

ТРИПСИНОВЫЕ ПРОТЕИНАЗЫ В ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ДОБРОКАЧЕСТВЕННЫХ, ПЕРВИЧНЫХ И ВТОРИЧНЫХ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Кит О.И., Франциянц Е.М., Козлова Л.С., Росторгуев Э.Е., Кавицкий С.Э.

ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, Ростов-на-Дону, e-mail: super.gormon@yandex.ru

Изучали изменения активности сериновых протеиназ трипсинового типа в плазме крови больных для определения возможности дифференциальной диагностики опухолей головного мозга. Спектрофотометрическим методом исследовали кинетику общей активности трипсиновых протеиназ (АТН) в плазме крови 164 больных: 37 – с доброкачественными опухолями головного мозга, 74 – с первичными злокачественными (глиобластомы, астроцитомы) и 53 – с метастазами в головной мозг рака различной локализации. Гистологический контроль удалённой ткани осуществлялся во всех случаях. Установлено, что общая АТН в плазме крови больного до операции, соответствующая норме, позволяет использовать этот показатель в качестве вспомогательного лабораторного теста при диагностике доброкачественной опухоли головного мозга. При повышении общей АТН от 3,8 до 5,3 раз, относительно нормы доноров, этот вспомогательный лабораторный тест уточняет диагностику первичной злокачественной опухоли головного мозга. При повышении общей АТН от 5,9 до 9,4 раз, относительно нормы доноров, этим тестом подтверждается диагностика вторичной злокачественной опухоли головного мозга (метастаза).

Ключевые слова: опухоли головного мозга, протеолиз, дифференциальная диагностика.

TRYPsin-LIKE PROTEINASES IN DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF BENIGN AND PRIMARY AND SECONDARY MALIGNANT TUMORS OF THE BRAIN

Kit O.I., Frantsiyants E.M., Kozlova L.S., Rostorguev E.E., Kavitskiy S.E.

Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, e-mail: super.gormon@yandex.ru

Changes in activity of trypsin-like serine proteinases in the blood serum of patients were studied to determine the possibility of the differential diagnosis of brain tumors. Kinetics of the total tryptic proteinase activity (TPA) was studied by spectrophotometry in the blood plasma of 164 patients: 37 – with benign brain tumors, 74 – with primary malignant tumors (glioblastomas, astrocytomas) and 53 – with brain metastases originating from different cancers. All excised tissues were controlled histologically. The total TPA in the blood plasma before the surgery, similar to the normal value, can be used as an accessorial laboratory test in the diagnosis of benign brain tumors. When the total TPA exceeds the norm by 3.8-5.3 times, this accessorial laboratory test refines the diagnosis of primary malignant brain tumors. When the total TPA is elevated by 5.9-9.4 times compared to the norm, the test confirms the diagnosis of secondary malignant brain tumors (metastases).

Keywords: brain tumors, proteolysis, differential diagnosis.

При развитии злокачественной опухоли в организме активируется эндогенный протеолиз [11,12]. Злокачественные опухоли также выделяют в окружающую среду свои метаболиты, в их числе огромный перечень протеолитических ферментов, которые оказывают токсическое влияние на белки и клетки организма-носителя. Активность ферментов, синтезируемых и секретируемых злокачественной опухолью, в большинстве случаев не контролируется эндогенными ингибиторами [3, 12]. Факт активации протеиназ трипсинового типа при злокачественных новообразованиях давно доказан [5,9-11].

При доброкачественных новообразованиях не происходит резкого подъёма протеолитической активности, т.к. эти опухоли инкапсулированы и чаще всего не вступают в

метаболический конфликт с организмом носителя, по крайней мере, до возможного их озлокачествления.

Целью настоящего исследования являлось изучение изменений активности сериновых протеиназ трипсинового типа в плазме крови больных для определения возможности дифференциальной диагностики опухолей головного мозга с помощью этого показателя.

Материалы и методы

Дизайн исследования был одобрен этическим комитетом ФГБУ «РНИОИ». Обязательным условием включения в обследование было добровольное информированное согласие всех больных. Исследована плазма крови 164 больных, поступивших на оперативное лечение в РНИОИ: 37 – с доброкачественными опухолями головного мозга, 74 – с первичными злокачественными (глиобластомы, астроцитомы) и 53 – с метастазами в головной мозг рака различной локализации. За 2–5 дней до операции у больного производилось взятие крови в стандартную пластиковую пробирку с 3,8 % цитратом натрия (голубая крышка) в соотношении 9:1 для получения цитратной плазмы крови. Цитратную кровь центрифугировали, получали цитратную плазму и использовали её для определения общей активности трипсиноподобных протеиназ (АТП) в тот же день. Определение проводили унифицированным кинетическим методом [7]. Для проведения анализа необходимо 30 мкл бесклеточной плазмы крови. Расчёт результата производили по формуле, указанной в описании метода, в миллиэстеразных единицах на 1 мл исследуемой жидкости за 1 минуту реакции: мЕ/мл по системе СИ. Одна мЕ/мл соответствует ферментативному гидролизу 1 мкмоль синтетического субстрата N- α -бензоил-L-аргинина этилового эфира (БАЭЭ) за 1 минуту. Определение не требует высокой квалификации персонала, для проведения анализа требуется 40 минут и обычное лабораторное оборудование.

