

УДК 577.15+616.002

ИССЛЕДОВАНИЕ УРОВНЯ ФЕКАЛЬНОЙ ПИРУВАТКИНАЗЫ ТИПА M_2 ПРИ НЕКОТОРЫХ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЯХ

© Н.А. Огнерубов, В.В. Милованов, А.А. Иванников, Е.Н. Ежова

Ключевые слова: опухолевая M_2 -пируваткиназа; злокачественные новообразования; капрологический тест. Приведены результаты определения в кале концентрации опухолевой M_2 -пируваткиназы при некоторых злокачественных новообразованиях у 42 пациентов. В среднем у лиц контрольной группы уровень ее составил 2,18 Ед./мл, а при колоректальном раке – 6,97 Ед./мл; различия статистически достоверны.

ВВЕДЕНИЕ

Пируваткиназа играет важную роль в процессе гликолиза в активно пролиферирующих и опухолевых клетках. Она существует в виде различных изоформ, характеризующихся тканеспецифичностью (L, R, M_1 , M_2). Пируваткиназа типа L обнаружена в печени и проксимальных почечных канальцах, типа R – в эритроцитах, типа M_1 – в мышцах и мозге, и типа M_2 – в легких. Причем, пируваткиназа M_2 -типа является филогенетически более древней формой. В активной форме все изоформы фермента состоят из четырех идентичных субъединиц, т. е. являются тетрамерами. Изофермент M_2 -пируваткиназы может существовать в высоко активной тетрамерной форме и почти неактивной димерной форме. Соотношение тетрамерной и димерной форм пируваткиназы в пролиферирующих клетках определяет, будет ли глюкоза деградировать в лактат с продукцией энергии или произойдет отведение пути ее метаболизма в сторону синтетических процессов. Соотношение тетрамер/димер для M_2 -пируваткиназы контролируется онкобелками и промежуточными продуктами метаболизма. При возникновении опухоли количество исходных тканеспецифичных изоэнзимов снижается, и опухолевые клетки начинают вырабатывать в большом количестве пируваткиназу типа M_2 . При этом изоэнзим, который изначально состоял из 4-х субъединиц, расщепляется до димера, имеющего более низкую активность. Димерная форма M_2 -пируваткиназы, характерная для опухолевых клеток, получила название опухолевой M_2 -пируваткиназы. В опухоли, где процесс клеточного деления идет очень активно, клетки предпочитают т. н. «метаболический шунт» с целью сохранения энергии. Димеризация M_2 -пируваткиназы происходит путем фосфорилирования или вследствие прямого связывания онкобелков и приводит к снижению активности энзима, аналогично, как и в случае с глюкозой при синтезе нуклеиновых кислот, фосфолипидов и аминокислот. Пируваткиназа M_2 -типа считается ключевым регулятором изменения метаболизма в опухолевых клетках. Она поступает в кровь, фекалии, что позволяет использовать этот параметр в качестве онкомаркера в лабораторной диагностике.

Роль этого фермента изучена в качестве онкомаркера при опухолях пищеварительного тракта, молочной железы, легких, почек [1–2], острых и хронических воспалительных процессах, особенно толстого кишечника [3–9]. Чувствительность и специфичность этого метода составили, соответственно, 60–80 и 80–90 % [1, 10–11]. Повышение уровня M_2 -пируваткиназы наблюдается также при острых и хронических воспалительных процессах, заболеваниях сердца, сахарном диабете и др. [8–9].

Так, установлено значительное повышение концентрации M_2 -пируваткиназы у больных с тяжелой и средней тяжести формами неспецифического язвенного колита, в стадии обострения по сравнению с периодом ремиссии [10]. Уровень M_2 -пируваткиназы в крови пациентов с хроническим непрерывным течением при неспецифическом язвенном колите был почти в два раза выше по сравнению с таковыми при хроническом рецидивирующем течении [4–6].

Концентрация M_2 -пируваткиназы в кале больных колоректальным раком значительно выше, чем у здоровых лиц или пациентов с аденоматозными полипами и коррелирует с размерами и степенью злокачественности опухоли [12–13]. По данным В.П. Земляного и соавт. (2005), J. Kari et al. (2008), пируваткиназа M_2 -типа обладает высокой чувствительностью и специфичностью, поэтому может быть использована в качестве предиктора эффективности лечения колоректального рака [14–15].

В настоящее время фекальный тест определения M_2 -пируваткиназы применяется как скрининг-тест колоректального рака в группах риска [16].

Целью работы явилось определение уровня опухолевой M_2 -пируваткиназы в кале при некоторых злокачественных новообразованиях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Концентрацию опухолевой M_2 -пируваткиназы определяли в кале (копрологический тест) с помощью диагностического набора фирмы ScheBo Biotech AG. Исследование проводили на автоматическом микропланшетном фотометре «Sunrise» фирмы TECAN (США) с микропроцессорным управлением с использованием вошера «TECAN» (США).

