

УДК 616.21-006:616.15-08

О.П. Голобородько, А.И. Кизим,
Ю.Г. Клысь, Н.В. Зайцева, С.В. Верева

ОЦЕНКА РИСКА ПОСЛЕОПЕРАЦИОННОГО РЕЦИДИВА И МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ ПО ПРЕДОПЕРАЦИОННЫМ ПОКАЗАТЕЛЯМ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА ПРИ РАКЕ ВЕРХНИХ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ

Государственное учреждение
"Институт отоларингологии
имени проф. А.И. Коломийченко НАМН Украины"

Разработка методов оценки нарушений молекулярных и клеточных процессов, лежащих в основе развития онкологических заболеваний, относится к давно и интенсивно разрабатываемым направлениям клинической биохимии. Однако какого-либо универсального метода, позволяющего однозначно определить уровень развития патогенеза, оценить риск возникновения послеоперационных осложнений и возможности развития рецидивирования опухоли, все еще не существует. И это — на фоне сотен известных диагностических маркеров патологического процесса [10, 16]. Обусловлено это их ограниченной информативностью, существенными отличиями показателей, получаемых тем или иным методом, от подлинного состояния того или иного компонента и всей системы в целом. Возможность образования протеолитически поврежденных белков, существенно отличающихся по функциональной активности от исходной нативной формы, существенно осложняет диагностику, внося противоречивость в трактовку результатов исследования. Так, иммунохимические методы оказываются зачастую неинформативными, поскольку определяемый с их помощью общий уровень того или иного белка может существенно отличаться от уровня функциональной активности последнего. С другой стороны, протеолитически деградированные производные ферментов сохраняют активность в отношении низкомолекулярных синтетических субстратов и резко уступают интактной форме по действию на функционально предопределенные белки [12]. В то же время проведение комплексной оценки

состояния системы по ряду в отдельности неинформативных показателей может оказаться весьма полезным. Особого внимания при этом заслуживают показатели системы гемостаза на дооперационной стадии. Обусловлено это не только возможностью целого ряда послеоперационных осложнений, связанных с кровотечением, тромбозами и гемorragиями, угрожающими жизни больного как во время операции, так и в послеоперационный период [13], но и участием многочисленных компонентов системы как в исходной форме патогенеза, так и в развитии послеоперационных рецидивов и метастазирования [2, 7, 11, 14–17]. В Украине ежегодно обнаруживается около 7000 ЛОР-онкобольных, что составляет 7,8% общей онкозаболеваемости [9]. На протяжении 2008–2010 годов в нашей лаборатории проводилась комплексная оценка до- и послеоперационных показателей системы гемостаза и сопряженных с ней белковых систем у больных с различными формами воспалительных и онкологических заболеваний верхних дыхательных путей [5, 6]. Сравнение ряда дооперационных показателей компонентов системы гемостаза у больных раком гортани, ротоглотки, носа и околоносовых пазух III стадии свидетельствуют о возможности прогнозирования риска послеоперационного рецидива и метастазирования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследован ряд дооперационных показателей системы гемостаза в бедной на тромбоциты цитратной плазме крови 25 первичных больных раком гортани, ротоглотки, носа и околоносовых пазух с III стадией злокачественной опухоли. Контрольную группу составляли 24 условно здоровых донора.

Общую трипсин-подобную протеолитическую активность (ПРА) определяли по методу К.Н. Веремеенко и соавт. В основу метода положено определение растворимых аргинин-содержащих пептидов, образующихся при ферментативном расщеплении протамина трипсин-подобными ферментами плазмы крови. Количественная оценка показателя ПРА выражается в нмоль растворимого аргинина, образующегося в течение 1 мин под действием 1 мл плазмы [3].

Тромбин-подобную амидолитическую активность определяли спектрофотометрически при длине волны 405 нм по расщеплению хромогенного синтетического субстрата Tos-Gly-Pro-Arg-пара-нитроанилида. Количественно выражали в нмоль пара-нитроанилина (п-НА), образующегося под действием 1 мл плазмы в течение 1 мин [15].

