

УДК 616.33-006.6-06-085.277-085.841.114-039.75

МИКОЛА ВІЛЛЕНОВИЧ КРАСНОСЕЛЬСЬКИЙ, ЄВГЕН МИКОЛАЙОВИЧ КРУТЬКО,
ОЛЕКСІЙ ВОЛОДИМИРОВИЧ МОВЧАН, СВІТЛАНА МИКОЛАЇВНА ГРАМАТЮК

ДУ «Інститут медичної радіології ім. С. П. Григор'єва НАМН України», Харків

ВИЗНАЧЕННЯ ПРЕДИКТИВНО-ПРОГНОСТИЧНИХ БІОМАРКЕРІВ ДИСБАЛАНСУ МІЖ ЕНЕРГЕТИЧНИМ І ПЛАСТИЧНИМ ПОТЕНЦІАЛАМИ У КЛІТИНАХ КРОВІ ХВОРИХ НА ОНКОПАТОЛОГІЮ

Резюме. Великий інтерес в онкології становить вивчення метаболізму не тільки клітин пухлинної тканини, але і периферичної крові. Це зумовлено тим, що дисметаболичні процеси в клітинах крові викликають розвиток їх дисфункції. В результаті дослідження авторами статті встановлено зміни метаболізму фосфотріозу в клітинах крові, які дозволяють припустити переважне використання фосфотріозу і нейрон-специфічної енолази для енергообміну і продукції аденозинтрифосфату (АТФ).

Встановлено зниження активності гліцерин-3-фосфатдегідрогенази ($p \leq 0,005$), тоді як активність гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази, що характеризує інтенсивність гліколітичного розщеплення глюкози, навпаки, була підвищена ($p \leq 0,01$).

Тобто можна вважати можливим наявність дисбалансу між енергетичним і пластичним потенціалами в клітинах крові онкохворих та використовувати ці показники як маркери.

Ключові слова: рак легенів та шлунково-кишкового тракту, біологічні маркери, комплексне лікування.

Одним із перспективних напрямків, що дозволяють охарактеризувати патофізіологічні механізми розвитку пухлини в організмі, є дослідження особливості метаболічних процесів клітин здорової і пухлинної тканини. Пов'язано це з тим, що всі зміни клітинної генетичної програми реалізуються, в тому числі і через метаболічні процеси. При цьому великий інтерес становить вивчення метаболізму не тільки клітин пухлинної тканини, але і периферичної крові. Це зумовлено тим, що дисметаболичні процеси в клітинах крові викликають розвиток їх дисфункції [1–3].

Так, ризик розвитку дисфункції еритроцитів пов'язують зі зниженням деформабельності еритроцитів, підвищенням жорсткості їх мембран [3, 4, 10]. Відомо, що ці зміни зумовлені зміною складу мембран еритроцитів у результаті порушення пластичних процесів на фоні онкозахворювання.

Однією з потужних ланок канцерогенезу є гіпоксія. Таким чином, можемо припустити, що дисметаболичні процеси в еритроцитах і їх дисфункція можуть опосередковувати порушення мікроциркуляції і тим самим сприяти прогресії пухлини [8, 9].

У роботах деяких науковців було встановлено, що дисметаболичні процеси в лімфоцитах прямо корелюють з розвитком їх дисфункції, зокрема зі зниженням індексу бласттрансформації [9].

Ферменти, відібрані для цього дослідження, каталізують різні шляхи використання гліколізу — як енергоутворюючих, так і пластичних (споживання гліцерин-3-фосфату для синтезу фосфоліпідів, що будують клітинні мембрани). З джерел літератури відомо, що рівень даних ферментів різко підвищується після оперативних утручань з приводу захворювань загального профілю ГЗД, натомість активність ГАФД знижена в рамках енергетичного метаболізму [3].

Для енергообміну еритроцитів гліколіз має центральне значення. Відомо, що дисбаланс пулу аденілат, дефіцит АТФ ведуть до збільшення агрегаційної здатності еритроцитів, зниження їх деформування, підвищення жорсткості мембран. У лімфоцитах порушуються такі функції, як проліферація, цитотоксичність [7, 9, 11].