Таблица 1

Уровень опухолевой M₂-пируваткиназы у пациентов различных групп

Группа	Количество больных	Среднее значение, Ед./мл	Интервал, Ед./мл
1	10	3,35 ± 0,62	2,15–4,31
2	13	6,97 ± 0,86	3,47–15,9
3	8	3,47 ± 0,64	1,17–5,95
Контроль	11	2,18 ± 0,39	1,51–4,01

На поверхность лунок планшета для ИФА наносились первые моноклональные антитела, специфичные только к опухолевой M₂-пируваткиназе. Опухолевая M₂-пируваткиназа, присутствующая в образце кала пациента, или стандарт для опухолевой M₂-пируваткиназы из набора для ИФА связываются с этими антителами и, таким образом, иммобилизуются на планшете. Моноклональные антитела второго типа (конъюгированные с биотином) связываются с опухолевой M₂-пируваткиназой в течение следующей инкубации. Затем добавляли конъюгат пероксидазы хрена со стрептавидином, который связывается с биотином антителом второго типа. Пероксидаза хрена окисляет субстрат – ТМВ (3,3,5,5-тетраметил бензидин), который приобретает желтый цвет. В заключение концентрацию окисленного ТМВ определяют фотометрически.

Данный набор ИФА позволяет определить концентрацию опухолевой M₂-пируваткиназы в пределах от 1 до 20 Ед./мл, а дискриминационный уровень равен 4 Ед./мл. Погрешность интра-исследования опухолевой M₂-пируваткиназы была измерена посредством 20-кратного анализа 5 образцов кала (3,8–19,7 Ед./мл). Среднее значение коэффициента вариации составило 5,3 % (3,0–7,9 %).

Материалом для исследования послужили образцы кала 31 пациента, страдающих злокачественными новообразованиями различных локализаций, в возрасте от 38 до 76 лет, медиана возраста составила 47,7 ± 2,7 лет. Мужчин было 11 (35,5 %), а женщин – 20 (64,5 %). У всех больных диагноз злокачественного новообразования подтвержден морфологически. В качестве контроля использовались образцы кала от 11 практически здоровых лиц в возрасте от 38 до 65 лет, медиана возраста 44,6 ± 2,4 лет. Все больные были разделены на 3 группы.

Первая группа представлена пациентами, страдающими различными хроническими заболеваниями желудочно-кишечного тракта в стадии ремиссии, а именно, эзофагитом, гастритом и колитом (исключая неспецифический язвенный колит). Медиана возраста – 46,1 ± 2,8 лет (35–62).

Пациенты *второй группы* (13) на момент исследования имели установленный диагноз злокачественного новообразования (вторая клиническая группа). Среди них колоректальный рак диагностирован у 7 больных, рак яичников – у 3, рак молочной железы, меланома и рак языка по 1 случаю. Медиана возраста в этой группе составила 43,3 ± 2,1 лет (43–73).

Третью группу составили больные (8 человек), которым проведено специальное лечение по поводу колоректального рака, рака почки и поджелудочной железы (третья клиническая группа). Медиана возраста была равна 54,7 ± 3,1 лет (43–76).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Уровень фекальной опухолевой M₂-пируваткиназы у пациентов различных групп, включая контроль, представлен в табл. 1.

У лиц контрольной группы уровень опухолевой M₂-пируваткиназы в более 50 % случаев был меньше 2 Ед./мл, и только лишь в 4 случаях он превышал этот показатель, составляя в среднем 2,18 ± 0,39 Ед./мл.

У больных, страдающих заболеваниями желудочно-кишечного тракта (1 группа), уровень опухолевой M₂-пируваткиназы колебался от 2,15 до 4,31, в среднем – 3,35 ± 0,62 Ед./мл. У 6 пациентов он превышал 3 Ед./мл.

Весьма интересные результаты были получены у лиц с установленным диагнозом злокачественного образования (2 группа). При этом концентрация опухолевой M₂-пируваткиназы колебалась от 3,47 до 15,9 Ед./мл, в среднем она была равна 6,97 ± 0,86 Ед./мл. Относительно лиц контрольной группы различия статистически достоверны ($p < 0,05$). Как указывалось выше, в эту группу входили 7 пациентов, страдающих колоректальным раком. Колебания уровня опухолевой M₂-пируваткиназы у них были от 3,61 до 15,9 Ед./мл, составляя в среднем 8,28 ± 0,94 Ед./мл. Различия в показателях средних значений концентраций, при этом относительно всех групп пациентов, статистически достоверны ($p < 0,05$).

Что касается больных 3 группы (лица, находящиеся на диспансерном наблюдении), то средняя концентрация фекальной опухолевой M₂-пируваткиназы у них составила 3,47 ± 0,64 Ед./мл и практически не отличается от пациентов 1 группы.

Полученные нами результаты соответствуют имеющимся в отечественной и зарубежной литературе сведениям о клинической значимости пируваткиназы типа M₂ при диагностике целого ряда злокачественных новообразований, включая скрининг колоректального рака. Считается, что этот тест является более чувствительным и специфичным, особенно у лиц с высоким риском развития заболевания.

