

УДК 616.5-006.6:616.15-07:577.152.34

© Коллектив авторов, 2012.

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ПРОТЕИНАЗ-ИНГИБИТОРНОГО ПОТЕНЦИАЛА У ПАЦИЕНТОВ С ДИСПЛАСТИЧЕСКИМИ НЕВУСАМИ И МЕЛАНОМОЙ КОЖИ

Д.В. Прохоров, О.А. Притуло, Л.В. Анисимова, А.В. Кубышкин

ГУ «Крымский государственный медицинский университет имени С. И. Георгиевского», г. Симферополь.

COMPARATIVE STUDY OF PROTEINASE-INHIBITORY CAPACITY IN PATIENTS WITH DYSPLASTIC NEVI AND MELANOMA SKIN

D.V. Prokhorov, O.A. Pritulo, L.V. Anisimova, A.V. Kubyshkin

SUMMARY

The state of proteinase-inhibitory capacity of 31 patients with dysplastic nevi, and 35 patients with melanoma of the skin. Found that malignant neoplastic process leads to a unidirectional increase in the activity of proteinases and their inhibitors.

ПОРІВНЯЛЬНЕ ВИВЧЕННЯ ПРОТЕЇНАЗ-ІНГІБІТОРНОЇ ПОТЕНЦІАЛУ У ПАЦІЄНТІВ З ДИСПЛАСТИЧНИ НЕВУСИ І МЕЛАНОМУ ШКІРИ

Д.В. Прохоров, О.О. Притуло, Л.В. Анісімова, А.В. Кубишкін

РЕЗЮМЕ

Досліджено стан протеїназ-інгібіторного потенціалу у 31 пацієнта з диспластичними невусами і 35 пацієнтів з меланоמוю шкіри. Встановлено, що злоякісний пухлинний процес призводить до однонаправленої збільшення активності протеїназ та їх інгібіторів.

Ключевые слова: меланома кожи, протеиназы, ингибиторы протеиназ.

Изучение протеолитических ферментов при злокачественном росте началось давно. Их роль при неоплазии еще полностью не выяснена, но можно отметить, что при опухолевом росте часто увеличивается протеолитическая активность. Прямых доказательств участия протеолитических ферментов в стимулировании опухолевого роста пока не получено, однако имеется множество косвенных свидетельств о связи процессов протеолиза и канцерогенов. К ним относятся: увеличенная протеолитическая активность в трансформированных клетках при любой локализации злокачественных новообразований у человека, способность трансформированных клеток *in vivo* разрушать межклеточные контакты, наличие корреляции между протеолитической активностью раковых клеток и их инвазивностью, локализация протеиназ на или близко к поверхности трансформированных клеток, способность протеолитических ферментов стимулировать клеточную пролиферацию, подавление ингибиторами протеиназ опухолевого роста у животных [1, 3, 6].

Современные представления о роли протеолитических ферментов в генезе и инвазивности опухолей можно обобщить следующим образом [7, 8, 9]:

1. Протеиназы из опухолевых клеток *in vivo* могут разрушать нормальную архитектуру ткани, облегчая инфильтрацию опухолевых клеток в ткани хозяина.

2. Протеолитические ферменты, как эндогенные так и экзогенные, способны удалять с поверхности клеток определенные белки, что приводит к

ликвидации контактного торможения роста и изменению адгезивных свойств клеток.

3. Протеиназы, выделяемые клетками новообразований, либо находящиеся в цитоплазматической мембране, расщепляют высокомолекулярные соединения тканей хозяина и обеспечивают раковые клетки питательными веществами, необходимыми для опухолевого роста.

4. Кислые протеиназы, секретируемые из опухолевой ткани в интерстициальную жидкость, могут разрушать первичные мембраны капилляров, способствуя проникновению раковых клеток через стенки сосудов к тканям хозяина и образованию метастазов.