Эластазо-подобную амидазную активность определяли спектрофотометрически при длине волны 410 нм с применением хромогенного синтетического субстрата Suc-Ala₃-пара-нитроанилида. Количественно выражали в нмоль п-НА, образующегося под действием 1 мл плазмы крови в течение 1 часа [4].

Фибринолитическую активность (ФА) определяли эуглобулиновым методом Kowarzik и Vulluk [16] по времени лизиса фибринового сгустка (в мин).

Содержание α_1 -ингибитора протеиназ (α_1 -ИП) и α_2 -макроглобулина (α_2 -М) определяли по методу К.Н. Веремеенко и соавт. [1].

Содержание фибриногена определяли спектрофотометрическим методом В.А. Белицера и соавт. [8].

Результаты исследований обработаны методом вариационной статистики. Различия считались достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В табл. приведены результаты исследования группы дооперационных показателей системы гемостаза у больных с III стадией рака гортани, ротоглотки, носа и околоносовых пазух в сравнении с соответствующими показателями условно здоровых доноров. В группе больных наблюдалось возрастание уровня трипсин-подобной протеолитической, эластазо-подобной и тромбин-подобной амидолитической активности, содержания фибриногена и α_1 -ИП. Содержание же α_2 -М и показатель ФА, напротив, были снижены.

Согласно данным клинического наблюдения за больными, в отдаленном послеоперационном периоде после удаления опухоли (3–12 мес), у 10 из входивших в исследуемую группу больных диагностирован рецидив или метастазы в регионарные лимфатические узлы шеи. Дооперационные показатели этой группы больных в сравнении с показателями остальных 15 больных, у которых за этот период послеоперационных осложнений не наблюдалось, также приведены в табл. Как следует из приведенных данных, дооперационное значение уровня фибриногена, амидолитической тромбино-подобной активности, амидолитической эластазо-подобной активности, уровня α_1 -ИП у больных с послеоперационными ослож-

Таблица

Дооперационные показатели в группах больных раком гортани, ротоглотки, носа и околоносовых пазух III стадии в отдаленном послеоперационном периоде с осложнениями и в периоде ремиссии

Группы обследованных	ПРА, нмоль арг/ (мин·мл)	Амидолитическая эластазо-подобная активность, нмоль п-НА/(час·мл)	Уровень α_1 -ИП, г/л	Уровень α_2 -М, г/л	Амидолитическая тромбин-подобная активность, нмоль п-НА/(мин·мл)	Содержание фибриногена, г/л	ФА, мин
Больные раком гортани, ротоглотки, носа и околоносовых пазух III стадии (n=25)	78,0±4,0 p<0,001	14,0±1,7 p<0,02	2,50±0,20 p<0,05	1,50±0,10	16,0±3,0 p<0,05	4,0±0,3 p<0,001	263±12 p<0,02
Больные с послеоперационном рецидивом или метастазами опухоли (n=10)	81,0±7,2 p<0,01	14,8±2,3 p<0,05	2,50±0,20 p<0,05	1,40±0,10 p<0,001	20,0±3,9 p<0,02	4,6±0,4 p<0,001	278±20
Больные в периоде ремиссии (n=15)	75,7±3,5 p<0,001	11,5±1,5	2,10±0,15	1,70±0,10 p<0,05	12,1±2,7	3,5±0,2 p<0,001 p ₁ <0,05	249±9
Практически здоровые доноры (контроль, n=24)	55,5±3,2	9,2±1,0	2,00±0,08	2,00±0,09	9,6±1,0	2,2±0,1	237±5

Примечание: p — достоверность отличия между показателями у больных и практически здоровыми донорами; p₁ — достоверность отличия между соответствующими показателями больных с послеоперационными осложнениями и в периоде ремиссии.

нениями было существенно выше, а показатель ФА и уровень α_2 -М — ниже, чем в группе больных, находящихся в периоде ремиссии.

