

А.М. Петросян
В.З. Харченко

Крымский государственный
медицинский университет
им. С.И. Георгиевского,
Симферополь, АР Крым,
Украина

ИЗМЕНЕНИЯ ПРОТЕИНАЗИНГИБИТОРНОЙ СИСТЕМЫ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЖЕЛУДКА

Ключевые слова: рак желудка, протеиназы, ингибиторы протеиназ, сыворотка крови, тяжесть заболевания.

Резюме. У 60 первичных больных раком желудка без отдаленных метастазов (М) и с ними исследована сывороточная активность протеиназингибиторной системы до проведения хирургической операции. Установлено, что трипсиноподобная активность сыворотки крови по сравнению со здоровыми людьми достоверно снижена вне зависимости от наличия М. При этом между группами больных существенных различий по уровню изучаемых показателей не выявлено. Зарегистрирована отрицательная корреляционная связь между активностью этих компонентов. Эластазоподобная активность и активность альфа-2-макроглобулина в сыворотке крови снижалась у пациентов с отдаленными М. У этой же группы пациентов выявлена отрицательная корреляционная связь между активностью альфа-1-антитрипсина и альфа-2-макроглобулина. Предложен индекс тяжести, в математической формуле объединяющий активность трех параметров сыворотки крови: трипсиноподобных ферментов, альфа-1-антитрипсина и альфа-2-макроглобулина. Так, индекс тяжести у больных с М в органах выше 77, в то время как у пациентов без отдаленных М он ниже указанной величины.

ВВЕДЕНИЕ

Рак желудка (РЖ) остается по-прежнему одной из главных проблем онкологии. Так, в Украине темпы заболеваемости РЖ занимают одно из ведущих мест среди европейских стран; ежегодно в нашей стране выявляют около 15–16 тыс. новых случаев [1, 2]. Особое значение в клинике придается ранней диагностике и лечению при РЖ, возможности предупредить развитие метастазов (М). При этом при наличии признаков М в регионарных лимфатических узлах показано и радикальное оперативное вмешательство, в то время как при отдаленных М оправданы паллиативные операции, позволяющие лишь улучшить качество жизни пациентов [3]. Современные методы исследования позволяют с высокой точностью определить наличие и степень развития первичной опухоли; однако в настоящее время отсутствует достаточное количество методов для раннего выявления отдаленных М; даже такие прицельные методы, как лапароскопия и лучевая диагностика, позволяют до операции распознать лишь М по брюшине [4]. Поэтому все большее значение придается лабораторным методам, например определению изменений активности сывороточных протеиназ и их ингибиторов в процессе опухолевого роста отдаленного метастазирования. Среди этих энзимов особый интерес представляют наиболее распространенные в организме сериновые протеиназы, в том числе локализованная в нейтрофильных лейкоцитах человека гранулоцитарная эластаза. Попадая в кровяное русло, эластаза может разрушать белки плазмы крови, тем самым нарушая процессы защиты и адапта-

ции [5]. Известно, что прорастание опухоли в окружающие ткани сопровождается локальной секрецией опухолевыми клетками протеолитических ферментов, расщепляющих белки межклеточного матрикса; тем самым создаются более благоприятные условия для инвазии [6]. На активность протеиназ влияют не только скорость их образования, но и их инактивация специфическими ингибиторами [7]. Так, у пациентов с РЖ высокая экспрессия опухолеассоциированного тканевого ингибитора трипсина наиболее выражена на ранних стадиях развития рака, что может служить благоприятным прогностическим фактором [8]; в некоторых научных работах констатируется повышение общей протеолитической активности сыворотки крови, а также рост активности ингибиторов протеиназ — альфа-1-антихимотрипсина (ААХТ), альфа-1-антитрипсина (ААТ) и альфа-2-макроглобулина (АМГ) [9, 10]. Ряд авторов установил повышение сывороточного пула ААТ и ААХТ уже на начальных стадиях РЖ; выявлена положительная корреляция между ростом этих показателей и тяжестью развития болезни; установлено, что выполнение радикальной операции приводит к снижению активности этих ингибиторов, в то время как после паллиативного вмешательства их уровень остается стабильно высоким [11, 12]. По мере развития процесса может изменяться и активность АМГ [13], который взаимодействует с факторами роста и дифференцировки клеток, тем самым, способствуя прогрессии опухоли. Снижение активности АМГ в сыворотке крови может служить критерием повышения зло-

качественности опухоли, которое проявляется инвазивным ростом и развитием М [14].