Одним із суперечливих з точки зору онкології є фермент нейронспецифічна енолаза (НСЕ). З даних літератури [6, 10] відомо, що НСЕ — один із ферментів гліколізу (2-фосфо-D-гліцерато-гідроліаза), що існує у вигляді декількох димеризованих ізоферментів (aa, ab, ay, bb і уу), утворених з трьох субодиниць — a, b та y. Даний фермент був ідентифікований і вивчений в 70–80-х рр. XX століття. За цей період накопичено великий експериментальний і клінічний матеріал, що стосується аналізу НСЕ в біологічних рідинах при різних патологічних станах. У онкології його використовують як онкомаркер дрібноклітинного раку

легенів, а також НСЕ є єдиним відомим нині загальним маркером усіх диференційованих нейронів і належить до внутрішньоклітинних ензимів центральної нервової системи, при цьому рівень даного ферменту, як правило, не є підвищеним у хворих із загальною патологією [3, 6, 11]. Однак на сьогодні не існує комплексного вивчення даного ферменту в ранньому післяопераційному періоді як маркера пошкодження мозку в онкологічних хворих.

Таким чином, аналіз сучасного стану проблеми діагностики онкозахворювань показав значну варіабельність підходів до цього питання, що при досить помірних успіхах свідчить про актуальність наукового пошуку за цим напрямом. Зокрема, визначається гострий дефіцит надійних способів вибору індивідуалізованої програми комплексного лікування, діагностики та прогнозу рецидиву у хворих на онкопатологію. Розв'язання цієї проблеми потребує екстенсивного підходу, що включав би створення і перевірку ефективності хірургічних прийомів, обґрунтування і верифікацію схем вибору протипухлинних хіміопрепаратів, а також тестування і валідацію біомаркерів, придатних для прогнозування ризику рецидивів та ускладнень онкозахворювань у післяопераційному періоді.

Метою дослідження було визначення предиктивно-прогностичних біомаркерів дисбалансу між енергетичним і пластичним потенціалами в клітинах крові хворих на онкопатологію.

МЕТОДИКА ДОСЛІДЖЕННЯ

Обрали три групи хворих з пухлинами шлунково-кишкового тракту і легенів. Досліджували 49 осіб віком 45–65 років, 21 хворого на рак легені (РЛ), 17 — на рак шлунка (РШ), 11 — на рак товстого кишечника (РТК). У всіх обстежених виявили поширені форми пухлинного процесу — Т3–4 N1–2 M0.

Нами була досліджена активність ферментів, що утилізують фосфотріози (гліцерин-3-фосфатдегідрогенази (ГЗД) і гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази (ГАФД)). Активність ГАФД і ГЗД визначалася за швидкістю відновлення НАД⁺, який бере участь у відповідних реакціях як акцептор атомів водню. Активність даних ферментів виражалася в нмоль/хв · л. Концентрацію білка визначали за методом Лоурі.

Визначення вмісту нейрон-специфічної енолази в сироватці крові проводили за допомогою Human Neuron Specific Enolase ELISA Kit (Alpha diagnostic, USA) відповідно до інструкції виробника.

Еритроцити відділяли від плазми центрифугуванням стабілізованої гепарином крові протягом 15 хв при 3000 g (кінцеве розведення гепарин — цільна кров становило 1:100). Суспензію еритроцитів кілька разів промивали охолодженим 0,89 % розчином NaCl. Мембрани еритроцитів виділяли шляхом гіпоосмотичного гемолізу з подальшим осадженням при центрифугуванні 6000 об/хв протягом 10 хвилин.

Концентрацію аденозинтрифосфату (АТФ) у суспензії еритроцитів визначали за методом П. М. Явербаум і співавт., концентрації аденозиндифосфату

(АДФ) і аденозинмонофосфату (АМФ) — за методом Н. U. Bergmeyer.

Статистичну обробку результатів проводили з використанням параметричного t-критерію Стьюдента. Дані представлені як середнє значення ± SE.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

В еритроцитах було встановлено зниження активності гліцерин-3-фосфатдегідрогенази ($p \leq 0,005$) — ферменту, що каталізує утворення гліцерин-3-фосфату, який виступає в ролі проміжної сполуки в біосинтезі тригліцеридів (табл. 1). Активність знижена в середньому в 1,8 разу в порівнянні з контролем.

