

СЕРПИНЫ В ГИПЕРПЛАСТИЧЕСКИХ ТКАНЯХ ТОЛСТОЙ КИШКИ

Кит О.И.¹, Франциянц Е.М.¹, Козлова Л.С.¹, Терпугов А.Л.²

¹ ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону

² МЛПУЗ «Городская больница № 6», г. Ростов-на-Дону.

SERPINS IN HYPERPLASTIC COLON TISSUE

Kit O.I.¹, Frantsiyants E.M.¹, Kozlova L.S.¹, Terpugov A.L.²

¹ FSBI "Rostov Research Oncological Institution" (RROI) of the Ministry of Health of the Russian Federation,

² MPTF "City hospital No. 6", Rostov-on-Don.

Кит Олег Иванович — доктор мед. наук, профессор, директор ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» (РНИОИ) Минздрава России, 344037, г. Ростов-на-Дону, ул. 14 линия, 63.

Франциянц Елена Михайловна — доктор биол. наук, профессор, рук. лаборатории «Изучение патогенеза злокачественных опухолей» РНИОИ.

Козлова Лариса Степановна — кандидат биол. наук, доцент, старший научный сотрудник РНИОИ

Терпугов Александр Леонидович — врач онколог-колопроктолог МЛПУЗ «Городская больница № 6», г. Ростов-на-Дону

Kit Oleg Ivanovich — D. Sc. in Medicine, Professor, Director of FSBI "Rostov Research Oncological Institution" (RROI) of the Ministry of Health of the Russian Federation, 344037, Rostov-on-Don, 14 Line, 63.

Frantsiyants Elena Mikhailovna — D. Sc. in Biology, Professor, Head of RROI Laboratory "Study of pathogenesis of malignant tumors".

Kozlova Larisa Stepanovna — MD, PhD, senior researcher of RROI

Terpugov Aleksandr Leonidovich — oncologist and coloproctologist of MPTF "City hospital No. 6", Rostov-on-Don.

Козлова
Лариса Степановна
Kozlova Larisa S.
E-mail:
super.gormon@yandex.ru

Резюме

Целью являлось изучение α -2-макроглобулина (α -2М) и α -1-протеиназного ингибитора (α -1ПИ) в тканях злокачественных опухолей нижних отделов толстой кишки и полипов той же локализации. Злокачественную опухоль сигмовидной или прямой кишки имели 28 больных ($T_3N_{0-1}M_{0-2}$), у 29 диагностированы полипы сигмовидной или прямой кишки. В цитосолях центральной, периферической и условно здоровой ткани (линии резекции) указанных гиперплазий исследовано содержание ингибиторов α -1ПИ и α -2М методом иммуноферментного анализа на стандартных тест-системах. В тканях злокачественных опухолей обнаружено угнетение α -2М, увеличение α -1ПИ (перифокальная зона) и сохранение его в опухолевом очаге. В тканях полипов установлено увеличение α -2М, снижение α -1ПИ. Изменение физиологического баланса серпинов оценивалось по состоянию коэффициента α -1ПИ/ α -2М, сравнительно с линией резекции. В полипах, при неэффективном ингибировании протеолиза, увеличивается риск искажения процессов пролиферации и дифференцировки под влиянием освобождающихся факторов малигнизации. Возможно, решающим моментом окажется эндогенное или медикаментозное восстановление баланса взаимодействия трипсиноподобных протеиназ и калликрейна с ингибиторами.

Ключевые слова: серпины, толстая кишка, злокачественные опухоли, полипы

Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология 2014; 110 (10):18–21

Summary

The purpose of the study was to define α -2-macroglobulin (α -2M) and α -1-proteinase inhibitor (α -1PI) in tissues of malignant tumors and polyps of the lower parts of the colon. 28 patients had malignant tumors of the sigmoid colon or rectum ($T_3N_{0-1}M_{0-2}$), 29 had polyps of the same location. Content of α -2M and α -1PI was studied in cytosols of the central, peripheral and conditionally healthy tissues (of resection line) of the mentioned hyperplasias by the ELISA method using standard test kits. Suppression of α -2M and increase of α -1PI (perifocal zone) were found in malignant tumor tissue, as well as α -1PI maintenance in tumorous focus. Increase of α -2M and decrease of α -1PI were detected in polyp tissue. Changes in physiological balance of serpins were assessed by α -1PI/ α -2M ratio in comparison with the resection line. The risk of distortion of proliferation and differentiation processes increases in polyps in ineffective inhibition of proteolysis under the influence of released factors of malignancy. Endogenous or medicamentous restoration of balance of interaction of trypsin-like proteases and kallikrein with inhibitors will probably play the crucial role.