Задача данного исследования — определение трипсиноподобной (ТПА), эластазоподобной (ЭПА) активности сыворотки крови (СК) больных с РЖ и изучение активности сывороточных ингибиторов — ААТ и АМГ, а также исследование корреляции этих показателей с тяжестью заболевания (в частности с наличием отдаленных метастазов).

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследование включены 60 первичных больных с РЖ, проходивших обследование и лечение в Крымском республиканском клиническом онкологическом диспансере, среди которых 24 женщины (40%) и 36 мужчин (60%); по локализации РЖ: антральный отдел — 22 больных (36,7%), тело — 32 (53,3%), кардиальный и субкардиальный отделы — 4 (6,7%), 2 (3,3%) — с распространением опухоли на антральную часть и тело желудка. Забор крови для исследования производили натощак, из периферической вены, накануне операции в 7–9 ч утра. Контрольную группу составили 23 здоровых человека. Больных после постановки заключительного диагноза разделены на две группы. В 1-ю (29 человек) вошли пациенты без признаков отдаленного метастазирования: с I стадией (Т1N0M0, Т2N0M0) — 3, со II (Т2N1M0, Т3N0M0) — 11, с III (Т3NxM0, Т3N1M0, Т3N2M0, Т4N0M0) — 14, с IV (Т4N2M0) — 1. Во 2-ю группу включены пациенты с РЖ IV стадии с признаками отдаленного метастазирования: 6 — Т3N1M1, 8 — Т3N2M1, 8 — Т4N1M1, 7 — Т4N2M1 и 2 — Т4N3M1 (всего — 31).

Общую ТПА СК трипсиноподобных сериновых протеиназ определяли по скорости расщепления N-альфа-бензоил-L-аргинин-этилового эфира (БАЭЭ), регистрируя прирост оптической плотности при 253 нм [16]. Оценку ЭПА проводили по гидролизу субстрата N-бутилоксикарбонил-L-аланин-p-нитрофенилового эфира (БАНЭ), кинетику расщепления которого определяли по приросту экстинкции при 347,5 нм [17]. Антитриптическую активность сыворотки крови изучали по методу, основанному на подавлении ингибиторами, содержащимися в сыворотке крови (прежде всего ААТ), активности трипсина, остаточные значения которой измеряли по расщеплению БАЭЭ; активность АМГ определяли по уровню расщепленного БАЭЭ трипсином, связавшимся с АМГ, и последующей инактивацией несвязавшегося с АМГ трипсина соевым ингибитором трипсина [18]. Все измерения оптической плотности проводили на спектрофотометре «Termo» (Biomate, Великобритания).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью пакета программ Microsoft Excel (Windows XP). Данные представлены в виде $M \pm m$. Разницу отличий оценивали по критерию Стьюдента и считали достоверной при $p < 0,05$. Анализ корреляции между параметрами

определяли по коэффициенту линейной корреляции Пирсона r , корреляцию считали достоверной при $p < 0,05$ [15].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В обеих группах больных (как с отдаленными М, так и без них) выявлено достоверное снижение по сравнению с контролем СК ТПА (на 33,3%). В группе пациентов с отдаленными М зарегистрировано снижение ЭПА по сравнению с контролем, в то время как у больных без отдаленного М этот показатель оставался без изменений. И в 1-й, и во 2-й группе больных по сравнению с контролем установлено достоверное повышение активности ААТ — на 82,5 и 79,3% соответственно. При исследовании активности ингибитора протеиназ АМГ в 1-й группе по сравнению с группой здоровых людей выявлено незначительное снижение этого показателя, в то время как во 2-й группе он достоверно снизился — на 29,3% (табл. 1).