Активність гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази, що характеризує інтенсивність гліколітичного розщеплення глюкози, навпаки, була підвищена ($p \leq 0,01$) (табл. 1). Це пов'язано з переважним споживанням гліколітичних фосфометаболітів у процесах енергопродукції, тобто гліколітичному синтезі АТФ. До того ж, це може свідчити про підвищення потреби клітини в 2,3-бісфосфогліцераті, який забезпечує процес передачі кисню в тканини.

Встановлено, що в еритроцитах пацієнтів, хворих на рак основних локалізацій, підвищена активність ГАФД в 2,5 разу, порівняно з нормою. Таким чином, у ході дослідження було виявлено, що у хворих на рак посилюється використання фосфотріоз у гліколізі.

Нами були проведені дослідження активності даних ферментів у лімфоцитах крові. У табл. 2 наведені результати активності ГАФД і гліцерин-3-фосфатдегідрогенази в лімфоцитах. Таким чином, в еритроцитах і лімфоцитах крові встановлена загальна тенденція до зниження активності гліцерин-3-фосфатдегідрогенази. Активність гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази в лімфоцитах вища в порівнянні з групою контролю (у нормі активність гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази складала $0,69 \pm 0,02$ нмоль/хв · л).

До того ж зростання активності ГАФД можна пов'язувати не тільки з підвищенням потреби еритроцитів в АТФ, а й зі збільшенням продукції 2,3 дифосфогліцерату, необхідного для надходження кисню до тканин. Паралельне зниження активності ГЗД підтверджує припущення про наростання енергетичних потреб клітини. На підтвердження наших висновків ми спостерігаємо зміни при дослідженні аденолових нуклеотидів. У зв'язку з вищевикладеним потрібно було вивчити рівень аденолових нуклеотидів (аденозинтрифосфату (АТФ), аденозиндифосфату (АДФ), аденозинмонофосфату (АМФ) як маркерів енергетичного дефіциту в онкологічних хворих залежно від локалізації процесу. При аналізі виявлено, що у хворих на РЛ відбувається статистично значуще зниження ($p < 0,001$) в еритроцитах вмісту АТФ в середньому на 56,5 % порівняно з контролем. Приблизно така сама динаміка спостерігалася і у хворих на РШ і РТК, а саме на 67 %. Групи пацієнтів, що хворіли на РШ і РТК, не мали між собою достовірної різниці.

За вмістом АТФ групи хворих на РШ і РЛ також достовірно відрізнялися. Слід зазначити, що на такому

Таблиця 1

Активність гліцерин-3-фосфатдегідрогенази і гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази в еритроцитах крові у пацієнтів з онкологічними захворюваннями

| Локалізація новоутворення | Шлунок (n = 17) | Товстий кишечник (n = 11) | Легені (n = 21) | Норма (n = 20) |
|--|-----------------|---------------------------|-----------------|----------------|
| Активність ГЗД в еритроцитах нмоль/хв · л | 6,83 ± 0,05* | 5,32 ± 0,45* | 5,7 ± 0,15* | 12,25 ± 1,13 |
| Активність ГАФД в еритроцитах нмоль/хв · л | 5,75 ± 0,08* | 8,95 ± 0,6* | 7,29 ± 0,26* | 5,16 ± 0,27 |

Примітка: * p < 0,001 у порівнянні з групою контролю.

Таблиця 2

Активність гліцерин-3-фосфатдегідрогенази і гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази в лімфоцитах крові у пацієнтів з онкологічними захворюваннями

| Локалізація новоутворення | Шлунок (n=17) | Товстий кишечник (n = 11) | Легені (n = 21) | Норма (n = 20) |
|---|---------------|---------------------------|-----------------|----------------|
| Активність ГЗД в лімфоцитах нмоль/хв · л | 1,13 ± 0,03* | 1,10 ± 0,03* | 1,16 ± 0,05* | 1,55 ± 0,15 |
| Активність ГАФД в лімфоцитах нмоль/хв · л | 2,55 ± 0,04* | 2,95 ± 0,03* | 3,29 ± 0,02* | 0,69 ± 0,02 |

Примітка: * p < 0,001 у порівнянні з групою контролю.