Keywords: serpins, colon, malignant tumors, polyps.

Ekspierimental'naya i Klinicheskaya Gastroenterologiya 2014; 110 (10):18–21

Введение

В последние годы изучение облигатных предраковых заболеваний выходит на первый план и представляет собой наиболее эффективный путь в мероприятиях первичной профилактики рака. Однако интересы исследователей практически не касались таких острофазных белков, как ингибиторы тканей полипов и рака толстой кишки в сравнительном аспекте. Наиболее изученные универсальные ингибиторы протеолиза α -2-макроглобулин (α -2М)

и α -1-протеиназный ингибитор (α -1ПИ) являются острофазными белками и могут быть полезны в выявлении метаболических изменений при формировании доброкачественных и злокачественных новообразований [1–3].

Целью проводимого исследования являлось изучение ингибиторов α -1ПИ и α -2М в тканях злокачественных опухолей нижних отделов толстой кишки и полипов той же локализации.

Материал и методы исследования

В исследование включены 57 больных, из них 28 были с диагнозом «злокачественная опухоль сигмовидной или прямой кишки» (17 мужчин и 11 женщин, 46–70 лет, T₃N₀₋₁M₀₋₂), 29 имели диагноз «полипы сигмовидной или прямой кишки» (15 мужчин и 14 женщин, 42–70 лет). Из хирургического материала полипов выделяли: собственно полип, его перифокальную зону и условно здоровую ткань (линию резекции). Хирургический материал опухоли разделяли: на опухолевый очаг, перифокальную

зону опухоли и условно здоровую ткань (линию резекции). В цитозольной фракции исследовано содержание ингибиторов α -1ПИ и α -2М методом иммуноферментного анализа на стандартных тест-системах. Статистическую обработку полученных цифровых данных проводили при помощи пакета сертифицированных прикладных программ Statistica v. 7 и Microsoft Excel XP. Достоверность различий между количественными показателями вычисляли с помощью t-критерия Стьюдента.

Результаты исследования

Исследование ингибиторов показало существенные различия уже на уровне линии резекции в обоих видах новообразований: активность α -1ПИ в указанной ткани полипов была на 38,0% выше, а α -2М — на 24,1% ниже, чем в аналогичном материале злокачественной опухоли (табл. 1). Баланс низкомолекулярного (α -1ПИ) и высокомолекулярного (α -2М) ингибиторов (α -1ПИ/ α -2М) в тканевых структурах линии резекции злокачественной опухоли и полипов различался на 67% в пользу полипов.

В опухолевой и перитуморозной областях злокачественной опухоли активность α -1ПИ в ткани опухоли не отличалась от её линии резекции, а в её перифокальной зоне была повышена на 34,6%. Активность α -1ПИ в тканях полипов, относительно их линии резекции, понижалась: на 64,9% — в головке полипа и на 37,5% — в его перифокальной зоне. Активность α -2М, относительно её линии резекции, оказалась сниженной практически одинаково: на 52,0% и 52,4%, соответственно. В собственно полипе и его перифокальной зоне активность α -2М, сравнительно с условно здоровой тканью линии

резекции, была значительно повышена: на 75,9% и 89,4%, соответственно. Разнонаправленные изменения α -1ПИ и α -2М в центральной и перифокальных областях гиперпластических образований толстой кишки повлияли на изменение соотношения их концентраций, сравнительно с соответствующей линией резекции. Так, в опухолевом очаге баланс изучаемых ингибиторов увеличился на 48,3%, в перифокальной зоне опухоли — на 100% за счёт снижения количества α -2М. В центральной и периферической тканях полипов наблюдалось резкое снижение соотношения α -1ПИ/ α -2М в 2,9 и 2,6 раза за счёт увеличения α -2М и уменьшения α -1ПИ.

Таким образом, сопоставление полученных данных позволило констатировать, что состояние универсальных ингибиторов α -1ПИ и α -2М различно в полипах и злокачественных опухолях нижних отделов толстой кишки. Главным различием статуса ингибиторов в исследованных тканях злокачественной опухоли и полипов являлась степень их активации.