Статистическую обработку осуществляли с помощью сертифицированной программы Statistika 10, достоверность различий определяли, используя t-критерий Стьюдента. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Результаты, полученные после определения АТП в плазме крови больных, сравнивали с нормой. Нормой считали величину АТП в плазме крови здоровых доноров, полученную с Ростовской-на-Дону станции переливания крови. У доноров (таблица ниже) АТП плазмы крови колебалась в пределах от 246,0 мЕ/мл до 414,0 мЕ/мл (в среднем $305,1 \pm 16,9$ мЕ/мл). Гендерных и возрастных различий у доноров не установлено.

Активность трипсиноподобных протеиназ в плазме крови больных, имеющих новообразования головного мозга различного гистогенеза

Показатель	Доноры	Доброкачеств. опухоль	Злокачественная опухоль	
			Первичная	Вторичная (метастаз)
АТП мЕ/мл (M±m)	305,1±16,9	333,0±27,1	1331,0±102,4 ¹	2227,0±174,1 ¹
Отличия от нормы		1,1±0,1	4,4±0,3 ¹	7,3±0,5 ¹

Примечание: ¹ – различия достоверны, относительно данных группы здоровых доноров ($p < 0,01$).

У 37 больных из 164 (22,6 %) активность трипсиноподобных протеиназ была в пределах 258–402 мЕ/мл (в среднем 333,0±27,1 мЕ/мл), что практически не отличалось от нормы здоровых доноров (табл.). После удаления опухоли головного мозга и гистологического исследования операционного материала полученные заключения во всех 37 случаях констатировали доброкачественное новообразование головного мозга.

У 74 больных из 164 (45,1 %) активность трипсиноподобных протеиназ была в пределах 1158–1626 мЕ/мл (в среднем 1331,0±102,4), что превышало норму доноров 3,8–5,3 раз (в среднем 4,4±0,3). После удаления опухоли головного мозга и гистологического исследования операционного материала полученные заключения во всех 74 случаях констатировали первичные злокачественные опухоли головного мозга.

У 53 больных из 164 (32,3 %) активность трипсиноподобных протеиназ была в пределах 1794–2868 мЕ/мл (в среднем 2227,0±174,1), что превышало норму доноров от 5,9 до 9,4 раз (в среднем 7,3±0,5). После удаления опухоли головного мозга и гистологического исследования операционного материала полученные заключения во всех 53 случаях констатировали вторичные злокачественные опухоли головного мозга (метастазы).

Анализ полученных данных позволил сделать вывод: регистрируемая до операции величина АТП плазмы крови у больных, имеющих новообразования головного мозга, во всех случаях совпадала с результатами гистологического анализа, полученного после изучения операционного материала. Величина АТП, находящаяся в пределах нормативных значений, указывает на неагрессивную (доброкачественную) природу новообразования головного мозга (подтверждено гистологическими заключениями). Повышенная от 3,8 до 5,3 раз величина АТП (табл.) свидетельствует о том, что новообразование является первичным злокачественным, что подтверждено гистологическим анализом операционного материала. Повышение АТП от 5,9 до 9,4 раз позволяет предполагать вторичное злокачественное новообразование (метастаз), что также подтверждалось гистологическим анализом операционного материала во всех случаях.

На начальном этапе инициации протеолиза практически всегда решающим звеном является активация трипсиноподобных ферментов, которая усиливает действие других протеиназ и биологически активных веществ. Протеиназы трипсинового типа серинового ряда имеют преимущество в биохимических взаимодействиях в связи с небольшими энергетическими затратами [4,11] и поэтому первыми становятся участниками патологического процесса. Большинство трипсиноподобных протеиназ серинового ряда входят в число соединений, участвующих в острофазовом ответе и способных первыми дать информацию об изменениях в системе гемостаза. Протеиназы трипсинового типа серинового ряда включают большой перечень узко- и широко специализированных белков, которые содержатся в крови и тканях, освобождаются из клеток при дегрануляции.

