

УДК 616.211/.232-006:612.015

ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОТЕЇНАЗНО-ІНГІБІТОРНОГО ПОТЕНЦАЛУ В ПЛАЗМІ КРОВІ ХВОРИХ НА РАК ГОРТАНІ

Бурлака Ю.Б., Гринь Н.В., Кизим О.Й., Верьовка С.В.

ДУ «Інститут отоларингології ім. проф. О.С. Коломійченка НАМН України»

Досліджено компоненти системи протеоліз-інгібітори в плазмі крові 25 хворих на рак гортані з різними стадіями захворювання. Встановлено, що найбільш суттєві зміни досліджених біохімічних показників були притаманні хворим з III-ї стадією злякисного новоутворення. Показано, що при розвитку злякисного процесу в гортані порушується протеїназно-інгібіторна рівновага в плазмі крові, що виражається у зростанні активності трипсинподібних протеїназ при недостатньому антипротеолітичному контролі.

Ключові слова: рак гортані, протеолітичні ферменти, інгібітори протеолітичних ферментів.

Незважаючи на те, що дослідження системи протеолізу при злякисному рості почалося давно, її роль при неоплазії ще повністю не з'ясована. Дані літератури свідчать про те, що при пухлинному рості досить часто спостерігається підвищення протеолітичної активності [1-3]. Протеїнази пухлин можуть різними шляхами впливати як на самі пухлинні клітини, так і на їхні взаємини з організмом-пухлиноносієм. Ці механізми взаємно не виключають один одного і кожен з них свого часу може відігравати певну роль в залежності від типу пухлини. Вважають, що вивчення ролі цих ферментів в злякисному переродженні має як теоретичне так і практичне значення [1].

Інгібітори протеолізу або антипротеїнази містяться в тканинах та крові і є одним з механізмів захисту організму від протеолітичних ферментів ендогенного і екзогенного походження. Порушення рівноваги в системі протеїнази – їх інгібітори призводить до виникнення різних патологічних станів. В клінічній та експериментальній онкології паралельно з дослідженнями ферментів протеолізу ведеться інтенсивне вивчення регуляторів їх дії – інгібіторів протеї-

наз [4, 5]. Основними регуляторами активності трипсинподібних протеїназ є β_2 -макроглобулін (β_2M) та β_1 -інгібітор протеїназ (β_1IP), які відносяться до групи гострофазних білків. Інгібітор β_2M здатний зв'язувати практично всі відомі протеїнази, а β_1IP забезпечує 90 % антипротеолітичної активності плазми крові; обидва інгібітори відіграють значну роль у протидії організму злякисній агресії [2, 4].

Мета дослідження – провести дослідження компонентів протеїназно-інгібіторної системи в плазмі крові хворих на рак гортані.

Матеріали та методи

Було обстежено 25 пацієнтів ДУ «Інститут отоларингології ім. проф. О.С. Коломійченка НАМН України» (м. Київ). У дослідженні брали участь лише чоловіки з первинними злякисними новоутвореннями гортані, віком від 45 до 65 років (середній вік складав 55 років). З них у 10 пацієнтів верифіковано діагноз плоскоклітинний ороговілий рак гортані II-ої стадії ($T_2N_0M_0$), а у 15 – III-ої стадії ($T_3N_0M_0$). Контрольну групу склали 20 умовно здорових людей за віком та статтю схожих з особами в групі

хворих на рак гортані.

Матеріалом дослідження були бідна на тромбоцити плазма крові. Забір крові проводився з ліктьової вени в пробірку з 3,8 % цитратом натрію у співвідношенні 9:1. Трипсинподібну активність (ТПА) в плазмі крові визначали методом К.М. Веремеєнка та співавт. за швидкістю розщеплення протаміна сульфату [6]. Про потенційну активність плазміногену (ППА) судили за його здатністю після активації стрептокіназою гідролізувати протамін сульфат [6]. Тромбінподібну активність (ТрПА) в плазмі крові досліджували за методом Abilgaard з використанням хромогенного субстрату Tos-Glu-Pro-Arg-пара-нітроаніліду [7]. Вміст б₂-макроглобуліну та

б₁-інгібітора протеїназ вимірювали за допомогою методу К.М. Веремеєнка та співавт. [6]. Статистична обробка отриманих даних проведена з використанням методів варіаційної статистики з обчисленням середніх величин (М) і стандартної помилки середнього значення (m), достовірними вважали різницю при $p < 0,05$ [8].