Обсуждение полученных результатов

Принято считать, что злокачественное перерождение полипов толстой кишки является одной из важнейших причин рака этого органа [4–6]. Причины такой трансформации до конца не ясны. Процессы пролиферации и миграции эндотелиальных клеток, необходимые в растущем новообразовании (как доброкачественном, так и злокачественном) и приводящие к формированию кровеносных капилляров, опосредованы взаимодействием эндотелия с клетками соединительной ткани и внеклеточным матриксом с участием трипсиновых протеиназ [2]. Ранее сообщалось, что активность трипсиновых протеиназ в цитозолях злокачественной опухоли

повышена в несколько раз практически до одного уровня и в очаге, и в перифокальной зоне [7,8]. При активации ограниченного протеолиза в эпителиальных клетках запускаются процессы регенерации, преобладают ингибирование апоптоза и активация пролиферации, что вызывает неравномерную гипертрофию слизистой кишки и очаговый склероз стромы [6,9]. Локальная избыточная регенерация при хроническом воспалении является благоприятным субстратом для онкогенеза, занимающего 10–20 лет, с отбором аномальных клеток эпителия, устойчивых к гипоксии в условиях склероза [4]. Основная часть

Таблица 1.
Ингибиторы в тканях злокачественных опухолей и полипов толстой кишки

Показатели в мкМ/г ткани	Линия резекции		Перифокальная зона		Центральная зона	
	Опухоли	Полипов	Злокачественные опухоли	Полипы	Туморозный очаг	Головка полипа
α-2М	3,04±0,2	2,45±0,2 ⁴	2,01±0,1 ¹	4,64±0,2 ^{1,3}	2,00±0,1 ¹	4,31±0,2 ^{1,5}
α-1ПИ	8,84±0,6	12,2±0,8 ⁴	11,9±0,7 ¹	8,87±0,5 ^{1,3}	8,51±0,5 ²	7,40±0,4 ^{1,2,5}
Коэффициенты баланса серпинов в тканях злокачественных опухолей и полипов толстой кишки						
α-1ПИ/α-2М	2,9±0,2	4,9±0,3 ⁴	5,9±0,4 ¹	1,9±0,1 ^{1,3}	4,3±0,3 ^{1,2}	1,7±0,1 ^{1,5}

Примечание:
¹ — различия достоверны по отношению к соответствующей ткани линии резекции (p<0,01);
² — различия достоверны по отношению к данным соответствующей перифокальной ткани (p<0,01);
³ — различия достоверны между тканями перифокальной зоны злокачественной опухоли и полипа (p<0,01);
⁴ — различия достоверны между образцами ткани линии резекции полипов и опухоли (p<0,01);
⁵ — различия достоверны между образцами ткани опухолевого очага и головки полипа (p<0,01).

заболевших колоректальным раком приходится на старшую возрастную группу. В. Солодкий [4], J. Raketal. [9] объясняют это тем, что с возрастом в колоноцитах происходит накопление мутаций различных протоонкогенов и генов-супрессоров, так как факторы риска действуют в течение всей жизни. На молекулярном уровне это означает, что длительным существованием полипов обусловлено не только сохранение их изменённого метаболизма, существенно отличающегося от окружающих тканей, но и дальнейшее развитие этих нарушений вплоть до малигнизации. Разрушение близлежащей базальной мембраны и внеклеточного матрикса протеиназами, как ассоциированными с опухолью, так и активированными в межклеточном веществе органа позволяет злокачественному образованию реализовать пролиферативные и инвазивные свойства [9]. Серпины контролируют активность сериновых протеиназ, которые доминируют в гомеостатических ферментативных реакциях [2]. Благодаря системе ингибиторов защитные реакции тканевых трипсиновых протеиназ имеют временные рамки и локальные очаги действия.

О. Е. Акбашева и соавт. [2] наблюдали активацию трипсиноподобных протеиназ при снижении активности α-2М и α-1ПИ в слизистой оболочке при воспалительных заболеваниях толстой кишки, что приводило к деградации соединительнотканых белков. Выявленная авторами активация протеолиза в слизистой оболочке кишечника больных на фоне снижения активности ингибиторов располагалась по нарастающей при синдроме раздражённого кишечника, язвенном колите и болезни Крона. Это приводило к поражению и изъязвлению стенки кишечника за счет активации протеолиза и последующего разрушения коллагеновых и эластиновых волокон. Многие исследователи считают воспалительные заболевания толстой кишки, включая полипы, облигатным предраком [4–6,10].

Установленная ранее активация трипсиновых протеиназ в перифокальной ткани полипов считалась физиологической, т.е. защитной [7,8]. Однако протеолитическое «благополучие» в тканях полипов, по-видимому, было кажущимся, поскольку не поддерживалось достаточной активностью α-1ПИ, установленной в настоящем исследовании (табл. 1).

