

Чи дійсно зростання концентрації ТТГ у крові хворих із карциномою щитоподібної залози може бути наслідком підвищеної активності катепсину L?

Т.М. Мишуніна

ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України»

Резюме. У роботі наведено дані про збільшення активності лізосомальних цистеїнових катепсинів H, B и L у тканині папілярної і фолікулярної карцином щитоподібної залози та критичний аналіз результатів і висновків досліджень групи авторів щодо зв'язку рівня тиреотропного гормону гіпофіза в крові та підвищеної активності лізосомального цистеїнового катепсину L у тканині карцином щитоподібної залози і в крові пацієнтів із тиреоїдним раком.

Ключові слова: цистеїнові катепсини, тиреотропний гормон гіпофіза, карциноми щитоподібної залози.

Механізми утворення тиреоїдних гормонів у щитоподібній залозі (ЩЗ) людини добре досліджено. Підвищення рівня тиреотропного гормону гіпофіза (ТТГ) і активація його рецепторів у тиреоцитах супроводжуються секрецією з останніх ряду лізосомальних катепсинів для позаклітинної сольобілізації тиреоглобуліну, міграцією лізосом до апікальної частини клітин, злиттям їх із фагосомами, експресією та/або індукцією активності низки лізосомальних протеолітичних ферментів, які гідролізують у фаголізосомах розчинну форму тиреоглобуліну з вивільненням трийодтироніну та тироксину. Складний механізм процесингу тиреоглобуліну передбачає на всіх його етапах чіткий синергізм у дії лізосомальних протеаз,

зокрема цистеїнових катепсинів, що забезпечує фізіологічний механізм гормональної секреції, включно з його регуляцією ТТГ [1, 2].

При патології ЩЗ механізми зв'язку між цими процесами можуть порушуватися. Так, при хворобі Грейвса за умов гіпертрофії та гіперплазії тиреоїдної паренхіми, які пов'язані зі стимуляцією імуноглобулінами рецептора до ТТГ, активність цистеїнових катепсинів у ЩЗ суттєво збільшена [3, 4]. Це, проте, не призводить до суттєвих змін рівня гормону, оскільки при дифузному токсичному зобі тиреотропна функція гіпофіза не послаблюється, і він, внаслідок порушень центральних механізмів регуляції функції ЩЗ, не реагує на тиреоїберин гіпоталамуса і збільшення рівня периферичних тиреоїдних гормонів.

З іншого боку, зростання активності цистеїнових катепсинів у пухлинах різної локалізації, у т.ч. і в карциномах ЩЗ, пов'язують з їх участю в кан-

* адреса для листування (Correspondence): ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України», вул. Вишгородська, 69, м. Київ, 04114, Україна; e-mail: zdovado@ukr.net

цереогенезі, прогресії пухлинного процесу, інвазії та метастазуванні пухлин [5, 6]. Зокрема, зміни експресії катепсину L спостерігали за дії чинників, що впливають на проліферацію, диференціювання і дедиференціювання клітин клітинної лінії злоякісної пухлини ЩЗ [7]. Активність цистеїнових катепсинів суттєво (за деякими даними до 10 і більше разів) підвищена у тканині різних карцином ЩЗ людини [4, 8].

Назагал, існує досить стале уявлення, що в разі виникнення злоякісної пухлини у ЩЗ рівень тиреоїдних гормонів, білків, що їх зв'язують, анти-тиреоїдних антитіл та ТТГ у крові пацієнтів не зазнають суттєвих змін [9]. Водночас, зважаючи на те, що цистеїнові катепсини відіграють провідну роль у деградації тиреоглобуліну і в утворенні тиреоїдних гормонів, а активність їх значно підвищується у тканині карцином ЩЗ, низка авторів вважають реальним пов'язати збільшення активності цих ферментів не з їх участю в канцерогенезі, а з регуляцією (а саме з підвищенням) рівня ТТГ у хворих із карциномами ЩЗ [10-14]. Питання це на сьогодні, на наш погляд, є вельми дискусійним.

Метою роботи було дослідити активність трьох цистеїнових катепсинів (Н, В і L) в тканині фолікулярної і папілярної карцином ЩЗ, а також тканині метастазів останньої.