Полученные данные хорошо объяснимы процессами, происходящими с белками крови в ходе онкологических заболеваний. Чрезмерная и функционально необусловленная активация протеолитических ферментов составляет неотъемлемую черту как онкологических, так и воспалительных процессов, что в какой-то мере позволяет характеризовать их как разновидности “протеолитической вспышки”. Раковые клетки продуцируют повышенное количество протеиназ, способных влиять как на локальный, так и системный гемостаз, и непосредственно задействованных в процессах инвазии и метастазирования. В частности, протеолитическим ферментам системы гемостаза отводится важная, если не ключевая, роль в развитии комплекса молекулярных и клеточных нарушений, лежащего в основе онкологических заболеваний [2, 17]. Одним из ее следствий является формирование разнообразных протеолитически поврежденных производных, сохранивших ряд свойств исходной нативной формы в отношении как протеолитического повреждения, так и функционально необусловленной активации других белков [12]. При этом содержание циркулирующих в кровообращении высокоспецифичных ингибиторов протеиназ может в той или иной степени отклоняться от уровня нормы, однако всегда остается достаточно высоким в отношении нативных, неповрежденных ферментов [5, 6]. С другой стороны, нельзя упускать из виду и способность такого полифункционального белка, как α_2 -М, образовывать с протеиназами комплексы, сохраняющие активность в отношении низкомолекулярных субстратов, но в той или иной мере инактивированных в отношении белковых субстратов и ингибиторов. Поэтому ферментативная активность, определяемая посредством расщепления низкомолекулярных синтетических субстратов, корректнее называть “тромбино-подобной” или “эластазо-подобной”, подчеркивая тем самым их отличие от активности исходных интактных ферментов. Те же причины позволяют говорить о нетождественности определенного тем или иным методом белка или фермента действительному уровню его функциональной активности. Полученные данные хорошо согласуются со взглядом на онкологические заболевания как на комплексную дезинтеграцию метаболизма с кли-

ническим проявлением на глубоко запущенном уровне протеино- и энзимопатий [2, 7]. Поэтому широчайший спектр отличий по целому ряду показателей представляется закономерным, как закономерной представляется и разнонаправленность этих отличий. Какие-то показатели оказываются неинформативными, другие же могут лишь свидетельствовать об общем неблагополучии или о нормализации протекающих в организме процессов [5, 6]. В то же время комплексный учет нескольких показателей может оказаться полезным для прогноза последующего развития патологии, оценки степени риска послеоперационных осложнений. Так, сравнение рассмотренных показателей с принятым за 1 для каждого из них средним уровнем контрольной группы (рис.) свидетельствует о возможности создания эффективного прогностического индекса на основе комплексного учета предоперационных показателей уровня фибриногена, амидолитической тромбино-подобной активности и уровня α_2 -М. В то же время показатели общей амидолитической эластазо-подобной и трипсин-подобной протеолитической активности остаются ценными показателями уровня общего неблагополучия, эффективности проведенной терапии, однако в отношении прогноза

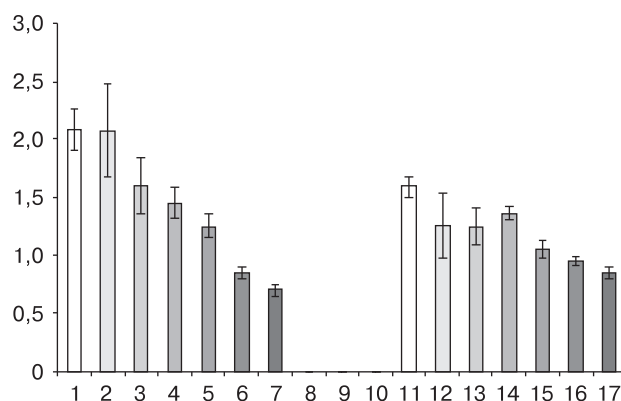


Рис. 1. Соотношение дооперационных показателей системы гемостаза у больных раком гортани, ротоглотки, носа и околоносовых пазух III стадии с послеоперационными осложнениями (левая группа) в периоде ремиссии (правая группа):