Результати та обговорення

Результати дослідження активності протеїназ та їх інгібіторів в плазмі крові хворих на рак гортані підсумовані в таблиці 1.

Як видно, в плазмі крові пацієнтів з II-ою стадією раку гортані достовірних змін показників системи протеїнази та їх інгібітори не було виявлено. В групі пацієнтів з III-ою стадією відмічено тенденцію до зростання ППА і ТрПА, статистично вірогідне підвищення ТПА та рівня б₁ІП, а також суттєве зниження вмісту б₂М.

Відомо, що при злоякісних новоутвореннях, незважаючи на збільшення концентрації б₁ІП, зменшується його функціонально активна фракція, це пов'язано з деструкцією його пухлинними протеїназами, а також із секрецією дефектного б₁ІП клітинами пухлини [2]. Враховуючи це, можна вважати, що підвищення б₁ІП в плазмі крові хворих на рак гортані при III-ій стадії захворювання відбувалось за рахунок сумарного вмісту інгібітора як господаря, так і неоплазми. Що стосується б₂М, то

зменшення його активності в плазмі крові при раку гортані як II-ої, так і III-ої стадії, ймовірно, пов'язано з тим, що інгібітор, який виділяється злоякісною пухлиною, не визначався в плазмі крові використаним нами методом, а синтез ендogenous б₂М *de novo* міг бути пригнічений токсичністю зростаючої злоякісної пухлини [4].

Відомо, що інгібітори протеї-

Активність протеолітичних ферментів та вміст їх інгібіторів в плазмі крові хворих на рак гортані

Групи обстежених	ТПА, нмоль аргініна/ (хв*мл)	ППА, нмоль аргініна/ (хв*мл)	ТрПА, нмоль п-НА/ (хв*мл)	Вміст α ₂ М, г/л	Вміст α ₁ ІП, г/л
Умовно здорові люди	24,0 ± 1,7	185,0 ± 9,0	9,6 ± 1,0	2,00 ± 0,09	2,00 ± 0,08
Хворі на рак гортані: II-ї стадії	25,0 ± 6,0	174,0 ± 21,5	12,5 ± 3,0	1,80 ± 0,28	1,8 ± 0,2
III-ї стадії	37,0 ± 5,4 $p < 0,05$	191,0 ± 21,0	17,0 ± 4,5 $p > 0,05$	1,40 ± 0,16 $p < 0,01$	2,70 ± 0,18 $p < 0,01$

Примітка. p – достовірність різниці між відповідними даними у хворих та здорових осіб.

Коефіцієнти співвідношення активності протеїназ та рівня α₂М в плазмі крові хворих на рак гортані

Групи	Коефіцієнти		
	ТПА α ₂ М	ППА α ₂ М	ТрПА α ₂ М
Умовно здорові люди	12,0	92,5	4,8
Хворі на рак гортані			
II-ї стадії	13,8	96,7	6,9
III-ї стадії	26,4	136,4	12,1