Матеріали та методи

Досліджено 32 зразки пухлинної тканини (фолікулярна, папілярна карциноми, метастази папілярної карциноми) ЩЗ, а також 12 зразків позапухлинної незміненої тканини ЩЗ нормофолікулярної будови.

Тканину ЩЗ промивали охолодженим фізіологічним розчином, зважували, подрібнювали та гомогенізували в 10-кратному об'ємі середовища такого складу (ммоль/л): цукроза 250, трис-НСІ-буфер – 20, ЕДТА- Na_2 – 1 (рН 7,4). Всі процедури проводили при 4 °С.

Активність катепсинів визначали за методичними принципами, які викладено в роботі А. Barret і Н. Kirschke [15], із застосуванням таких субстратів: L-лейцин-4-нітроаніліду (катепсин Н), N_2 -бензоіл-DL-аргінін-4-нітроаніліду (катепсин В) і азоказеїну, 6 % розчин якого був денатурований 6 М сечовиною (катепсин L). Активність катепсинів Н і В виражали у мкмоль паранітроаніліну, який відщепився від субстрату протягом 1 години інкубації, а активність катепсину L – в одиницях абсорбції низькомолекулярних пептидів, що утворилися за 1 годину інкубації і не оса-

джувалися трихлороцтовою кислотою, у перерахунку на 1 мг тканини.

При аналізі отриманих результатів було використано дані щодо концентрації ТТГ у крові хворих, яку визначали імуноферментним методом у клінічній лабораторії Інституту при обстеженні пацієнтів до оперативного втручання. Одержані дані опрацьовано статистично з використанням критерію t Стьюдента. Критичний рівень значимості приймали за 0,05. На проведення досліджень було отримано дозвіл від Комітету з питань біоетики Інституту.

Результати та їх обговорення

Активність катепсинів Н і В у позапухлинній тканині ЩЗ, яку отримували від пацієнтів із фолікулярними карциномами ЩЗ, була удвічі нижчою за таку в залозі за наявності папілярної карциноми, тоді як активність катепсину L не різнилася залежно від типу присутньої в залозі пухлини (**таблиця**).

У тканині карцином активність усіх трьох ферментів суттєво вища (у 2,5-4,5 рази) порівняно з активністю катепсинів у відповідних зразках позапухлинної тканини ЩЗ. У тканині метастазів папілярної карциноми підвищеною виявилася активність катепсинів Н і L; активність катепсину В відповідала її рівню в позапухлинній незміненій тканині.

Концентрація ТТГ у крові пацієнтів з карциномами ЩЗ перебувала в межах референтних значень; вона коливалася в крові різних хворих від 0,93 до 2,50 мкОд/мл і становила в середньому $1,66 \pm 0,19$ мкОд/мл.

Отже, у тканині карцином ЩЗ має місце значне збільшення активності цистеїнових катепсинів на тлі незміненого рівня ТТГ у крові пацієнтів. Отримані дані цілком збігаються з тими, що наведено в літературі, а саме: загальна активність катепсинів, як і активність та експресія катепсинів L та В, у тканині карцином ЩЗ підвищена у 2-15 разів порівняно з такою в нормальній тканині залози [4, 8, 16-18]. Свідчення про високу активність катепсину Н в злоякісних пухлинах ЩЗ наведено нами вперше.

Як вказано вище, деякі дослідники вважають, що збільшення активності катепсинів В і L може відігравати певну роль у підвищенні рівня ТТГ у хворих із карциномою ЩЗ [10-14]. Автори не деталізують механізми такого зв'язку, але враховуючи, що рівень тиреоглобуліну в нормальній залозі є одним із чинників, які контролюють секрецію тропного гормону [19], можна допустити, що логіка авторів є такою: значне підвищення в лізосомах пухлинних клітин активності катепсинів, зокрема катепсину L, який є найактивнішим

Оригінальні дослідження

Таблиця. Активність цистеїнових катепсинів у позапухлинній тканині, тканині карцином щитоподібної залози та тканині метастазів папілярної карциноми ($M \pm m$)