1, 11 — содержание фибриногена; 2, 12 — уровень амидазной тромбино-подобной активности; 3, 13 — уровень амидазной эластазо-подобной активности; 4, 14 — уровень общей трипсин-подобной протеолитической активности; 5, 15 — уровень α_1 -ингибитора протеиназ; 6, 16 — уровень фибринолитической активности (обратная величина от времени лизиса сгустка); 7, 17 — уровень α_2 -макроглобулина. Для каждого из показателей за единицу приняты средние показатели, соответствующие группе здоровых доноров

течения болезни в послеоперационный период они малоинформативны. Поэтому представляется оправданным применение аддитивного числового индекса, учитывающего отличия от нормального уровня содержания фибриногена, тромбин-подобной активности и содержания α_2 -М, выраженного для каждого из больных в безразмерных величинах, отражающих отношение каждого из упомянутых показателей к усредненной норме ([Fg], [Thr] и [α_2 -М], соответственно) и выражаемого формулой:

$$H = \frac{[Fg][Thr]}{[\alpha_2-M]}$$

Вычисленные по данной формуле индивидуальные показатели больных обеих рассматриваемых групп с последующим построением числовых рядов и расчетом методом вариационной статистики позволили получить усредненный показатель $6,35 \pm 1,67$ для группы больных с послеоперационными рецидивами и метастазированием и $2,65 \pm 0,53$ для группы больных без осложнений в рассматриваемом периоде. Критерий достоверности различий $p < 0,05$, что свидетельствует о достоверности различий показаний. Упрощение формулы до уровня [Fg] [Thr] также представляет определенный интерес, поскольку различия полученных показателей для обоих рядов ($3,72 \pm 0,81$ и $1,98 \pm 0,30$, соответственно) находится на грани критерия достоверности ($0,05 < p < 0,1$), хотя и достаточно отчетливо свидетельствует о тенденции к послеоперационным осложнениям.

Приведенные данные свидетельствуют о существовании возможности прогноза риска развития послеоперационных осложнений при раке верхних дыхательных путей III стадии. Показано достоверное различие по индексу, учитываемому показатели содержания фибриногена, уровня тромбин-подобной активности и содержания α_2 -макроглобулина, что позволяет достаточно корректно предположить возможность развития послеоперационных осложнений. Естественно, что предлагаемый комплекс методов не является единственным и исчерпывающим для оценки и прогноза такого сложного и многокомпонентного комплекса молекулярных и клеточных нарушений, каким являются онкологические заболевания, однако информативность и простота исполнения делают его применение оправданным в условиях исследовательской и клинической лаборатории.