ВЫВОДЫ

1. Опухолевую M₂-пируваткиназу можно обнаружить и количественно определить в человеческом кале.
2. Концентрация фекальной опухолевой M₂-пируваткиназы существенно колеблется при различных злокачественных новообразованиях. При этом значительно более высокий уровень ее наблюдается у больных колоректальным раком.
3. Определение опухолевой M₂-пируваткиназы возможно использовать при организации диспансерного наблюдения за онкологическими больными.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Сергеева Н.С., Мишунина М.П., Хомяков В.М. и др.* Диагностика содержания в плазме крови опухолевой пируваткиназы M₂-типа (TuM₂-PK) на этапах диагностики, лечения и мониторинга больных колоректальным раком // Российский онкологический журнал. 2007. № 5. С. 9-12.
2. *Spiller R.C., Jenkins B., Thornley J.P. et al.* Increased rectal mucosal enteroendocrine cells, T-lymphocytes, and increased gut permeability following acute Campylobacter enteritidis and in post-dysenteric irritable bowel syndrome // Gut. 2000. V. 47. P. 804-811.
3. *Johnson M.W., Mastranzi S., Duffy A.M. et al.* Fecal M₂-pyruvate kinase: a novel noninvasive marker of ileal pouch inflammation // Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. 2009. V. 21. № 5. P. 544-550.
4. *Chung-Faye G., Hayee B., Mastranzi S. et al.* Fecal M₂-pyruvate kinase (M₂-PK): a novel marker of intestinal inflammation // Inflamm. Bowel. Dis. 2007. V. 13. P. 1374-1378.
5. *Czub E., Herzing K.H., Szaflarska-Popawska A. et al.* Fecal pyruvate kinase: a potential new markers for intestinal inflammation in children with inflammatory bowel disease // Scand. J. Gastroenterol. 2007. V. 42. № 10. P. 1147-1150.
6. *Jeffery J., Lewis S.J., Ayling R.M.* Fecal dimeric M₂-pyruvate kinase (tumor M₂-PK) in the differential diagnosis of functional and organic bowel disorders // Inflamm. Bowel. Dis. 2009. V. 15. № 11. P. 1630-1634.
7. *Shih D.Q., Targan S.R.* Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease // World J. Gastroenterol. 2008. V. 14. P. 390-400.
8. *Staib P., Hoffmann M., Schinkothe T.* Plasma levels of tumor M₂-pyruvate kinase should not be used as a tumor markers for hematological malignancies and solid tumors // Clin. Chem. Lab. Med. 2006. V. 44. № 1. P. 28-31.
9. *Oremek G., Rumers F., Sapoutzis N. et al.* Tumor markers pyruvate kinase type tumor M₂ in patients suffering from diabetic nephropathy // Anticancer Res. 2003. V. 23. P. 1155-1158.
10. *Конович Е.А., Халиф И.Л.* Содержание пируваткиназы типа M₂ (M₂-PK) в плазме крови больных воспалительными заболеваниями толстой кишки // Рос. журн. гастроэнтеролог., гепатолог., колопроктолог. 2010. № 5. С. 75-79.
11. *Hang U., Hundi S., Brenner H.* Sensitivity and specificity of fecal, tumor M₂-pyruvate kinase for detection of colorectal adenomas in a large screening study // Br. J. Cancer. 2008. V. 99. № 1. P. 133-135.
12. *Hardt P.D., Mazurek S., Toepler M. et al.* Faecal tumour M₂-pyruvate kinase: a new sensitive screening tool for colorectal cancer // Brit. J. Cancer. 2004. V. 91. P. 980-984.
13. *Levi Z., Rozen P., Hazazi R. et al.* A quantitative immunochemical fecal occult blood test for colorectal neoplasia // Ann. Intern. Med. 2007. V. 20. P. 244-255.
14. *Земляной В.П., Трофимова Т.Н., Нипомнящая С.Л., Дементьева Т.В.* Современные методы диагностики и оценки степени распространенности рака ободочной и прямой кишки // Практическая онкология. 2005. Т. 6. № 2. С. 71-80.
15. *Karl J., Wild N., Tacke M. et al.* Improved diagnosis of colorectal cancer using a combination of fecal occult blood and novel fecal protein markers // Clin. Gastroenterol. Hepatol. 2008. V. 6 (10). P. 1122-1128.
16. *Старостина М.А., Афанасьева З.А., Зинкевич О.Д., Сафина Н.А.* Информативность методов скрининга у больных раком толстого кишечника // Казанский медицинский журнал. 2011. Т. 92. № 1. С. 20-21.

Поступила в редакцию 16 августа 2013 г.

Ognerubov N.A., Milovanov V.V., Ivannikov A.A., Yezhova E.N. STUDY OF LEVEL OF FECAL PYRUVATE KINASE OF TYPE M₂ AT CERTAIN MALIGNANCIES

The results of the determination in the stool concentration of tumor M₂ of pyruvate kinase in certain malignant neoplasms in 42 patients are given. On average, the level of the control group it was 2.18 U./ML, and for colorectal cancer – 6.97 U./ML, and the differences were statistically significant.

Key words: tumor M₂-pyruvate kinase; malignant neoplasms; caprological test.