Тканина	Активність катепсину		
	<i>H</i> , мкмоль паранітроаніліну/(год·мг білка)	<i>B</i> , мкмоль паранітроаніліну/(год·мг білка)	<i>L</i> , од. абсорбції/ (год·мг білка)
Позапухлинна при папілярній карциномі (n=9)	0,135±0,031	0,175±0,037	1,59±0,06
Папілярної карциноми (n=21)	0,615±0,102*	0,394±0,070 *	4,83±0,77 *
Метастазів папілярної карциноми (n=6)	0,548±0,140*	0,183±0,048	4,20±0,86 *
Позапухлинна при фолікулярній карциномі (n=3)	0,063±0,011**	0,088±0,033**	1,65±0,17
Фолікулярної карциноми (n=5)	0,277±0,064 *	0,311±0,049 *	4,34±0,51 *

Примітки: * – зміни вірогідні порівняно з даними відповідної групи позапухлинної тканини ($p < 0,05$); ** – різниця вірогідна порівняно з активністю ферментів у позапухлинній незмінній тканині ЩЗ при папілярній карциномі ($p < 0,05$); n – кількість спостережень.

серед ферментів щодо деградації тиреоглобуліну [2, 20], буде призводити до інтенсифікації його процесингу і зниженню вмісту цього білка в фолікулярній порожнині, що призведе до активації сигналів, які забезпечують підвищення рівня ТТГ.

Висновок про те, що (цитуємо) «...у хворих із пухлинами ЩЗ ... зростання концентрації ТТГ може бути наслідком підвищеної активності катепсину L» дослівно повторюється в усіх працях колективу авторів [10-14]. Проте, аналіз даних, представлених в цих роботах, не дає підстав для такого висновку. Так, спочатку зростання активності катепсину L у тканині карцином ЩЗ і, відповідно у крові хворих, автори оцінювали з огляду на більш ніж 7-разове (!) збільшення рівня ТТГ в крові хворих на рак ЩЗ [11, 12] при незміненому рівні тиреоїдних гормонів [11]. Пізніше аналогічну високу активність ферменту в крові вже розглядали на тлі незміненого рівня тропного гормону за підвищеного (хворі на 1 стадію онкозахворювання) чи зниженого (!) (хворі на 2 стадію онкозахворювання) рівня тироксину і незміненого рівня трийодтироніну [13].

Наводячи дані про зміни активності катепсину L в крові прооперованих хворих, автори в одних роботах вказують на її зниження в післяопераційний період (через 7 днів після операції), перед проведенням радіоїодотерапії (термін, що минув після операції, не вказаний) і через 7 днів після її закінчення [10, 12], а в інших – на зниження активності ферменту після операції (7 днів) і прогресивне підвищення її перед проведенням радіоїодотерапії і через 7 днів після неї [13]. При цьому рівень ТТГ в крові прооперованих хворих після видалення ЩЗ з пухлиною, які перебувають у стані гіпотиреозу перед проведенням і через 7 днів після радіоїодотерапії, зрозуміло, високий, але прогресивного збільшення його вмісту не відбувається. Авторі розглядають можливу роль опромінення в підвищенні активності катепсину L в крові після радіоїодотерапії не тільки внаслідок

дії радіоактивного йоду на тиреоїдні клітини залишків ЩЗ чи метастазів карцином, але й клітини інших тканин і органів, проте у висновку все ж пов'язують лише два чинники – високу активність катепсину L і високий рівень секреції ТТГ.

Гіпотетичні (як на наш погляд) міркування авторів щодо зв'язку активності катепсину L і рівня ТТГ у хворих із карциномами ЩЗ перебувають у протиріччі з даними щодо збільшення вмісту та експресії тиреоглобуліну у тканині папілярних карцином [21]. Проте збільшений рівень тиреоглобуліну не впливає за цих умов на секрецію ТТГ. Крім того, у позапухлинній незмінній тканині ЩЗ за присутності в залозі карциноми встановлено зниження активності цистеїнових катепсинів порівняно з активністю в позавузловій тканині ЩЗ за вузлового зоба [22], що може бути більш співзвучним із висновками про невелике зменшення рівня тироксину та деяке підвищення вмісту ТТГ у крові певної частини хворих на рак ЩЗ [23]. На наш погляд, у хворих із карциномами ЩЗ має місце інший сценарій, а саме: порушення взаємозв'язку між деградацією тиреоглобуліну на тлі активованих цистеїнових катепсинів за умов злоякісної трансформації тиреоцитів у ЩЗ, з однієї сторони, і секрецією ТТГ – з іншої. Можна погодитися з авторами з приводу можливого порушення структури або транспорту тиреоглобуліну в трансформованих клітинах, що перешкоджає його нормальному процесингу в пухлинних клітинах, або зміні в кінетиці чи структурі власне ферментів у пухлинних клітинах (такі дані є й у самих авторів [12, 24]). Проте це ніяк не пояснює участь катепсинів у стимуляції (!) секреції ТТГ.