В ряде трудов сообщалось об увеличении активности трипсиноподобных протеиназ и снижении универсальных ингибиторов слизистой кишечника при полипах, воспалительных и онкологических заболеваниях. Часть авторов считают, что дефицит серпинов первичен и может являться фактором, предрасполагающим к повышению активности трипсиновых протеиназ [2,3]. Особенно это

касается α-2М и α-1ПИ, поскольку их универсальные свойства должны обеспечивать оптимальный физиологический баланс ферментов и ингибиторов слизистой кишечника, нуждающейся в периодической регенерации. Однако известны также факты активации тканевых трипсиновых протеиназ с нормальной или повышенной активностью серпинов при раке [11]. С позиции первичности снижения ингибиторной активности эти данные трудно объяснить. Повышенная активность трипсиновых протеиназ может вызывать рефлекторное увеличение ингибиторного ответа, как контролирующего фактора. С другой стороны, повышение активности ингибиторов может быть и первичным, т.к. α-2М и α-1ПИ являются острофазными белками [3,4]. Возможно, при развитии неоплазмы имеют место различные типы реагирования тканевых ингибиторов. Повышение активности трипсиновых протеиназ и снижение ингибиторного контроля характерно для злокачественного процесса. Подобные нарушения протеиназо-ингибиторного баланса ткани регистрировались при солидных опухолях [3,13].

В литературе имеются сведения, свидетельствующие о возможности повышения концентрации ингибиторов ткани в условиях нарастающей дестабилизации функций [3,13]. Учитывая исследования О. Е. Акбашевой и соавт. [2], а также вышеприведённые и наши данные, возможно, следует считать, что повышение активности α-2М в головке и перифокальной ткани полипов является временным и может быть началом более серьёзных изменений, связанных с дестабилизацией эндогенной защиты. В пользу такого предположения свидетельствуют и результаты изучения α-1ПИ. Этот ингибитор контролирует активность трипсиновых протеиназ (калликреина — в меньшей степени), но в проведённом исследовании он был существенно снижен и в головке полипов, и в их перифокальной ткани (p<0,01). Указанный факт позволил предположить, что в данном случае дефицит ингибитора α-1ПИ мог быть первичным, что стало причиной недостаточного эффективного контроля АТФ в головке полипов и даже повышения активности трипсиновых протеиназ в их перифокальной ткани. Активность α-1ПИ давно уже рассматривается как важный показатель противоопухолевой защиты организма [14].

Однако физиологическая реакция трипсиновых протеиназ является защитной на протяжении некоторого времени, пока она уравновешена и контролируется другими белками. Изменение физиологического равновесия серпинов, которое оценивалось по состоянию коэффициентов

соотношения низко- и высокомолекулярного ингибиторов (α -1ПИИ/ α -2М), сравнительно с линией резекции (табл. 1), может нарушить непрочное «протеолитическое спокойствие» и головки полипов, и, особенно, их перифокальной ткани. Это может увеличивать риск искажения процессов пролиферации и дифференцировки под влиянием генотоксических факторов, экспрессии онкогенов, освобождающихся при активации ограниченного протеолиза (даже физиологической), фактора некроза опухоли и цитокинов, что стимулирует митогенные изменения, экспрессию факторов роста и т.д. По-видимому, допустимо предположение о том, что дальнейшее развитие нарушений протеиназо-ингибиторного баланса тканей полипов

может повлечь за собой и их озлокачествление. Некоторые авторы устанавливают зависимость между числом полипов и их злокачественным перерождением [5,15]. По итогам данной работы можно предположить, что опасность малигнизации усиливается, если в структурах полипов, вкупе с активацией протеолиза, нарушен баланс низко- и высокомолекулярных ингибиторов.

Разнонаправленные изменения ингибиторов и недостаточная общая ингибиторная ёмкость полипозных тканей позволили предположить завершение ранней воспалительной фазы в развитии полипов с сохранением метаболических нарушений и начало роста клеток, устойчивых к наступившим изменениям.

