 хвилину на 1 мг білка [6]. Активність катепсину Н виявляли за гідролізом β-нафтіламіду L-лейцину (Лей-НА) «Koch-Light Laboratories» (Англія) за 120 хв інкубації при 37 ºС [6] з деякими модифікаціями [4]. Активність катепсину L визначали по відношенню до азоказеїну (1 %), денатурованого сечовиною (3,0 М) відповідно, в 1,0 мл інкубаційної суміші з 15 хв преінкубацією ферменту в присутності 2 мМ 2-меркаптоетанолу (2 МЕ) і 1 мМ Na_2EDTO, і виражали в умовних одиницях на 1 мг білка згідно з інтенсивністю екстинції при довжині хвилі 366 нм за 1 хв [12]. Вміст загальної кількості білка визначали за методом Бредфорд [7]. Статистичне опрацювання результатів виконували з використанням комп'ютерної програми Excel згідно до t--критерію Стьюдента.

Результати досліджень та обговорення

Результати дослідження активності цистеїнових катепсинів у післяопераційному матеріалі хворих із пухлинами головного мозку представлені на рис. 1.

Контрольну групу складали показники рівнів активності катепсинів В, Н та L, визначені в головного мозку без новоутворень людей, які загинули внаслідок нещасного випадку.

Встановлено, що активність катепсинів В, Н та L перевищує контрольні показники як при доброякісних, так і при злоякісних пухлинах головного мозку. Показано, що рівні активності катепсину В у післяопераційному матеріалі хворих із пухлинами головного мозку зростають зі ступенем злоякісності пухлини. При доброякісних пухлинах головного мозку активність катепсину В вдвічі більша ніж в контролі. В злоякісних пухлинах рівень активності ферменту у 4,5 разу перевищує контрольний показник та у 2,3 разу рівень активності в тканинах доброякісних пухлин.

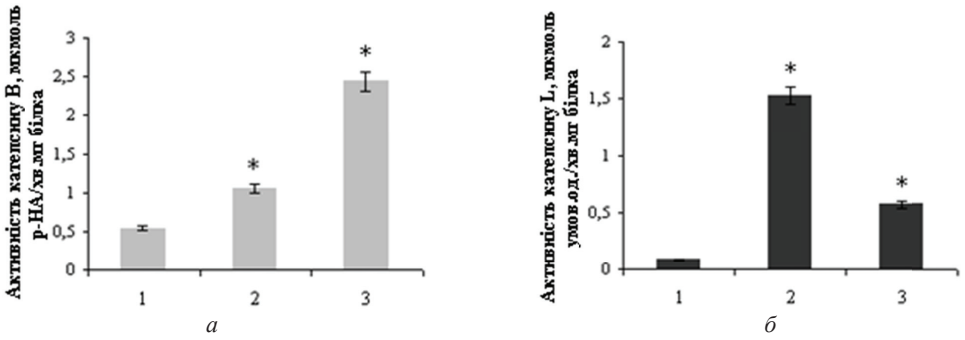

Рис. 1. Активність цистеїнових катепсинів В (а) та L (б) у пухлинах головного мозку (M±m):
1 – контроль (n=10); 2 – доброякісні пухлини (n=6); 3 – злоякісні пухлини (n=12).
* – $p < 0,05$ по відношенню до контролю.

Максимальний рівень активності катепсину L відмічено в тканинах доброякісних пухлин, який вірогідно перевищує контрольний показник у 18 разів. Рівень активності цього ферменту в тканинах злоякісних пухлин перевищує контрольне значення у 6,7 разу, але у 2,6 разу встановлений меншим, ніж у доброякісних пухлинах головного мозку.

У ході дослідження проводили визначення активності цистеїнових катепсинів в плазмі крові та сечі хворих із онкологічними захворюваннями головного мозку (ангіома, невринома, менінгеома, астроцитома, гліобластома), оскільки отримані результати можуть дати важливу інформацію про стан протеолізу організму за канцерогенезу головного мозку.

Контрольну групу складали показники рівнів активності катепсинів, визначені в плазмі крові (n=30) та сечі донорів (n=10). В плазмі крові донорів активність катепсинів В та Н не визначалась.

Згідно з отриманими результатами в плазмі крові хворих із онкологічними захворюваннями головного мозку активність катепсинів В та Н не відрізнялась від контрольних показників.

На рис. 2 представлені рівні активності лізосомної цистеїнової пептидгідролази катепсину L у плазмі крові хворих із пухлинами головного мозку.

Встановлено, що в плазмі крові хворих із доброякісними захворюваннями головного мозку вірогідні відмінності від контрольного показника виявлені лише при менінгеомах. Рівень активності катепсину L перевищував контрольний показник у 1,7 разу. При ангіомах та невриномах активність даної пептидгідролази не відрізнялась від контрольних показників.