Самий висновок про високий рівень тропного гормону в них спростовується і даними нашої роботи і тими, що наведено в літературі, про можливе лише невелике підвищення рівня ТТГ в крові частини хворих, який у більшості навіть не виходить за верхню межу референтних значень [23, 25]. Крім того, ступінь цих змін відрізняється залежно

від віку хворих [23] та гістологічної будови папілярних карцином [26]. Так, помірне підвищення рівня ТТГ спостерігали в 16% пацієнтів із пухлинною типовою папілярною будовою та у 60-67% хворих із фолікулярним або солідним варіантом папілярної карциноми, але в певній кількості цих хворих був також зниженим і вміст вільного тироксину, який безпосередньо і переважно бере участь у регуляторних процесах за принципом зворотного зв'язку між центральними і периферійними ланками гіпоталамо-гіпофізарно-тиреоїдної системи, тобто хворі перебували у стані субклінічного гіпотиреозу. У роботах авторів, суть результатів яких аналізується, поділ хворих за віком та особливостями гістологічної будови карцином не проводився.

Слід також зауважити, що скласти чітке уявлення власне про зміни у тканині карцином ЩЗ процесів протеолізу, що зумовлені дією цистеїнових катепсинів, та про можливий зв'язок між підвищенням активності ферментів у тканині пухлин і в крові пацієнтів за даними авторів складно. Так, в одній із перших своїх статей [10] автори стверджують, що (цитуюемо) «...у тканинах злоякісних пухлин ЩЗ встановлено підвищення активності катепсину В приблизно в 5 разів». При цьому «...рівні активності катепсину В плазми крові хворих не відрізнялися від нормальних показників...». Водночас на тлі незміненої активності катепсину L у тканині карцином ЩЗ (цитуюемо) «...активність даної протеїнази (у плазмі крові, Т.М.) виявлена збільшеною в 1,3 рази порівняно з контролем». Зважаючи на ці невідповідності, незрозумілою є думка авторів про те, що «...активація протеолізу в плазмі крові при канцерогенезі ЩЗ може бути наслідком активації лізосомних протеїназ і вивільнення їх із клітин тканини залози...» [10].

У наступних роботах наведено, проте, вже інші дані про збільшення активності катепсину L у тканині карцином ЩЗ [12,13,24]. Пояснень значенням невідповідностям автори не наводять, а самотужки з'ясувати це з текстів статей неможливо, оскільки кількість хворих в усіх дослідженнях однакова, зразки патологічного матеріалу, певно, також однакові (?), метод визначення активності ферменту той самий, але ступінь змін активності катепсину L, наприклад у крові, різний: від приблизно 130% [10]-160% [12] до 380% [24] або навіть понад 500% [13] відносно контролю. Активність катепсинів у плазмі крові хворих із папілярною і фолікулярною карциномами ЩЗ дійсно підвищена [27], проте ступінь її зростання у хворих із папілярною карциномою різниться залежно від цілої низки клінічних характеристик захворю-

вання: категорії Т пухлини, особливостей її гістологічної будови, метастатичного та інвазійного потенціалу і, що суттєво, наявності різноманітної супутньої тиреоїдної патології, яка фіксується у 60-70% хворих [28]. Останнє значно змінює картину підвищення активності катепсинів, зокрема В і L, у крові хворих із різними клінічними характеристиками папілярних карцином ЩЗ. Ці чинники авторами робіт, які розглядаються, не враховані, тому розбіжності у величині змін активності катепсину L залишаються невідомими. Про невідповідність інформації в різних публікаціях про напрямок змін активності ферменту в пухлинній тканині сказано вище.