Таблица 1
Показатели протеиназингибиторной системы СК здоровых людей и больных с РЖ

Группа	Показатель протеиназингибиторной системы СК				
	ТПА, мкМ/мл-мин	ЭПА, %	ААТ, ИЕ/мл	АМГ, ИЕ/мл	
Контроль (практически здоровые люди)	0,48 ± 0,01	100,0	34,8 ± 2,0	4,1 ± 0,2	
Больные с РЖ	1-я без отдаленных М	0,32 ± 0,02 * $p < 0,001$ ** $p > 0,05$	96,5 ± 5,5 * $p > 0,05$ ** $p < 0,05$	63,5 ± 4,1 * $p < 0,001$ ** $p > 0,05$	3,7 ± 0,2 * $p > 0,05$ ** $p < 0,01$
	2-я с отдаленными М	0,32 ± 0,02 * $p < 0,001$	80,4 ± 5,7 * $p < 0,001$	62,4 ± 2,8 * $p < 0,001$	2,9 ± 0,2 * $p < 0,001$

*Достоверность различий по сравнению с контрольной группой;

**достоверность различий между группами больных с РЖ.

Между группами исследуемых пациентов не выявлено разницы по ТПА и ААТ, в то же время зарегистрировано достоверное снижение ЭПА и АМГ в группе больных с отдаленными М по сравнению с группой без М (см. табл. 1).

Установлена отрицательная корреляционная связь между активностью ААТ и ТПА: общий коэффициент линейной корреляции r для всех больных составил $-0,34$ ($p < 0,05$), при этом для 1-й группы — $-0,33$, для 2-й — $-0,37$. У больных с отдаленными М выявлена отрицательная корреляционная связь между ААТ и АМГ: $r = -0,49$ ($p < 0,01$).

Установленная достоверная разница между группами больных по активности АМГ СК тем не менее не позволяет вывести абсолютное число, способное спрогнозировать отдаленное метастазирование еще до оперативного вмешательства и позволить поставить заключительный диагноз. Так, например, при средних величинах 1-й группы $3,7 \pm 0,2$ и 2-й — $2,9 \pm 0,2$ лишь у 6 больных без отдаленных М активность АМГ оказалась выше 5 ИЕ/мл, у остальных полученные результаты находились в тех же пределах, что и у пациентов с отдаленным метастазированием. Поэтому более корректным, на наш взгляд, является использование величины, способной объеди-

нить сразу три параметра, характеризующие активность протеиназингибиторной системы сыворотки крови — ТПА, АМГ и ААТ. Предлагаемый индекс тяжести (ИТ) заболевания больных с РЖ измеряется в абсолютных единицах и выражается следующей формулой:

$$\text{ИТ} = 100 - \left(\frac{\text{ААТ} \times \text{АМГ}}{10} + \text{ТПА} \right)$$

При применении указанной формулы, выявлена достоверная разница между группами больных (табл. 2); в группе пациентов без отдаленных М ИТ составил $76,9 \pm 1,8$, причем только в 48% случаев он был выше 77, в остальных 52% — равен этой величине или ниже ее. Во 2-й группе ИТ составил $82,5 \pm 0,9$, при этом у 85% больных этот показатель был выше 77 и лишь у 15% — незначительно ниже.

Таблица 2

Показатели ИТ у больных с РЖ		
РЖ	Группа	ИТ
		1-я без отдаленных М
	2-я с отдаленными М	$82,5 \pm 0,9$ * $p < 0,01$

*Достоверность различий между группами больных с РЖ.

Поиск сопряженности двух показателей — отдаленного метастазирования и уровня ИТ — проводили на основе анализа четырех статистических групп: а) с наличием отдаленных М и уровнем ИТ ≤ 77 ; б) с наличием отдаленных М и уровнем ИТ > 77 ; в) с отсутствием отдаленного метастазирования и уровнем ИТ ≤ 77 ; г) с отсутствием отдаленного метастазирования и с уровнем ИТ > 77 . Критерий согласия Пирсона χ^2 составил 12,6 при его критическом значении 10,2 ($p < 0,001$), а коэффициент сопряженности Чупрова К при этом составил 0,46, что еще раз подтверждает связь между фактом отдаленного метастазирования и условно принятым уровнем ИТ — 77. Таким образом предлагаемый нами ИТ может помочь в оценке тяжести развития РЖ: его величина меньше 77 с высокой долей вероятности свидетельствует об отсутствии отдаленных М и является благоприятным прогностическим признаком. Напротив, высокие цифры ИТ отражают прогрессирование процесса, в частности отдаленное метастазирование.

