

УДК 616-008:615:032.7:611.661-006.6

НЕКОТОРЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ГИДРОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ТКАНЕЙ ОПУХОЛИ ВЕРХНЕЙ ЧЕЛЮСТИ И ЕЕ ПЕРИФОКАЛЬНОЙ ЗОНЫ

© 2004 г. Ю.С. Сидоренко, Е.М. Франциянц, Ю.В. Ульянова, Н.Д. Черярина, Н.В. Мусиенко

On a large clinical material was demonstrated that the utilized variant of chemotherapy promotes reduction of a tumor invasion potential and is accompanied by considerable reorganization of tumor energy metabolism.

Увеличение содержания протеолитических ферментов в плазме (сыворотке) крови онкологических больных является следствием их вымывания из опухолевой ткани, в которой протеазы играют важную роль в пролиферативных процессах [1–3]. В связи с этим показатели активности протеаз используются в качестве маркеров инвазионного и метастатического потенциала опухоли. В качестве диагностических тестов также в клинической практике используется определение активности кислой и щелочной фосфатаз [4, 5]. Вне зависимости от характера взаимоотношений протеаз в крови и ткани опухоли, высокую активность катепсина Д в опухоли можно рассматривать как косвенный признак агрессивности злокачественного процесса. Повышение показателя соотношения «протеаза/ингибитор» является свидетельством нарушения регуляции внутриклеточных протеолитических систем, так как она находится под контролем рецепторно-медиаторных процессов [6].

В связи с тем, что повышение содержания протеаз в сыворотке крови сопряжено с выраженностью пролиферации опухолевых клеток, полагают, что определение совокупной активности протеолитических ферментов и их ингибиторов может быть оправдано не только для прогнозирования темпов опухолевого роста, но и для характеристики цитолитического или, по крайней мере, любого другого туморореструктивного действия противоопухолевых препаратов [7].

Материалы и методы. Клинический материал для настоящего исследования представлен 11 больными местно-распространенным раком верхней челюсти, которые находились на лечении в отделении опухолей головы и шеи Ростовского научно-исследовательского онкологического института. Все пациенты получали на первом этапе комплексного лечения эндотуморальную аутогемохимиотерапию (АГХТ). Методика эндотуморальной АГХТ заключалась во взятии у пациента путем венепункции 5 мл крови в шприц с добавлением 5 ЕД/мл гепарина, инкубации ее с химиопрепаратами при 37 °С в течение 30 мин и последующим введением полученной смеси в опухоль верхней челюсти. При проведении эндотуморальной АГХТ использовались следующие до-

зы химиопрепаратов: метотрексат – 50 мг/м²; блеомицин – 60 мг/м². Это сочетание химиопрепаратов вводилось всем больным эндотуморально в течение 5 дней. В рамках настоящего исследования была определена антитриптическая активность (АТА), активность катепсина Д, кислотостабильных ингибиторов (КСИ), щелочной и кислой фосфатаз в образцах интактной ткани верхней челюсти ($n = 10$), плоскоклеточного рака верхней челюсти и его перифокальной зоны до ($n = 11$) и после ($n = 10$) проведения внутриопухолевой АГХТ.

Результаты и обсуждение. Как свидетельствуют результаты, представленные в табл. 1, активность катепсина Д в ткани опухоли верхней челюсти больных, которым не проводилась предоперационная химиотерапия, была в 1,6 раз выше, чем в интактной ткани. Активность КСИ и АТА в образцах опухолей до начала лечения была статистически неотличима от таковой в интактной ткани. Естественно, что числовые значения коэффициентов «катепсин Д/АТА» и «катепсин Д/КСИ», характеризующих баланс системы «протеаза-ингибитор», в среднем в 1,6 раза превышали значения, вычисленные для интактной ткани, свидетельствуя о нарушении процессов ограниченного протеолиза.