Отже, чи дійсно зростання концентрації ТТГ (і яке?!) у хворих із карциномою ЩЗ може бути наслідком підвищеної активності катепсину L? Відповідь на це питання, враховуючи отримані нами дані, а також якість матеріалу, викладеного в роботах зазначеної групи авторів, та даних літератури, частина з яких процитована, зрозуміла.

Література

- Dunn A., Myers H., Dunn J. The combined action of two thyroidal proteases releases T4 from the dominant hormone-forming site of thyroglobulin // *Endocrinology*. 1996, 137, 8, 3279-3285.
- Friedrichs B., Tepel C., Reinheckel T. et al. Thyroid functions of mouse cathepsins B, K, and L // *J. Clin. Invest.* 2003, 111, 11, 1733-1745.
- Kusunoki T., Nishida S., Nakano T. et al. Study on cathepsin B activity in human thyroid tumors // *Auris Nasus Larynx*. 1995, 22, 1, 43-48.
- Shuja S., Ca J., Iacobuzio-Donahue C. et al. Cathepsin B activity and protein levels in thyroid carcinoma, Graves' disease, and multinodular goiters // *Thyroid*. 1999, 9, 6, 569-577.
- Gocheva V., Joyce J. Cysteine cathepsins and the cutting edge of cancer invasion // *Cell Cycle*. 2007, 6, 1, 60-64.
- Жанаева С.Я. Цистеиновые протеиназы лизосом в онкогенезе // *Бюл. СО РАМН*. 2010, 30, 4, 101-109.
- Plehn A., Gnther D., Aurich H. et al. Influence of proliferation, differentiation and dedifferentiation factors on the expression of the lysosomal cysteine proteinase cathepsin L (CL) in thyroid cancer cell lines // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2000, 477, 487-495.
- Srisomsap C., Subhasitanont P., Otto A. et al. Detection of cathepsin B up-regulation in neoplastic thyroid tissues by proteomic analysis // *Proteomics*. 2002, 2, 6, 706-712.
- Берштейн Л.М. Онкоэндокринология: традиции, современность и перспективы. СПб: Наука, 2004. 343 с.
- Хворостенко М.І., Лянна О.Л., Чорна В.І. та ін. Дослідження активності цистеїнових катепсинів та визначення їх клінічного значення при пухлинах щитоподібної