5. Протеолитические ферменты способны ослаблять антигенные свойства раковых клеток, расщепляя определенные участки, ответственные за иммуноспецифичность, а так же модифицировать иммуноглобулины таким образом, что они теряют свою защитную функцию против раковых антигенов.

Протеиназы опухолей могут воздействовать как на сами опухолевые клетки, так и на их взаимоотношения с организмом-опухоленосителем различными путями. Эти механизмы взаимно не исключают друг друга и каждый из них в свое время может играть определенную роль в зависимости от типа опухоли. Дальнейшее изучение роли этих ферментов в злокачественном перерождении имеет теоретическое и практическое значение [1, 5].

Ингибиторы протеолиза или антипротеиназы содержатся в тканях и крови и являются одним из механизмов защиты организма от протеолитических

ферментов эндогенного и экзогенного происхождения. Нарушение равновесия протеиназы-ингибиторы протеиназ приводят к возникновению различных патологических состояний. В клинической и экспериментальной онкологии параллельно исследованиям протеолитических ферментов ведется интенсивное изучение регуляторов их действия – ингибиторов протеиназ [1, 5, 6, 9].

Цель исследования – провести сравнительный анализ показателей протеиназ-ингибиторной системы в сыворотке крови и в коже пациентов с диспластическими невусами и меланомой кожи.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 65 пациентов КРУ «Клинический онкологический диспансер» (г. Симферополь) из них – мужчин 29 и женщин 36 в возрасте от 42 до 83 лет (средний возраст 54,16±3,02 года) из них у 31 пациента верифицирован диагноз-диспластический невус (в количестве от 1 до 6) и у 35 меланома кожи ($T_{1-3} N_0 M_0$). Контрольную группу составили 20 здоровых людей. Материалом исследования служила сыворотка крови больных и супернатанты кожных гомогенатов. Определение трипсиноподобной активности (ТПА) осуществляли путем измерения скорости отщепления N-бензоил-L-аргинина от синтетического субстрата этилового эфира N- α -бензоил-L-аргинина (БАЭЭ). Определение эластазоподобной активности проводили по гидролизу синтетического субстрата N-t-вос-аланил-

p-нитрофенилового эфира (БАНФЭ). Определение концентрации альфа-1-ингибитора протеиназ (α 1-ИП) и кислотостабильных ингибиторов (КСИ) осуществляли по выявлению торможения расщепления трипсином БАЭЭ. Для определения кислотостабильных ингибиторов (КСИ), пробы предварительно обрабатывали для осаждения кислотолабильных белков. [1]. Концентрацию белка определяли методом Лоури [2]. Статистическая обработка полученных данных проведена с использованием методов вариационной статистики с вычислением средних величин (M) и стандартной ошибки среднего значения (m), достоверными считали показатели при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные исследования показали, что в сыворотке крови пациентов с диспластическими невусами достоверных изменений показателей протеиназ-ингибиторной системы не выявлено, в то время как в группе пациентов с меланомой кожи показатели были достоверно изменены (ЭПА+77,02%, $p < 0,001$; ТПА+137,23%, $p < 0,01$; КСИ+41,89%, $p < 0,001$; АТА+71,96%, $p < 0,01$) (табл. 1). При анализе показателей, полученных при исследовании операционного материала установлены минимальные изменения в случаях с диспластическим невусом, а в случаях с меланомой изменения были достоверными (ЭПА+52,74%, $p < 0,001$; ТПА+69,89%, $p < 0,001$; КСИ+29,78%, $p < 0,05$;

Таблица 1

Сравнительный анализ показателей протеиназ-ингибиторной системы в СК у пациентов с диспластическими невусами и меланомой кожи

Группа	ЭПАмкмоль/ (мл.мин)	ТПАНмоль/ (мл.мин)	КСИ мкмоль/г	АТА, /мл
Контроль, n=20	0,196±0,2	0,22±0,03	7,8±0,2	29,3±1,6
Невус, n=31	0,193±0,02	0,225±0,02	7,5±0,2	29,3±1,1
Меланома, n=35	0,35±0,02***	0,522±0,06***	11,1±0,4***	50,3±1,2***

Примечание: * - показана достоверность отличия по отношению к контрольной группе; ** - показана достоверность отличия между группами (меланома и невус).