фоні вміст АДФ у пацієнтів із новоутворами легені мав тенденцію до зниження, а у хворих на РШ і РТК, навпаки, визначалося статистично значуще (p < 0,001) підвищення на 22 % порівняно з контролем і на 35 % порівняно з раком кишечника. Рівень АМФ у разі раку легені в порівнянні з контрольною групою достовірно зменшувався на 90 %. При раку шлунка і кишечника спостерігалось ще більш виражене зниження АМФ — майже в 2,5 разу в порівнянні з контролем і на 42 % — з хворими на рак легені.

Таблиця 3

Вміст аденілових нуклеотидів в обстежуваних хворих залежно від локалізації онкологічного процесу (Me [25 %; 75 %])

| Показник | АТФ, ммоль/л | АДФ, ммоль/л | АМФ, ммоль/л |
|------------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|
| Група хворих | | | |
| Рак шлунка | 1,38* [1,27; 1,50] | 1,36** [1,24; 1,51] | 1,64** [1,53; 1,70] |
| Рак товстого кишечника | 1,36* [1,25; 1,51] | 1,34** [1,20; 1,49] | 1,62** [1,51; 1,68] |
| Рак легенів | 1,42 ± 0,13* | 0,81* [0,70; 0,8] | 1,10* [1,03; 1,14] |
| Контроль | 2,25 [2,10; 2,2] | 1,01 [0,93; 1,08] | 0,58 [0,52; 0,69] |

Примітка: * p < 0,001 у порівнянні з групою контролю, # p < 0,001.

У результаті мітохондріальної дисфункції виникає дефіцит макроергів, що викликає погіршення роботи енергозалежних мембранних каналів, зокрема Na⁺-K⁺-АТФ обмінників, Ca²⁺-АТФ обмінників, що призводить до депонування іонів Ca²⁺ у цитозолі з наступною активацією Ca²⁺ залежної ферментної ефекторної стадії апоптозу. Прогресуючий енергодефіцит перемикає енергетичний метаболізм на гліколіз, унаслідок чого відбувається накопичення недоокислених продуктів жирних кислот — ацил-КоА, ацетил-КоА, НАДН · Н із пригніченням піруватдегідрогенази,

зниженням утилізації пірувату і перетворенням його в лактат [2, 12].

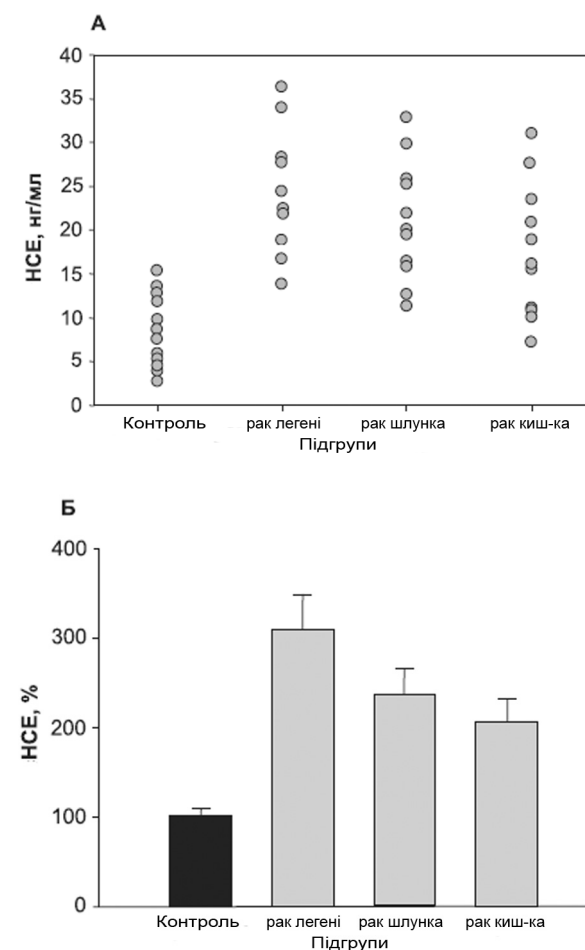


Рис. 1. Рівні нейрон-специфічної енолази у онкологічних хворих залежно від локалізації процесу

У контрольній групі вміст НСЕ склав 7,89 ± 0,85 нг/мл (перед оперативним втручанням). На підставі отриманих даних можна зробити висновки, що підвищений рівень НСЕ відзначається

у 65,3 % онкологічних хворих; збільшений вміст НСЕ частіше зустрічався у хворих на рак легені, що передусім пов'язано з його специфічністю до даної локалізації та використанням його як онкомаркера.