ЛИТЕРАТУРА

1. Балуда В.П., Баркаган З.С., Гольдберг Е.Д. и соавт. — *Кн.: Лабораторные методы исследования системы гемостаза.* — Томск, 1980. — 313 с.
2. Веремеенко К.Н., Заболотный Д.И., Кизим А.И. Роль протеолиза в инвазии и метастазировании злокачественных опухолей // *Журн. АМН України.* — 2002. — Т. 8, № 2. — С. 217–237.
3. Веремеенко К.Н., Голобородько О.П., Кизим А.И. Протеолиз в норме и при патологии. — *К.: Здоровья,* 1988. — 198 с.
4. Веремеенко К.Н., Кизим А.И., Терентьев А.Г. Определение активности эластазы и ее ингибиторов в сыворотке крови с помощью хромогенных субстратов // *Клин. лаб. диагностика.* — 1992. — № 5–6. — С. 58–61.
5. Дослідження компонентів систем протеолізу та гемостазу в плазмі хворих із злоякісними новоутвореннями верхніх дихальних шляхів до і після хірургічного втручання / С.В. Верьовка, О.П. Голобородько, О.Й. Кизим, Ю.Г. Клись, Н.В. Зайцева // *Журн. вушних, носових і горлових хвороб.* — 2010. — № 3. — С. 2–9.
6. Дослідження компонентів протеолітичної, коагуляційної та фібринолітичної систем плазми крові пацієнтів з різною патологією ЛОР-органів / О.П. Голобородько, О.Й. Кизим, Ю.Г. Клись, С.В. Верьовка, Н.В. Зайцева, О.Й. Кікоть, Т.Д. Савченко // *Журн. вушних, носових і горлових хвороб.* — 2010. — № 5. — С. 34–39.
7. Карамышева А.Ф. Механизмы ангиогенеза // *Биохимия.* — 2008. — Т. 73, № 7. — С. 935–948.
8. Кількісне визначення фібриногену в плазмі крові людини / В.О. Беліцер., Т.В. Варецька Т.В., К.М. Веремеєнко, О.Й. Кізім, П.О. Світацька // *Лаб. діагностика.* — 1997. — № 2. — С. 53–55.
9. Лукач Е.В. Проблеми ЛОР-онкології в Україні // *IX з'їзд оториноларингологів України.* — К., 2000. — С. 272–273.
10. Маркеры злокачественного роста / В кн.: *Клиническая биохимия.* Под ред. В.А. Ткачука. — М.: ГЭОТАР-МЕД, 2004. — С. 377–423.
11. Матриксные металлопротеиназы 2 и 9 и их тканевые ингибиторы как факторы метастазирования злокачественных новообразований головы и шеи / И.В. Кондакова, Е.В. Климов, О.В. Савенкова, Г.В. Какурина, Е.П. Чойнзонов, Д.А. Шишкин, М.Р. Мухамедов // *Биомедицинская химия.* — 2008. — Т. 54, вып. 5. — С. 555–560.
12. Протеолитические производные плазминогена при развитии злокачественных новообразований / Ю.Г. Клись, Н.В. Зайцева, А.И. Кизим, С.В. Веревка // *Онкология.* — 2010. — Т. 12, № 1. — С. 17–21.
13. Центило В.Г. Угрожающие жизни кровотечения у больных со злокачественными опухолями челюстно-лицевой области: причины, техника лигирования сонных артерий // *Вопр. онкологии.* — 2004. — Т. 50, № 1. — С. 45–98.
14. Фильченков А.А. Молекулярные механизмы метастазирования опухолей // *Онкология.* — 1999. — № 2. — С. 122–135.
15. Abilgaard U., Lie M., Odegard O.R. Antitrombin assay with new chromogenic substrates (S-2238 and chromozym TH) // *Tromb. Res.* — 1977. — Vol. 11, № 4. — P. 549–553.
16. Ling S.-L., Chan D. Enzymes and related proteins as cancer biomarkers: a proteomic approach // *Clin. Chim. Acta.* — 2007. — Vol. 381. — P. 93–97.
17. Mc Intyre J., Matrisian L. Molecular imaging of proteolytic activity in cancer // *J. Cell. Biochem.* — 2003. — Vol. 90, № 6. — P. 1087–1097.

ОЦІНКА РИЗИКУ ПІСЛЕОПЕРАЦІЙНОГО РЕЦИДИВА ТА МЕТАСТАЗУВАННЯ ЗА ДООПЕРАЦІЙНИМИ ПОКАЗНИКАМИ СИСТЕМИ ГЕМОСТАЗУ ПРИ РАКУ ВЕРХНІХ ДИХАЛЬНИХ ШЛЯХІВ

О.П. Голобородько, О.Й. Кизим, Ю.Г. Клись, Н.В. Зайцева, С.В. Верьовка

Розвиток післяопераційного рецидива та метастазування становить одну з найгостріших проблем онкології. Порівняння біохімічних доопераційних показників групи хворих раком гортані, ротоглотки, носа та колоносових пазух свідчить про можливість прогнозу ризику розвитку післяопераційного рецидиву та метастазування.

EVALUATION OF POST-OPERATIVE RISK OF RECIDIVE AND METHASTASIS BY PRE-OPERATIVE INDEXES OF HEMOSTATIC SYSTEMS AT UPPER RESPIRATORY TRACT CANCER.