наз здатні пригнічувати міграцію клітин як

in vitro, так і *in vivo* [5,9]. Це підтверджує важливу роль б₁ІП та б₂М у розвитку протидії організму злоякісній проліферації. Блокуючи підвищення активності протеїназ, забезпечуючи їх взаємодію з рецепторами, обидва інгібітори є ефективними протекторами клітин від протеолітичної деградації. В умовах онкологічної ситуації здійснення такого контролю є життєво важливою умовою. При дослідженні плазми крові хворих на рак гортані різко зменшений вміст б₂М та помірно підвищений рівень б₁ІП змінювали протеїназно-інгібіторну рівновагу в плазмі крові, про що свідчили коефіцієнти співвідношень, підраховані для взаємодії досліджених протеїназ з інгібіторами. Ці відмінності найбільш виразно проявляються при розрахунку коефіцієнтів співвідношення активності протеолітичних ферментів до вмісту їх інгібітора б₂М у хворих на рак гортані III-ої стадії. В них коефіцієнти ТПА/б₂М, ППА/б₂М та ТрПА/б₂М, відповідно в 2,2, 1,5 та 2,5 разів перевищували такі у практично здорових людей (див. табл. 2). Це підтверджує переважання протеолітичних процесів через дефіцит інгібітора.

Наші результати узгоджуються з даними літератури щодо змін стану трипсинподібних протеїназ, інгібіторів та загальної активації протеолізу в тканинах і біологічних рідинах при онкологічній патології. При різних стадіях злоякісного новоутворення відхилення від норми досліджуваних показників плазми крові були односпрямованими, мали місце відмінності лише в амплітуді змін показників і коефіцієнтів взаємозв'язку компонентів зазначених систем [10]. Очевидно, досліджувані нами та іншими авторами зміни активності трипсинових протеїназ та основних інгібіторів протеолізу плазми крові при онкологічних захворюваннях є частиною загальної реакції організму на розвиток неоплазми, оскільки картина їх змін повторюється при різних локалізаціях

злоякісного новоутворення [9, 10].

Висновок

При розвитку злоякісного процесу в гортані порушується протеїназно-інгібіторна рівновага в плазмі крові, що виражається у зростанні активності трипсинподібних протеїназ при недостатньому антипротеолітичному контролі.

Література

1. Кубышкин В.А. Изменения показателей протеиназно-ингибиторной системы крови при лучевой терапии злокачественных опухолей / В.А. Кубышкин // Экспериментальная и клиническая медицина. – 2010. – №2. – С. 104 – 106.
2. Оглобина О.Г. Роль протеолитических ферментов и ингибиторов в инвазии злокачественных опухолей / О.Г. Оглобина [и др.] // Биохимия. – 1994. – № 3. – С. 340 – 352.
3. Skrzydlewska E. Proteolytic-antiproteolytic balance and its regulation in carcinogenesis / E. Skrzydlewska [et al.] // World J. Gastroenterol. – 2005. – № 11 (9). – P. 1251 – 1266.
4. Зорин Н.А. Роль альфа-2-макроглобулина при онкологических заболеваниях / Н.А. Зорин [и др.] // Вопросы онкологии. – 2004. – Т. 50, № 5. – С. 515-519.
5. Капустина И.Н. Межклеточное взаимодействие в васкуляризации и прогрессии опухолей / И.Н. Капустина [и др.] // Вопросы биологической медицинской и фармацевтической химии. – 2004. – Вып. 2. – С. 48-52.
6. Веремеенко К.Н. Протеолиз в норме и при патологии / К.Н.Веремеенко [и др.]. – Киев: Кн.: «Здоров'я». 1988. – 200 с.
7. Abilgaard U. Antitrombin assay with new chromogenic substrates (S-2238 and chromozym TH) / U. Abilgaard [et al.] / Tromb. Res. – 1977 – Vol. 11, №.4. – P. 549 – 553.
8. Ойвин И.А. Статистическая обработка результатов экспериментальных исследований / И.А. Ойвин // Пат. физиол. – 1960 –№.4. – С. 76-85.
9. Wolf K. Multi-step pericellular proteolysis controls the transition from individual to collective cancer cell invasion / K. Wolf [et al.] // Nature Cell Biol. – 2007. –Vol. 9. №8 – P. 893 – 904.

10. Козлова Л. С. Баланс острофазных белков в плазме крови больных раком носоглотки / Л. С. Козлова [и др.] // Сибирское медицинское обозрение. – 2004. – Вып. 2. – С. 38-41.