У пацієнтів зі злоякісними пухлинами товстого кишечника виявлена тенденція до зниження рівня НСЕ в порівнянні з раком шлунка, що, можливо, свідчить про пошкодження нейронів мозку у хворих на РШ у ранньому післяопераційному періоді. Причиною цього може виступити той факт, що в умовах неповної ішемії або при спробі неадекватної реперфузії відбувається подальше постачання до мозку енергетичного субстрату (глюкози) для анаеробного гліколізу, а це веде до посилення лактоацидозу і поглиблення

ураження нейронів. Дослідження даного питання потребує подальшого детального підходу в вивченні, що є перспективою нашого подальшого дослідження.

ВИСНОВКИ

Встановлені зміни метаболізму фосфотріозів у клітинах крові, ймовірно, дозволяють припустити переважне використання фосфотріозу і нейрон-специфічної енлази для енергообміну і продукції АТФ, тобто можна вважати можливим наявність дисбалансу між енергетичним і пластичним потенціалами у клітинах крові онкохворих.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Бакурова О. М.* Порушення обміну клітин крові при раці шлунка / О. М. Бакурова, Б. Г. Борзенко, К. О. Миронова // Перспективи медицини та біології. — 2011. — Т. 3, № 1. — С. 45–46.
2. *Зміни активності аденозіндезамінази при підвищеному онкоризику та карциномах різної локалізації* / О. М. Бакурова, О. Ю. Попович, К. О. Миронова и др. // *Наук. вісн. Ужгород. ун-ту. Серія «Медицина»*. — Вып. 3. — 2011. — С. 19–23.
3. *Особенности системы антирадикальной защиты и углеводный обмен эритроцитов у больных язвенной болезнью* / Б. Г. Борзенко, Я. Г. Жебеленко, С. О. Зуйков и др. // *Загальна патологія та патологічна фізіологія*. — 2010. — Т. 5, № 3. — С. 186–189.
4. *Лишневская В. Ю.* Эритроциты при старении / В. Ю. Лишневская, Г. В. Дужак // *Матеріали IV нац. конгресу геронтологів і геріатрів України, 11-13 жовт. 2005 р., м. Київ*. — Проблемы старения и долголетия. — 2005. — Т. 14 (приложение). — С. 157–158.
5. *Boccia S.* Polymorphisms in metabolic genes, their combination and interaction with tobacco and alcohol consumption and risk of gastric cancer: a case-control study in an Italian population / S. Boccia, F. A. Sayed-Tabatabaei, R. Persiani et al. // *BMC Cancer*. — 2007. — P. 117–206.
6. *Chen B.* Glutathione S-transferase M1 gene polymorphism and gastric cancer risk: an updated analysis / B. Chen, Y. Zhou, P. Yang, X. Wu // *Arch Med Res*. — 2010. — P. 41:558–66.
7. *A new score for screening of malnutrition in patients with inoperable gastric adenocarcinoma* / A. Esfahani, M. H. Somi, M. Asghari Jafarabadi et al. // *Jpn J Clin Oncol*. — 2017. — P. 321–329. — Mar 10:1-5. doi: 10.1093/jjco/hyx034.
8. *Kumar R.* A Novel Endoscopic Technique to Diagnose Gastric Cancer in Excluded Stomach after Roux-en-Y Gastric Bypass / R. Kumar, T. C. Pitea // *ACG Case Rep J*. — 2017. — P. 98025–98033. — Mar 15;4:e36. doi: 10.14309/crj.2017.36. Collection 2017.
9. *Rezaei-Tavirani M.* Introducing crucial protein panel of gastric adenocarcinoma disease / M. Rezaei-Tavirani, M. Rezaei-Tavirani, V. Mansouri // *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*. — 2017. — Winter. — N 10 (1). — P. 21–28.
10. *Sang Myung Woo.* Chemotherapy for Biliary Tract Cancer / Sang Myung Woo // *Korean Journal of Gastroenterology*. — 2017. — Mar. 069 (03). P. 172–176.
11. *An important erythrocytes metabolic disorders in gastrointestinal cancer patients* / Y. Zebelenko, S. O. Zuikov, K. O. Mironova et al. // *Acta ABP Biochimika Polonika (Abstracts of the 45th Meeting of the Polish Biochemical Society Wisła, Poland September 20th — 23rd, 2011)*. — 2011. — Vol. 57, Sup. 4. — P. 95.