Таблица 1

Некоторые показатели активности гидролитической системы тканей опухолей верхней челюсти и ее перифокальной зоны до проведения внутриопухолевой аутогемохимиотерапии

Исследуемый показатель	Активность в		
	интактной ткани	опухолевой ткани	тканях перифокальной зоны
Катепсин Д, нМ/г тк.	400 ± 32,3	648 ± 51,3 ¹	440 ± 35,8
АТА, мг трипс/г тк.	4,5 ± 0,4	4,6 ± 0,5	7,5 ± 0,8 ¹
КСИ, мг трипс/г тк	6,8 ± 0,7	6,6 ± 0,6	9,8 ± 0,9 ¹
Катепсин Д/АТА	88,9 ± 7,6	144,0 ± 12,2 ¹	58,7 ± 5,3 ^{1,2}
Катепсин Д/КСИ	58,8 ± 5,3	98,2 ± 8,6 ¹	44,9 ± 4,1 ^{1,2}
Кислая фосфатаза, ед.	6,4 ± 0,6	8,2 ± 0,7 ¹	5,0 ± 0,4 ^{1,2}
Щелочная фосфатаза, ед	1,4 ± 0,1	0,8 ± 0,1 ¹	0,9 ± 0,1 ¹
Коэффициент КФ/ЩФ	4,6 ± 0,5	10,2 ± 0,9 ¹	5,5 ± 0,7 ²

Примечание к табл. 1 и 2. 1 – статистически достоверные отличия в сравнении со значениями для интактной ткани ($p < 0,01$); 2 – статистически достоверные отличия в сравнении со значениями для ткани опухолей ($p < 0,01$).

Активность кислой и щелочной фосфатаз в опухолевой ткани пациентов, которым не проводили предварительного лечения, изменялась во взаимно противоположных направлениях: активность кислой фосфатазы была на

28,1 % выше, а активность щелочной фосфатазы на 42,9 % ниже, чем в интактной ткани. Для оценки состояния системы энергообеспечения, построенной на обмене фосфатов, в ткани злокачественных опухолей до начала лечения определяли значение коэффициента соотношения активности кислой и щелочной фосфатаз (КФ/ЩФ). Обнаружено, что в ткани опухоли этот коэффициент в 2,2 раза выше, чем в интактной ткани (см. табл. 1).

Полученные результаты подтверждают литературные сведения о том, что опухолевые клетки в избыточном количестве экспрессируют и секретируют протеазы, обеспечивающие деградацию матрикса, гистогематических барьеров и инвазию опухолевых клеток.

Избыточное фосфорилирование в клетках опухоли, осуществляющееся в результате активации фосфатаз, обеспечивает увеличение инвазионного потенциала опухолевых клеток в условиях гипоксии. Свидетельством тому служит характерное для такой ситуации резкое повышение активности кислой и снижение активности щелочной фосфатазы [2].

Таким образом, показатели активности гидролитической системы в ткани опухолей верхней челюсти до проведения внутритуморальной АГХТ свидетельствовали о высокой степени злокачественности новообразования и его значительном инвазионном потенциале.

После проведения внутритканевой АГХТ активность катепсина Д в ткани опухолей верхней челюсти снизилась на 27,2 % и превышала показатель для интактной ткани слизистой верхней челюсти только на 18 % (табл. 2). Отмечено умеренное достоверное повышение АТА на 14 %, в связи с чем значение коэффициента «катепсин Д/АТА» после лечения уже не отличалось от такового в интактной ткани. Активность КСИ возросла более существенно – на 25,8 %, что также сопровождалось нормализацией значений коэффициента «катепсин Д/КСИ» в ткани опухоли.

После завершения внутриопухолевой АГХТ обнаружено снижение до нормального уровня активности кислой фосфатазы, которое, вероятно, связано с изменением оксигенации опухоли. С другой стороны, параллельного изменения активности щелочной фосфатазы в сравнении с фоновыми величинами не зафиксировано. Показатель соотношения кислой и щелочной фосфатаз, отражающий взаимоотношения цитозольного и мембранного компонентов системы фосфорилирования, уменьшился в сравнении с показателем, определенным до начала лечения, на 35,3 %. При этом он продолжал оставаться повышенным на 43,5 % в сравнении с показателем для интактной ткани (см. табл. 2).