Таблица 2

Сравнительный анализ показателей протеиназ-ингибиторной системы в коже у пациентов с диспластическими невусами и меланомой кожи

Группа	ЭПАмкмоль/ (мл.мин)	ТПАНмоль/ (мл.мин)	КСИ мкмоль/г	АТА, /мл
Контроль, n=20	22,8±1,9	10,7±0,9	0,116±0,01	0,09±0,09
Невус, n=31	25,4±0,9	12,93±1,1	0,129±0,01	0,105±0,01
Меланома, n=35	35,0±1,1***	18,2±1,8*	0,151±0,02*	0,161±0,01***

Примечание: * - показана достоверность отличия по отношению к контрольной группе; ** - показана достоверность отличия между группами (меланома и невус).

АТА+70,93%, $p < 0,001$) (табл.2). Таким образом, меланома кожи приводит к более выраженным изменениям в протеиназ-ингибиторной системе как в сыворотке крови, так и в ткани меланомы. Дальнейшее изучение роли неспецифических

протеиназ в формировании опухолевых процессов кожи может позволить разработать диагностические и прогностические критерии диагностики и лечения кожных новообразований.

ВЫВОДЫ

1. Развитие меланомы кожи сопровождается однонаправленными изменениями показателей протеиназ-ингибиторной системы, что проявляется повышением активности протеиназ и их ингибиторов как в сыворотке крови пациентов, так и в ткани меланомы кожи.

2. Изученные показатели могут использоваться в качестве дополнительных неспецифических критериев для дифференциального диагноза и прогноза злокачественных меланоцитарных новообразований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кубышкин В. А. Изменения показателей протеиназ-ингибиторной системы крови при лучевой терапии злокачественных опухолей // Экспериментальна і клінічна медицина. – 2010. – № 2. – С. 104 – 106.

2. Методи визначення активності неспецифічних протеїназ і їх інгібіторів у сироватці крові і біологічних рідинах (Методичні рекомендації) / Кубышкин А.В., Харченко В.З., Семенець П.Ф., Алиев Л.Л., Фомочкіна І.І., Анисимова Л.В. – Київ, 2010-28с.

3. Оглобина О. Г., Арефьева Т. И. Роль протеолитических ферментов и ингибиторов в

инвазии злокачественных опухолей. Биохимия, 1994; № 3. - С. 340 – 352.

4. Скоупс Р. Методы очистки белков / Скоупс Р. [пер. с англ.] – М.: Мир, 1985. – 358 с.

5. Nomura T. Involvement of cathepsins in the invasion, metastasis and proliferation of cancer cells / T. Nomura, N. Katunuma // J. Med. Invest. – 2005. – V. 52 (1–2). – P. 1–9.

6. Proteolytic-antiproteolytic balance and its regulation in carcinogenesis / E. Skrzydlewska, M. Sulkowska, M. Koda, S. Sulkowski // World J. Gastroenterol. – 2005. – № 11 (9). – P. 1251–1266.

7. Rubin H. Systemic effects of cancer: Role of multiple proteases and their toxic peptide products / H. Rubin // Med. Sci. Monit. – 2005. – № 11 (7). – P. 221 – 228.

8. Sondak V. K., Taylor J. M., Sabel M. S. et al. Mitotic rate and younger age are predictors of sentinel lymph node positivity: lessons learned from the generation of a probabilistic model // Ann. Surg. Oncol. – 2004. – Vol. 11. – P. 247 – 258.

9. Sun Z. Role of imbalance between neutrophil elastase and alpha 1-antitrypsin in cancer development and progression / Z. Sun, P. Yang // The lancet oncology. 2004. – № 5. – P. 182 – 190.