У плазмі крові хворих зі злоякісними пухлинами головного мозку рівні активності катепсину L відрізнялись від контрольного показника як при астроцитомах, так і при гліобластомах. У плазмі хворих із астроцитомами активність ферменту вірогідно перевищувала у 3,5 разу контрольний показник, а при гліобластомах

рівень активності катепсину L в плазмі крові хворих встановлений у 4,8 разу менший ніж у плазмі донорів.

Результати досліджень рівнів активності цистеїнових катепсинів в сечі хворих із онкологічними захворюваннями головного мозку представлені в табл. 1. Встановлено, що в сечі хворих із доброякісними пухлинами, такими як ангіома та невринома, рівні активності катепсинів B, L, H вірогідно не відрізнялись від контрольних показників.

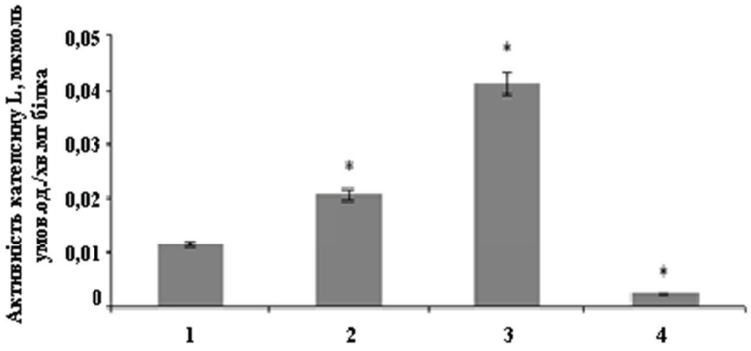

Рис. 2. Рівні активності катепсину L у плазмі крові хворих із онкологічними захворюваннями головного мозку (M±m): 1 – контроль (n=30), 2 – менінгеома (n=6), 3 – астроцитома (n=5), 4 – гліобластома (n=11). * – $p < 0,05$ по відношенню до контролю.

При доброякісних пухлинах головного мозку показано, що активність катепсинів L та H в сечі хворих у 7,7 та 1,45 разів перевищувала контрольний показник (табл. 1).

Таблиця 1

Активність цистеїнових катепсинів B, L, H в сечі хворих із онкологічними захворюваннями головного мозку (ВА, M±m)

Назва захворювання	Катепсин B	Катепсин L	Катепсин H
Контроль (n=10)	0	0	0
Ангіома (n=5)	0	0	0,1 ± 0,08
Невринома (n=5)	0	0	0
Менінгеома (n=6)	0,2 ± 0,1	7,7 ± 1,5 *	1,45 ± 0,5 *
Астроцитома (n=5)	6,36 ± 2,9 *	0	0
Гліобластома (n=11)	7,5 ± 3,3 *	3,2 ± 1,1*	2,05 ± 0,9 *

Примітка: * – $p < 0,05$ по відношенню до контролю; ВА – відносна активність.

В сечі хворих зі злоякісними пухлинами головного мозку рівні активності катепсину В вірогідно перевищували активність цього ферменту в контролі та при доброякісних пухлинах головного мозку. Показано, що активність катепсину В у сечі хворих зростає зі ступенем злоякісності пухлин. В сечі хворих із гліобластомами також встановлені вірогідні високі рівні активності катепсинів L та H. Показано, що активність катепсинів В та Н у сечі хворих із гліобластомами у 37,5 та 1,4 разів перевищувала показники активності цих ферментів при менінгеомах відповідно; активність катепсину L у сечі хворих із гліобластомами у 2,4 разу вірогідно менша, ніж у хворих із менінгеомами (табл. 1).

Отримані дані свідчать про те, що за канцерогенезу головного мозку відбуваються зміни функціонального стану лізосомного апарату клітин організму. Підвищення активності катепсину L в плазмі крові хворих може розглядатись як показник розвитку цитолітичних процесів у тканинах головного мозку за канцерогенезу. Пухлинна трансформація клітин викликає зміни протеолізу, пов'язані, ймовірно, із модифікацією мембран клітин головного мозку. Рівні активності цистеїнових катепсинів при онкологічних захворюваннях головного мозку можуть вказувати на порушення механізмів біологічного контролю за протеолітичною активністю пептидгідролаз, зокрема змінами інгібіторної регуляції.

Висновки

1. Визначення активності цистеїнових катепсинів у біологічних рідинах хворих може нести інформативний характер при діагностиці та моніторингу терапії онкологічних захворювань головного мозку.

2. Рівні активності лізосомних цистеїнових катепсинів В, L, Н визначено зміненими по відношенню до контрольних показників у досліджуваних біологічних рідинах (сироватка крові, сеча) хворих.

3. У післяопераційному матеріалі доброякісних пухлин головного мозку активність катепсину L вища, ніж при злоякісній трансформації клітин тканин головного мозку.

4. Рівень активності катепсину В у післяопераційному матеріалі хворих зі злоякісними пухлинами головного мозку зростає зі ступенем тяжкості захворювання.