O.P. Goloborod'ko, A.I. Kizim, Yu.G. Klys, N.V. Zaitseva, S.V. Verevka

Post-operative recidives and methastasis form one of the most acute problems of oncology. Comparment of pre-operative bichemical indexes of the group of patients with cancer of upper respiratory tract testify for possibility to predict the development of these complications on post-treatment stage.

УДК 612.357.6:616.36-002

В.А. Дєєв,¹ В.І. Янченко,² І.В. Гомоляко,¹ І.О. Швадчин,¹ Н.Є. Клочкова¹

СПІВСТАВЛЕННЯ БІОХІМІЧНИХ ТА МОРФОЛОГІЧНИХ ХАРАКТЕРИСТИК ХРОНІЧНОГО ГЕПАТИТУ С.

¹ Національний інститут хірургії та трансплатології імені О.О. Шалімова АМН України, м. Київ;

² ДУ "Інститут епідеміології та інфекційних хвороб імені Л.В. Громашевського АМН України", м. Київ

Хронічний гепатит С (ХГС) є однією з найрозповсюдженіших хвороб сучасної людини і джерелом багатьох медичних та соціальних проблем, які обумовлені недосконалістю діагностичних методик, відсутністю ефективної вакцинації, недостатнім вирішенням деяких питань патогенезу та лікування [3, 4, 17].

Механізми інфікування, непередбачуваність перебігу та ускладнень, поєднання з іншими вірусними захворюваннями, часткова та повна втрата працездатності хворих ще в молодому віці, високий ризик розвитку цирозу печінки та

гепатоцелюлярної карциноми, велика потреба в трансплантації печінки надає цьому захворюванню статусу загальнодержавної проблеми [3, 4, 7, 13]. В цих умовах дуже важливе значення має рання діагностика ХГС, ефективний моніторинг, можливість прогнозування перебігу хвороби у часі.

Найбільш діагностично значущою та інформативною залишається пункційна біопсія печінки з подальшим морфологічним дослідженням. До недоліків морфологічного методу належить інвазивність і неможливість використання його для моніторингу, а нерівномірність ураження печінки і дуже незначний об'єм біоптату вносять в діагностику елемент випадковості. Але використання максимально стандартизованих морфологічних критеріїв діагностики дозволяє зневільювати ці недоліки [9, 12, 14, 15].

Високоінформативною, особливо для оцінки динаміки хвороби, є так звана "біохімічна біопсія" печінки, яка базується на визначенні коефіцієнту співвідношення АсАТ/АлАТ. Величина цього коефіцієнту вказує на швидкість прогресування хвороби, обумовлює тактику антивірусної терапії, визначає коло необхідних обстежень, а також призначення пункційної біопсії печінки [5, 6, 8].

Удосконалений метод "біохімічної біопсії" — тест Fibro-Max, який базується на використанні шкали METAVIR, також дозволяє непрямо оцінити гістологічну активність ХГС та ступінь фіброзу. В цьому тесті основними маркерами є α_2 -макроглобулін, гаптоглобін, аполіпопротеїн, білірубін, γ -глутамілтранспептидаза, аланін-амінотрансфераза (АлАТ). Недоліком методу "біохімічної біопсії" є отримання хибних результатів при системних позапечінкових проявах ХГС, при ко-інфекції ХГС та інших вірусних інфекціях, при ХГС з нормальною активністю АлАТ [2, 7].

До неінвазивних методів діагностики, зокрема визначення ступеню фіброзу печінки при ХГС, відноситься діагностика за допомогою апарату "Fibro Scan", який на основі імпульсної еластометрії дозволяє оцінити щільність і стадію фіброзу [7, 12].

Метою даної роботи було вивчення зв'язків між морфологічними і біохімічними характеристиками ХГС та винайдення додаткових ефективних, об'єктивних, простих у виконанні та придатних для моніторингу критеріїв, які б суттєво доповнювали існуючі методи діагностики.