Стаття надійшла до редакції 13.03.2017.

Н. В. КРАСНОСЕЛЬСКИЙ, Е. Н. КРУТЬКО, А. В. МОВЧАН, С. Н. ГРАМАТЮК

ГУ «Институт медицинской радиологии им. С. П. Григорьева НАМН Украины», Харьков

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРЕДИКТИВНО-ПРОГНОСТИЧЕСКИХ БИОМАРКЕРОВ ДИСБАЛАНСА МЕЖДУ ЭНЕРГЕТИЧЕСКИМ И ПЛАСТИЧЕСКИМ ПОТЕНЦИАЛАМИ В КЛЕТКАХ КРОВИ БОЛЬНЫХ ОНКОПАТОЛОГИЕЙ

Резюме. Большой интерес в онкологии представляет изучение метаболизма не только клеток опухолевой ткани, но и периферической крови. Это обусловлено тем, что дисметаболические процессы в клетках крови вызывают развитие их дисфункции. В результате исследования авторами статьи установлены изменения метаболизма фосфотриоза в клетках крови, которые позволяют предположить преимущественное использование фосфотриоз и нейрон-специфической энлазы для энергообмена и продукции (аденозинтрифосфата (АТФ)). Установлено снижение активности глицерин-3-фосфатдегидрогеназы ($p \leq 0,005$), в то время как активность глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы, характеризующая интенсивность гликолитического расщепления глюкозы, наоборот, была повышена ($p \leq 0,01$).

То есть, можно считать возможным наличие дисбаланса между энергетическим и пластическим потенциалами в клетках крови онкобольных и использовать данные показатели как биомаркеры течения заболевания.

Ключевые слова: рак легких и желудочно-кишечного тракта, биологические маркеры, комплексное лечение.

N. V. KRASNOSELSKY, E. N. KRUTKO, O. V. MOVCHAN, S. N. GRAMATYUK

SI Grigoriev Institute for Medical Radiology of NAMS of Ukraine

DETERMINATION OF PREDICTIVE-PROGNOSTIC BIOMARKERS OF IMBALANCE BETWEEN ENERGY AND PLASTIC POTENTIALS IN BLOOD CELLS OF PATIENTS WITH ONCOPATHOLOGY

An important and dynamically regulated metabolic pathway is glycolysis, an ancient chemical route of carbohydrate utilization that produces ATP, NADH and intermediate metabolites for the synthesis of nucleotides, fatty acids and amino acids. The inhibition of triosephosphate isomerase in glycolysis by the pyruvate kinase substrate phosphoenolpyruvate results in a newly discovered feedback loop that counters oxidative stress in cancer and actively respiring cells.

Reduced activity of glycerol-3-phosphate dehydrogenase ($p \leq 0.005$), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity, which characterizes the intensity of glycolytic cleavage of glucose, was, on the contrary, increased ($p \leq 0.01$).

In other words, we can assume the possible presence of imbalance between energy and plastic potentials in red blood cells of cancer patients and to use these indicators as biomarkers of the disease.

Keywords: lung and gastrointestinal tract cancer, biological markers, comprehensive treatment.

Контактна інформація:

Мовчан Олексій Володимирович

мол. наук. співробітник відділення онкохірургії ДУ ІМП НАМН України

вул. Пушкінська, 82, м. Харків, 61024, Україна

тел. +38 (050) 202-59-54

e-mail: aleexey-med@mail.ru