Заключение

Физиологическая реакция, в частности трипсиновых протеиназ, является защитной на протяжении некоторого времени, пока она уравновешена и контролируется другими белками. Нарушенный баланс серпинов (по состоянию α -1ПИИ/ α -2М, сравнительно с линией резекции) и недостаточная общая ингибиторная ёмкость, могут нарушить непрочное «протеолитическое спокойствие» и головки полипов, и их перифокальной ткани, что, в свою очередь, увеличивает риск искажения процессов пролиферации и дифференцировки. По-видимому, допустимо предположение о том, что дальнейшее развитие нарушений соотношения серпинов и, как следствие, протеиназо-ингибиторного баланса,

может повлечь за собой озлокачествление полипов. Решающим моментом может оказаться эндогенное или медикаментозное восстановление метаболизма стенки толстой кишки, поражённой доброкачественной гиперплазией.

Приведённые наблюдения позволяют заключить, что метаболические изменения в изученных тканевых системах защиты и адаптации формируются в доброкачественных гиперплазиях толстой кишки задолго до их озлокачествления, сохраняются в течение длительного времени, создавая и/или увеличивая опасность малигнизации, что обосновывает необходимость дальнейшего углублённого исследования полипов.

Литература

1. Зорина В. Н., Козлов И. Г., Третьякова Т. В. и соавт. Некоторые реактанты острой фазы при различных типах пролиферативных заболеваний придатков матки. Клиническая лабораторная диагностика. — 2009. — № 10. — С. 16–19.
2. Акбашева О. Е., Бурковская В. А., Деханд А. Е. и соавт. Активность трипсиноподобных протеиназ и деградация коллагена слизистой оболочки кишечника при заболеваниях желудочно-кишечного тракта. — 2010. — РЖГГК. — № 20. — С. 31–38.
3. Kotlowski R., Bernstein C. N., Silverberg M. S. et al. Population-based case-control study of alpha-1-antitrypsin and SLC11A1 in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflamm. Bowel.* 2008. — Dis. 14 — С.1112–1117.
4. Солодкий В. Ранняя диагностика колоректального рака. *Врач.* — 2012. — № 11. — 20–23.
5. Юхтин В. И. Полипы ободочной кишки. — 2012. — Available at: http://www.medchitalka.ru/polipy_zheludochno-kishechnogo_trakta/polipy_obodochnoy_kishki/19687.html (Дата обращения 09.2012).
6. Andersen V., Halfvarson J. and Vogel U. Colorectal cancer in patients with inflammatory bowel disease: Can we predict risk? *World J. Gastroenterol.* — 2012. — № 18 — С. 4091–4094.
7. Кит О. И., Франциянц Е. М., Козлова Л. С., Терпугов А. Л. Статус трипсиновых протеиназ и кининовой системы в ткани злокачественных опухолей и полипов толстой кишки. *Российский онкологический журнал.* — 2013. — № 4. — С. 4–9.
8. Кит О. И., Франциянц Е. М., Козлова Л. С., Терпугов А. Л. Взаимодействие трипсиновых протеиназ и кининовой системы в перифокальной ткани полипов и злокачественных опухолей толстого кишечника. *Российский онкологический журнал.* — 2013. — № 3. — С. 14–17.
9. Rak Janusz, Yu Joanne, Milsom Chloe. Oncogene-driven hemostatic changes in cancer. *Cancer Invest.* — 2009. — № 27. — С. 28–35.
10. Katsanos K. H., Stamou P., Tatsioni A. et al. Northwest Greece IBD Study Group. Prevalence of inflammatory bowel disease related dysplasia and cancer in 1500 colonoscopies from a referral center in northwestern Greece. *J. Crohns Colitis.* — 2011. — № 5. — С. 19–23.
11. Зорин Н. А., Зорина В. Н., Зорина Р. М. Роль альфа-2-макроглобулина при онкологических заболеваниях. *Вопросы онкологии.* — 2004. — № 50. — С. 515–519.
12. Делекторская В. В., Кушлинский Н. Е., Головков Д. А. Молекулярные маркеры инвазии и особенности прогноза рака толстой кишки. Тезисы докладов в материалах XV Российского национального конгресса «Человек и лекарство». Москва. 2008. С. 395.
13. Гурин В. Н., Сандаков Д. Б., Гурин А. В. О значении ингибиторов протеиназ в процессах, обеспечивающих сопряжение деятельности функциональных систем организма. *Вестник РАМН.* — 1999. — № 6. — С. 25–29.
14. Оглоблина О. Г., Арефьева Т. И. Роль протеолитических ферментов и их ингибиторов в инвазии злокачественных опухолей (обзор литературы). *Биохимия.* — 1994. — № 59 — С. 340–352.
15. Мейерхард Дж., Сандерз М. Рак толстой кишки. — М.: ООО «Рид Элсивер», 2009.