Различная активность ингибиторов протеиназ — высокий уровень ААТ и снижение АМГ — свидетельствуют о роли этих белков в патогенезе злокачественного процесса. Так, рост опухоли, ее инвазия, как указывалось выше, сопровождаются активацией компонентов системы протеолиза: в тканях растет активность трипсина, химотрипсина, тромбина, эластазы и коллагеназы, повышается в крови содержание плазмينا и компонентов калликреин-кининовой системы. Рост в крови главного ингибитора этих ферментов — ААТ — свидетельствует об ее усиленной секреции, которая, по сути, является адекватным ответом на повышенную активность протеиназ. Установленная отрицательная корреляционная связь между активностью ААТ и ТПА подтверждает, что у больных с РЖ происходит нарушение баланса в протеиназингибиторной

системе и смещением в сторону повышения активности ингибиторов, что является своеобразным компенсаторным механизмом, способным снизить процесс роста первичной опухоли. Отмечали, что уровень активности ААТ стабильно высокий почти у всех пациентов с РЖ, вне зависимости от наличия регионарных и отдаленных М. Уровень ТПА, напротив, достоверно ниже контроля у пациентов обеих групп, причем степень этого понижения у них практически одинакова. Следовательно, рост опухоли и ее метастазирование в ткани и органы не находят специфического отражения в показателях активности ААТ и ТПА. Возможно, дисбаланс в системе протеаза-ингибитор претерпевает волнообразные изменения: выраженное повышение активности трипсиноподобных ферментов, происходящее во время роста опухолевых клеток, приводит к адекватному повышению активности ингибитора — ААТ, что в свою очередь снижает процессы протеолиза и уровень ТПА. Этим, возможно, объясняется тот факт, что у некоторых больных зарегистрирован уровень ААТ в пределах контрольных цифр и, напротив, более высокие по сравнению со здоровыми людьми показатели ТПА.

Отдаленное метастазирование характеризуется с одной стороны тем, что происходит срыв компенсаторно-приспособительных реакций организма в результате истощения его резервных возможностей, а с другой стороны при прогрессировании болезни растет вклад АМГ в ингибиторный потенциал. Возможно, это еще одна попытка макроорганизма не только блокировать часть протеаз (в частности эластазоподобных), секретлируемых опухолевыми клетками, но и сохранить белки СК. Сами же комплексы АМГ-протеазы не задерживаются в крови, именно поэтому, вероятно, у пациентов с отдаленными М регистрируется снижение сывороточной активности АМГ и ЭПА.

ВЫВОДЫ

1. У больных с РЖ (с отдаленными М и без них) установлено по сравнению со здоровыми людьми достоверное и идентичное снижение ТПА СК; понижение уровня ЭПА СК зарегистрировано только у пациентов с отдаленными М.

2. В обеих группах больных активность ААТ СК достоверно снижена; зависимости изменений этого показателя от регионарного или отдаленного метастазирования не выявлено. Активность АМГ СК достоверно снижена у пациентов с отдаленными М.

3. У всех больных вне зависимости от метастазирования в органы выявлена отрицательная корреляционная связь между активностью ААТ и ТПА: повышение ААТ приводит к снижению ТПА, и наоборот. У больных с отдаленными М определена аналогичная корреляция между активностью ААТ и АМГ.

4. По математической формуле, объединяющей три параметра — ТПА, ААТ и АМГ, предложен ИТ

болезни, по которому установлена достоверная разница между группами больных с отдаленными М и без них: в группе пациентов с IV стадией заболевания подавляющее большинство имело данный индекс выше 77.