Оригінальні дослідження

- залози // Укр. радіол. журн. 2005, 3, 429-432.
11. Чорна В.І., Лянна О.Л., Хворостенко М.І., Бразалук О.В. Роль протеолізу в гормонопоезі щитоподібної залози за канцерогенезу // Вісник Львівського університету. 2008, вип. 47, 58-62.
 12. Лянна О.Л., Чорна В.І., Хворостенко М.І. Особливості регуляції активності цистеїнових протеаз та визначення їх клінічного значення за канцерогенезу щитоподібної залози // Укр. радіол. журн. 2009, 3, 308-311.
 13. Хворостенко М.І., Лянна О.Л., Чорна В.І., Дорофеева Н.А. Зміни стану системи протеолізу у відповідь на променеве лікування папілярної карциноми щитоподібної залози // Укр. радіол. журн. 2010, 3, 342-344.
 14. Лянна О.Л., Чорна В.І., Хворостенко М.І., Дорофеева Н.А. Вплив радіойодтерапії на стан системи протеолізу за канцерогенезу щитовидної залози // Наукові праці. Вип. 126, том 139 «Техногенна безпека». 2010, 53-57.
 15. Barret A., Kirschke H. Cathepsins B, H, and L // In: Methods in enzymology. Ed.: L. Lorán. New-York, London: Academic Press, 1981, 80, part C, 535-561.
 16. Кирпиченюк Л.Н. Гидранович Л.Г., Шиленок В.Н. Активность протеолитических процессов при заболеваниях щитовидной железы // Вопр. мед. химии. 2000, 5, 45.
 17. Shuja S., Murnane M. Marked increases in cathepsin B and L activities distinguish papillary carcinoma of the thyroid from normal thyroid or thyroid with non-neoplastic disease // Int. J. Cancer. 1996, 66, 4, 420-426.
 18. Ruhoy S. Cathepsin B and Cathepsin D Expression in Follicular Adenomas and Carcinomas of the Thyroid Gland // Endocr. Pathol. 1997, 8, 1, 49-57.
 19. Suzuki K., Mori A., Lavaroni S. et al. Thyroglobulin: A master regulator of follicular function via transcriptional suppression of thyroid specific genes // Acta Histochem. Cytochem. 1999, 32, 2, 111-119.
 20. Jordans S., Jenko-Kokalj S, Khl NM et al. Monitoring compartment-specific substrate cleavage by cathepsins B, K, L, and S at physiological pH and redox conditions // BMC Biochem. 2009, 10, 23.
 21. Воскобойник Л.Г., Журнаджи Л.Ю., Бурко С.В. та ін. Порівняльний аналіз експресії тиреоглобуліну та симпортера натрію/йоду у папілярних карциномах і фолікулярних аденомах щитовидної залози // Ендокринологія. 2011, 16, 1, 28-39.
 22. Калініченко О.В., Мишуніна Т.М. Активність цистеїнових катепсинів у незмінній позапухлинній тканині нормофолікулярної будови хворих із карциномою щитоподібної залози // Ендокринологія. 2012, 17, дод. 1, 40-41.
 23. Гриневич Ю.Я., Бендог Г.Д., Югрінова Л.Г. та ін. Взаємозв'язок між цитологічними особливостями раку щитовидної залози та ендокринною функцією тимуса і гіпофізарно-тиреїдною системи організму // Онкологія. 2003, 4, 284-287.
 24. Лянна О.Л. Роль цистеїнових катепсинів у деградації білків при патологічних станах: Автореф. дис. канд. біол. наук. Київ, 2007. 20 с.
 25. Комісаренко І.В., Славнов В.М., Рібаков С.І. та ін. Радіоімунологічний аналіз у визначенні функціонального стану гіпофізарно-тиреїдної системи у хворих на рак щитоподібної залози // Укр. радіол. журн. 1997, 22, 22-24.
 26. Гриневич Ю.Я., Лобода В.Ф., Бендог Г.Д. та ін. Взаємозв'язок між цитологічними особливостями раку щитовидної залози та ендокринною функцією тимуса і гіпофізарно-тиреїдною системи організму // Патологія. 2008, 2, 52.
 27. Калініченко О.В., Мишуніна Т.М., Тронько М.Д. В- та L-катепсиноподібна активність у плазмі крові хворих з різними захворюваннями щитовидної, паращитовидної та надниркових залоз // Укр. біохім. журн. 2010, 2, 45-50.
 28. Калініченко О.В., Мишуніна Т.М., Тронько М.Д. Катепсиноподібна активність у плазмі крові хворих з папілярною карциномою щитовидної залози // Фізіологічний журнал. 2010, 56, 6, 76-81.

Действительно ли увеличение концентрации ТТГ в крови больных с карциномой щитовидной железы может быть следствием повышенной активности катепсина L?

Т.М. Мишуніна

ГУ «Институт эндокринологии и обмена веществ им. В.П. Комиссаренко НАМН Украины»

Резюме. В работе приведены данные о повышении активности катепсина H, B и L в ткани папиллярной и фолликулярной карцином щитовидной железы и критический анализ результатов и выводов группы авторов в отношении связи уровня тиреотропного гормона гипофиза в крови и повышенной активности лизосомального цистеинового катепсина L в ткани карцином щитовидной железы и в крови пациентов с тиреоидным раком.

Ключевые слова: цистеиновые катепсины, тиреотропный гормон гипофиза, карциномы щитовидной железы.

Is increase in the concentration of TSH in the blood of patients with thyroid Carcinoma may be due to increased activity of cathepsin L?

Т.М. Myshunina

State Institution «V.P.Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism, Natl. Acad. Med. Sci. of Ukraine»

Summary. The author presents data on enhanced activity of cathepsins H, B and L in the tissue of papillary and follicular thyroid carcinomas, and a critical analysis of the results and conclusions of a research group of authors regarding an association between the blood level of pituitary thyroid stimulating hormone and increased activity of lysosomal cysteine cathepsin L in the tissue of thyroid carcinomas and in the blood of patients with thyroid cancer.

Keywords: cysteinic cathepsins, pituitary thyroid stimulating hormone, thyroid carcinomas.

(Надійшла 12.07.2012)