Активирующие факторы (калликреины, токсины) превращают трипсиноген в трипсин, который, в свою очередь, становится активатором проферментов не только трипсинового типа, но и многих других. Избыточное образование активных протеиназ всегда является потенциально опасным. Трипсиноподобные ферменты лизируют клеточные мембраны, способствуют выходу лизосомных гидролаз и углублению клеточных деструкций. Трипсиноподобные ферменты вызывают протеолитический некробиоз клеток, что приводит к повреждению стенок сосудов, кровоизлияниям и способствует быстрому распространению ферментного аутолиза в поражённом органе и за его пределами [6]. Патологический процесс приобретает лавинообразный характер, скорость которого зависит от соотношения механизмов активации протеолиза и его ингибирования. Протеолитическая активность при патологии, при любом пути активации, способствует развитию воспаления и неоангиогенеза [11].

Ранее уже предпринимались попытки уточнения диагноза путём определения активности гидролитической системы в плазме и иммунокомпетентных клетках крови больных со злокачественными и доброкачественными новообразованиями мозга [8]. Материалом для исследований служили плазма крови, лимфоциты и нейтрофилы крови больных с анапластическими глиомами и менигиомами, в которых определялись активность катепсина Д, общая антитриптическая активность и активность кислотостабильных ингибиторов протеиназ, активность кислой и щелочной фосфатаз. Авторами установлено, что при злокачественных новообразованиях основные нарушения в функционировании отдельных звеньев гидролитической системы наблюдались в лимфоцитах крови, а при доброкачественном процессе – в нейтрофилах. Однако авторы не ставили своей целью разработку способа диагностики злокачественных и доброкачественных новообразований головного мозга. Используемые методы не применялись для дифференциальной диагностики доброкачественных, первичных и

вторичных злокачественных опухолей головного мозга.

Другой пример касается определения функционального состояния опухолей [2]. Авторы посредством позитронной эмиссионной томографии (ПЭТ), с использованием различных радиофармпрепаратов (РФП), предоставили интересную информацию об определении функционального состояния опухолей. По скорости транспорта аминокислот, участвующих в делении ядра клетки и формировании цепей ДНК, М.Б. Долгушин и соавторы [2] смогли оценить пролиферативную активность тканей головного мозга. Низкий уровень поглощения аминокислот в нормальной ткани головного мозга при использовании данных РФП в ПЭТ позволил авторам чётко отграничить активно пролиферирующую ткань злокачественной опухоли от нормальной ткани головного мозга. Методика двухэтапного ПЭТ-сканирования с ¹⁸F-Холином головного мозга у больных с внутримозговыми опухолями позволила авторам определять степень их злокачественности, которая зависела от уровня накопления РФП на первом и втором этапах определения. Метод действительно может иметь прогностическое значение при диагностике опухолевой активности новообразований головного мозга. Однако М.Б. Долгушин и соавт. ставили своей целью только оценить диагностическую ценность ПЭТ с ¹⁸F-Холином у больных с глиальными опухолями головного мозга и им это удалось, т.к. предложенным методом можно определять границы имеющейся опухоли. В задачу авторов не входил поиск критерия дифференциальной диагностики между первичными и вторичными злокачественными новообразованиями, а также доброкачественными опухолями головного мозга, использованный метод не применялся для достижения означенной цели. К тому же необходимость использования различных радиофармпрепаратов повышает степень токсического воздействия на организм больного при обследовании.

В.А. Балязиным и соавторами [1] описан способ диагностики глиальных опухолей различной степени злокачественности. Суть его состоит в следующем. При исследовании сыворотки крови больного ставили реакцию пассивной гемагглютинации с доброкачественным, анапластическим и глиобластомным эритроцитарными диагностикумами с полиантигенными препаратами тканей соответствующих глиальных новообразований. При наличии положительных результатов с доброкачественным и анапластическим диагностикумом или только с доброкачественным диагностировали доброкачественные глиальные опухоли, при наличии положительных реакций со всеми диагностикумами диагностируют злокачественные опухоли – анапластические глиомы, а при наличии положительных реакций с анапластическим и глиобластомным диагностикумами – злокачественные опухоли – глиобластомы. Авторам удавалось диагностировать доброкачественные глиальные опухоли, а в группе злокачественных опухолей

дифференцировать анапластические глиомы и глиобластомы. Однако этот способ специфичен только в отношении глиальных опухолей. Способ не применялся для дифференциальной диагностики любой злокачественной опухоли головного мозга от метастазов в головной мозг и доброкачественной опухоли головного мозга любого происхождения. Кроме того, способ достаточно трудоёмок, требует наличия специального оборудования, хорошо обученного персонала, продолжительность определения даже без предварительной подготовки не менее 6 часов.