References

1. Kubyshkin V.A. Changes in the proteinase inhibitors of the blood system in radiation therapy of malignant tumors / V.A. Kubyshkin // Exp. and Clin. Med. – 2010. – №2. – P. 104 – 106.
2. Ogloblina O.G. The role of the proteolytic enzymes and inhibitors in the invasion of malignant tumors / O.G. Oglobin [et al.] // Biochemistry. – 1994. – № 3. – P. 340 – 352.
2. Skrzydlewska E. Proteolytic-antiproteolytic balance and its regulation in carcinogenesis / E. Skrzydlewska [et al.] // World J. Gastroenterol. – 2005. – № 11 (9). – P. 1251 – 1266.
4. Zorin N.A. The role of alpha-2-macroglobulin in oncology / N.A. Zorin [et al.] // Problems of Oncology. – 2004. – Vol. 50, № 5. – P. 515-519.
5. Kapustin I.N. Intercellular communication in vascularization and tumor progression / I.N. Kapustin [et al.] // Questions of biological, medical and pharmaceutical chemistry. – 2004. – Vol. 2. – С. 48-52.
6. Veremeyenko K.N. Proteolysis in health and disease/ K.N.Veremeenko [et al.]. — Kiev: «Health». 1988. – 200 p.
7. Abilgaard U. Antitrombin assay with new chromogenic substrates (S-2238 and chromozym TH) / U. Abilgaard [et al.] / Tromb. Res. – 1977 – Vol. 11, №.4. – P. 549 – 553.
9. Oyvin I.A. Statistical analysis of the results of experimental studies / I.A. Oyvin // Pat. Physiol. – 1960 – №.4. – P. 76-85.
10. Wolf K. Multi-step pericellular proteolysis controls the transition from individual to collective cancer cell invasion / K. Wolf [et al.] // Nature Cell Biol. – 2007. –Vol. 9. №8 – P. 893 – 904.
11. Kozlova L.S. Balance of acute-phase proteins in the blood plasma of patients with nasopharyngeal carcinoma / L.S. Kozlov [et al.] // Siberian medical review. – 2004. – Vol. 2. – P. 38-41.

*Впервые поступила в редакцию 20.04.2015 г.
Рекомендована к печати на заседании редакционной коллегии после рецензирования*

Резюме

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТЕИНАЗНО-ИНГИБИТОРНОГО ПОТЕНЦИАЛА В ПЛАЗМЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ РАКОМ ГОРТАНИ.

*Бурлака Ю.Б., Гринь Н.В.,
Кизим О.И., Верева С.В.*

Исследованы компоненты системы протеолиз-ингибиторы в плазме крови 25 больных раком гортани при разных стадиях заболевания. Установлено, что наиболее существенные изменения исследованных биохимических показателей были присущи больным с III-ей стадией злокачественного новообразования. Показано, что при развитии злокачественного процесса в гортани нарушается протеиназно-ингибиторное равновесие в плазме крови, что выражается в росте активности трипсинподобных протеиназ при недостаточном антипротеолитическом контроле.

Ключевые слова: *рак гортани, протеолитические ферменты, ингибиторы протеолитических ферментов.*

Summary

THE INVESTIGATION OF PROTEINASE-INHIBITORY POTENTIAL IN BLOOD PLASMA OF PATIENTS WITH LARYNX CANCER

*Burlaka Yu.B., Gryn' N.V., Kizim A.I.,
Verevka S.V.*

The results of the study of proteinases activity and proteolytic enzyme inhibitors in blood plasma of 25 patients with larynx cancer in different stages of the disease are presented in this article. The most significant changes of biochemical parameters were inherent for patients with III stage of cancer. Thus, development of malignancy in the larynx is disturbs proteinase-inhibitory balance in the blood plasma, as a result an increase in activity of trypsin-like proteases in low antiproteolytic control.

Key words: *cancer of the larynx, proteolytic enzymes, inhibitors of proteolytic enzymes.*