5. Зроблено припущення, що за канцерогенезу головного мозку відмічається як дезорганізація мембран лізосом, так і наявність цитолітичних процесів у клітинах тканин, що призводить до вивільнення лізосомних цистеїнових катепсинів у кров, які за ймовірного порушення механізмів контролю протеолітичної активності в тканинах організму за канцерогенезу, проявляють надмірну активність.

Список використаної літератури

1. *Приказ МЗ* СССР (для Украины) №545 от 23.04.85г «О дальнейшем совершенствовании контроля качества лабораторных исследований».

2. *Конвенція* про захист прав і гідності людини щодо застосування біології та медицини: Конвенція про права людини та біомедицину, Ов'єдо, 4 квітня 1997 року, підписана Україною 22.03.2002 року.
3. *Хельсінська* декларація Всесвітньої медичної асоціації. – 1964 рік.
4. *Черная В. И.* Активность катепсина *Н* в мозге и опухолях мозга человека / В. И. Черная, А. Д. Рева // Укр. Биохим. Журн. – 1989. – Т. 5(61). – С. 47–50.
5. *Чорна В.І.* Лізосомні цистеїнові протеази: молекулярна структура і функції / В. І. Чорна, О. Л. Лянна– Харків: Екограф, 2013. – 296 с.
6. *Barrett A.* Cathepsin B, cathepsin H, and cathepsin L / A. Barrett, H. Kirschke // Methods Enzymol. – 1981. – Vol. 80. – P. 535–561.
7. *Bradford M. M.* A rapid and sensitive method for the quatitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M. M Bradford. // Anal. Biochem. – 1976. – 72. – P. 248–254.
8. *Jedeszko C.* Cysteine cathepsins in human cancer / C. Jedeszko, B. F. Sloane // Biol. Chem. – 2004. – Vol. 385. – P. 1017–1027.
9. *Mohamed M. M.* Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer / M. M. Mohamed, B. F. Sloane // Nature. – 2006. – Vol. 6. – P. 764–775.
10. *Repnik U.* Lysosomes and lysosomal cathepsins in cell death / U. Repnik, V. Stoka, V. Turk, B. Turk // Biochimica and Biophysica Acta. – 2012. – Vol. 1824. – P. 22–33.
11. *Skrzydlewska E.* Proteolytic-antiproteolytic balance and its regulation in carcinogenesis / E. Skrzydlewska, M. Sulkowska, M. Koda, S. Sulkowski // World J. Gastroenterol. – 2005. – Vol. 9(11). – P. 1251–1266.
12. *Turk B.* Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers / B. Turk, D. Turk, V. Turk // Biochim. Biophys. Acta. – 2000. – Vol. 1477. – P. 98–111.

О. Л. Лянная
ГУ «Днепропетровская медицинская академия МЗ Украины»,
кафедра биохимии, медицинской и фармацевтической химии
пл. Октябрьская, 4, Днепропетровск, Украина, 49027

АКТИВНОСТЬ ЦИСТЕИНОВЫХ КАТЕПСИНОВ В ТКАНЯХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ БОЛЬНЫХ С ОНКОЛОГИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Резюме
При канцерогенезе головного мозга происходят изменения функционального состояния лизосомного аппарата клеток организма, которое проявляется в изменениях уровней активности исследуемых ферментов: максимальный уровень активности катепсина L установлен в тканях доброкачественных опухолей; активность катепсина В возрастает в тканях опухолей со степенью злокачественности; установлено повышение уровня активности катепсина L в сыворотке крови больных с менингеомами и астроцитомами; установлены повышенные уровни активности всех исследуемых катепсинов в моче больных с менингеомами и глиобластомами.
Ключевые слова: цистеиновые катепсины, онкологические заболевания головного мозга, плазма крови, моча.

O. L. Lyanna
SE «Dnipropetrovsk Medical Academy of Ministry of Health of Ukraine»,
Department of Biochemistry, Medical and Pharmaceutical Chemistry
4, Zhovtneva Square, Dnipropetrovsk, Ukraine, 49027

ACTIVITY OF CYSTEINE CATHEPSINS IN THE TISSUES AND BIOLOGICAL FLUIDS OF PATIENTS WITH ONCOLOGICAL BRAIN DISEASES

Summary
The spectrophotometric methods were used for determining of cathepsins' activity levels. The data obtained testify to the changes of functional state of lysosomal apparatus of cells according with the values of cysteine cathepsins B, H, L activity levels in the biological fluids – increasing of both cathepsin L activity in blood serum of the patients with meningioma and astrocytoma and cathepsins B, L, H activity in urine of the patients with meningioma and glioblastoma that were researched during carcinogenesis. It was supposed that tumor transformation causes proteolysis alterations resulted by brain cellular membrane modifications.
Key words: cysteine cathepsins, oncological diseases of human brain, blood plasma, urine.

Стаття надійшла до редакції 19.11.2013.