ЛИТЕРАТУРА

1. Correa P, Chen V. Gastric cancer. *Cancer Surveys*. 1994; **19–20**: 55–76.
2. Sipponen P, Marshall BJ. Gastritis and gastric cancer — western countries. *Gastroenterol. Clin North Am* 2000; **29**: 579–92.
3. Слинчак СМ. Рак желудка. Киев: Здоров'я, 1972. 200 с.
4. Шаназаров НА. Рак желудка / Под ред проф АВ Важениной / Учебное пособие Уральской Государственной медицинской академии дополнительного образования. Челябинск, 2001. 29 с.
5. Нешкова ЕА. Гранулоцитарные сериновые протеиназы и их действие на калликреин-кининовую систему плазмы крови человека [Автореф дис ... канд биол наук]. Москва, 1994. 18 с.
6. Оглоблина ОГ, Арефьева ТИ. Роль протеолитических ферментов и их ингибиторов в инвазии злокачественных опухолей. *Биохимия*, 1994; (3): 340–52.
7. Харченко ВЗ. Экспериментальное обоснование патогенетической фармакотерапии турникетного шока антипротеиназными средствами [Автореф дис ... д-ра мед наук]. Киев, 1990. 40 с.
8. Wiksten JP, Lundin J, Nordling S, *et al*. High tissue expression of tumour-associated trypsin inhibitor (TATI) associates with a more favourable prognosis in gastric cancer. *Histopathol* 2005; **46** (4): 380–8.
9. Chawla RK, Rausch DJ, Miller FW, *et al*. Abnormal profile of serum proteinase inhibitors in cancer patients. *Cancer Res* 1984; **44** (6): 2718–23.
10. Millan J, Lorenzo A, Gallurt P, *et al*. ROC analysis of diagnostic performance utilizing serum antiproteases in cancer patients. *Int J Biol Markers* 1988; **3** (3): 203–5.
11. Bernacka K, Kuryliszyn-Moskal A, Sierakowski S. The levels of alpha 1-antitrypsin and alpha 1-antichymotrypsin in the sera of patients with gastrointestinal cancers during diagnosis. *Cancer* 1988; **62** (6): 1188–93.
12. Bernacka K, Kuryliszyn-Moskal A, Klimiuk PA. Serum alpha-1-antitrypsin and alpha-1-antichymotrypsin after surgical treatment and during postoperative clinical course of human gastric cancer. *Neoplasma* 1993; **40** (2): 111–6.
13. Осипов ВД. Роль неспецифических опухолевых маркеров и клинико-морфологических показателей в диагностике и лечении предрака и раннего рака гортани [Автореф дис ... д-ра мед наук]. Томск, 2006. 23 с.
14. Баженова ЛГ, Шрамко СВ, Зорина ВН и др. Белки острой фазы (α2-макроглобулин и IgG) в сыворотке крови при воспалительных опухолеподобных поражениях при-

датков матки и опухолях яичников. *Медицина в Кузбассе* 2006; (1): 71–4.

15. Зайцев ВМ, Лифляндский ВГ, Маринки ВИ. Прикладная медицинская статистика. Санкт-Петербург: Фолиант, 2003. 432 с.

16. Пасхина ТС, Доценко ВЛ, Блинникова ЕИ. Калликреиноген сыворотки крови человека. Метод определения и некоторые свойства. *Биохимия* 1973; **38** (2): 420–3.

17. Оглоблина ОГ, Платонова ЛВ, Мясникова ЛВ и др. Активность протеиназ гранулоцитов и уровень кислотостабильных ингибиторов протеиназ в бронхоальвеолярном секрете детей с бронхопатиями различной этиологии. *Вопр мед химии* 1980; (3): 387–92.

18. Нартикова ВФ, Пасхина ТС. Унифицированный метод определения активности α1-антитрипсина и α2-макроглобулина в сыворотке (плазме) крови человека. *Вопр мед химии* 1979; **25** (4): 494–9.

CHANGED PROTEINASE INHIBITOR SYSTEM IN STOMACH CANCER PATIENTS

A.M. Petrosyan, V.Z. Kharchenko

Summary. *In 60 primary stomach cancer patients with and without remote metastases (M), the serum activity of proteinase inhibitor system was assessed before surgery. Trypsin-like activity of the blood serum was shown to be significantly lower compared to healthy subjects, irrespective of M. There were no evidences of considerable differences in terms of the levels of the indicators studied. A negative correlation was established between the activities of these components. Elastase-like activity and alpha-2-macroglobulin activity in the blood serum was lower in patients with remote M. The same group of patients showed a negative correlation between the activity of alpha-1-antitrypsin and alpha-2-macroglobulin. A severity index was suggested to be applied in the mathematical formula for the three blood serum parameters: trypsin-like enzymes, alpha-1-antitrypsin, and alpha-2-macroglobulin. Thus, the severity index in patients with M was 77+, while patients without remote M showed lower values of this index.*

Key Words: stomach cancer, proteinase, proteinase inhibitors, blood serum, severity of disease.

Адрес для переписки:

Петросян А.М.

95062, Симферополь, ул. Куйбышева, 31, кв. 14

E-mail: gtrk@pop.cris.net