Очевидно, что ни один из используемых ранее критериев не позволяет осуществлять уточнение и/или подтверждение дифференциального диагноза доброкачественных, первичных и вторичных злокачественных опухолей головного мозга. В изученной литературе также не обнаружилось сведений о возможности использования дополнительного критерия в виде простого лабораторного теста в единовременной дифференциальной диагностике доброкачественных, первичных и вторичных злокачественных опухолей головного мозга.

Описанным способом был поставлен дифференциальный диагноз 164 пациентам: 37 – доброкачественная опухоль головного мозга, 74 – первичная злокачественная опухоль головного мозга и 53 – метастатическая опухоль головного мозга. Во всех случаях получено гистологическое подтверждение. Специфичность предлагаемого способа для подтверждения дифференциальной диагностики опухолей головного мозга для доброкачественных опухолей 97,2 %, для первичных злокачественных опухолей – 98,6 % и для вторичных злокачественных опухолей – 98,1 %.

Эффективность вспомогательного лабораторного теста в дифференциальной диагностике доброкачественных, первичных злокачественных и метастатических опухолей головного мозга заключается в возможности уточнения и/или подтверждения дифференциального диагноза новообразования головного мозга до операции. Это позволит обеспечить наиболее эффективную медикаментозную и техническую подготовку к оперативному лечению больного, имеющего новообразование головного мозга, и сократить сроки пребывания больного в стационаре.

Вывод

Активность сериновых протеиназ трипсинового типа плазмы крови является информативным вспомогательным лабораторным тестом, который поможет в уточнении и/или подтверждении дифференциального диагноза опухолей головного мозга.

Список литературы

1. Балязин В.А., Москаленко Е.П., Пахарина Е.В., Шепелева Л.П. Способ диагностики доброкачественных и злокачественных глиальных опухолей. Патент № 2154830. Опубликовано 20.08.2000.
2. Долгушин М.Б., Оджарова А.А., Тулин П.Е. и др. ПЭТ с 18F-холином в комплексной диагностике опухолей головного мозга. Мат. конф. «Лучевая диагностика в онкологии. Новые диагностические лучевые технологии в онкологии» 06-08 ноября, 2014 г. Учебно-методические материалы. Изд. «Человек и его здоровье». ISBN 978-5-9905495-3-1.
3. Зорин Н.А., Зорина В.Н., Зорина Р.М. Роль альфа-2-макроглобулина при онкологических заболеваниях // Вопросы онкологии. – 2004. – 50(5): 515-519.
4. Кондранина Т.Г., Горин В.С., Григорьев Е.В. и др. Белки острой фазы воспаления и маркеры эндотоксемии, их прогностическая значимость в гинекологической практике // Российский вестник акушера-гинеколога. – 2009; (3): 26-30.
5. Маслов А.А. Франциянц Е.М., Козлова Л.С., Малинин С.А. Трипсиноподобные протеиназы, кининовая система и ингибиторы в плазме крови больных при раке желудка и лимфоме селезенки. // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – № 10-1. – 2014 год. Биологические науки. Фунд. и прикладн. пробл. мед. и биол., ОАЭ (ДУБАЙ) 16–23 октября 2014 г. – С. 127 (дата обращения 2014-08-15).
6. Мерзликин Н.В. и др. Панкреатит: монография / под ред. профессора Н.В. Мерзликина. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014.
7. Пасхина Т.С. Определение компонентов кининовой системы: методические рекомендации. – М., 1987.
8. Франциянц Е.М., Балязин В.А., Сагертьянц Э.В. и др. Гидролитическая активность плазмы и иммунокомпетентных клеток крови больных с опухолями мозга // Нейрохирургия. – 2001; (2): 39-42.
9. Франциянц Е.М., Козлова Л.С., Джабаров Ф.Р. и др. Исследование трипсиноподобных протеиназ и их ингибиторов в плазме крови больных раком носоглотки в динамике лучевого лечения // Паллиативная медицина и реабилитация. – 2013; (1): 31-36.
10. Франциянц Е.М., Козлова Л.С., Горбунова Т.А., Чугунова Н.С. Изучение трипсиноподобных протеиназ и ингибиторов ликвора при лечении злокачественных глиом локальной химиотерапией // Межд. журн. прикладн. и фунд. исслед. (мат. конф. «Фундаментальные исследования», Израиль (Тель-Авив, 16–23 октября 2012). 2012; (10): 107.
11. Schuliga M. The inflammatory actions of coagulant and fibrinolytic proteases in disease. *Mediators Inflamm.* 2015: 437695. doi: 10.1155/2015/437695. Epub. 2015 Mar. 24. Review.

12. Wolf Katarina et. al. Multi-step pericellular proteolysis controls the transition from individual to collective cancer cell invasion. *Nature Cell Biol.* 2007; 9(8): 893-904.