Таблица 2

Некоторые показатели активности гидролитической системы тканей опухоли верхней челюсти и ее перифокальной зоны после проведения внутриопухолевой аутогемохимиотерапии

Исследуемый показатель	Активность в		
	интактной ткани	опухолевой ткани	тканях перифокальной зоны
Катепсин Д, нМ/г тк.	400 ± 32,3	472 ± 28,2 ^{1,2}	400 ± 27,6
АТА, мг трипс/г тк.	4,5 ± 0,4	5,5 ± 0,4 ¹	5,5 ± 0,5 ^{1,2}
КСИ, мг трипс/г тк	6,8 ± 0,7	8,3 ± 0,7 ¹	6,8 ± 0,4 ²
Катепсин Д/АТА	88,9 ± 7,6	85,8 ± 6,4	72,7 ± 6,3 ^{1,2}
Катепсин Д/КСИ	58,8 ± 5,3	56,9 ± 4,1	58,8 ± 4,9
Кислая фосфатаза, ед.	6,4 ± 0,6	6,0 ± 0,5	5,8 ± 0,5
Щелочная фосфатаза, ед.	1,4 ± 0,1	0,9 ± 0,07 ¹	1,2 ± 0,1
Коэффициент КФ/ЩФ	4,6 ± 0,5	6,6 ± 0,4 ^{1,2}	4,8 ± 0,3 ²

Таким образом, проведенные исследования гидролитической активности ткани опухоли после внутриопухолевой АГХТ подтвердили наши предположения о том, что этот вид химиобиотерапии способствует снижению инвазионного потенциала опухоли и сопровождается значительной перестройкой энергетического обмена в ней.

При изучении процессов деградации внеклеточного матрикса было показано, что раковая инвазия часто сопровождается критическим взаимодействием между клетками злокачественной опухоли и некоторыми типами окружающих неопластических клеток стромы [8]. Кроме того, в процессах восстановления нормальной ткани синтез протеолитических компонентов часто распределяется между несколькими типами клеток. Также существует очевидное сходство между неопластическими и ненеопластическими процессами в одной и той же ткани.

В связи с изложенным была изучена активность гидролитических процессов в перифокальной зоне опухоли до и после проведения внутритканевой АГХТ.

Обнаружено, что до начала лечения активность катепсина Д достоверно не отличалась от таковой в интактной ткани, тогда как активность КСИ и АТА была в 1,7 и 1,5 раза, соответственно, выше, чем в интактной ткани и ткани злокачественных опухолей. Значения коэффициентов «катепсин Д/КСИ» и «катепсин Д/АТА» были снижены в сравнении со значениями для интактной ткани на 23,6 % и 34 %, соответственно, а в сравнении со значениями для ткани опухоли – в 2,2 и 2,5 раза (см. табл. 1).

Наряду с угнетением протеолитических процессов до начала лечения в перифокальной зоне опухоли отмечено снижение интенсивности фосфорилирования. Так, активность кислой фосфатазы в ткани перифокальной зоны была снижена в сравнении с ее активностью в интактной ткани на 22 %, а в ткани опухоли – в 1,6 раза. Активность щелочной фосфатазы в ткани перифокальной зоны была на 35,7 % ниже, чем в интактной ткани, и не отличалась от активности этого фермента в ткани злокачественной опухоли верхней челюсти. Коэффициент КФ/ЩФ в ткани перифокальной зоны опухоли достоверно не отличался от величины, вычисленной для интактной ткани, и был практически в 2 раза меньше, чем в ткани опухоли (см. табл. 1).

После внутриопухолевой АГХТ все исследованные показатели в ткани перифокальной зоны опухоли достоверно не отличались от аналогичных в интактной ткани (см. табл. 2).

Синтез протеаз (в частности, катепсина Д) клетками и секреция их в перичеселлюлярную область, помимо обеспечения благоприятных условий для роста и инвазии опухоли, обуславливают нарушение структурно-функционального состояния клеточной поверхности, модификацию ее антигенного набора и адгезивных свойств, что в конечном итоге препятствует дифференцировке клеток и переходу их в состояние покоя [9]. Кроме этого, роль ингибиторов протеаз также неоднозначна при опухолевом росте. С одной стороны, подавляя активность протеаз злокачественных клеток, ингибиторы оказывают антипролиферативное действие и ограничивают рост опухоли. С другой, – ограничивая протеазозависимые стадии иммунологических реакций, ингибиторы затрудняют распознавание и элиминацию трансформированных клеток иммунокомпетентными клетками [10]. Таким образом, роль протеаз и их ингибиторов в опухолевой и немалигнизированной тканях (в частности, ткани перифокальной зоны) будет различна. В связи с этим для выяснения некоторых механизмов терапевтического действия использованного в работе метода лечения была исследована в сравнительном аспекте активность гидролитических процессов в тканях опухоли и ее перифокальной зоны.

При оценке состояния изучаемой системы в комплексе «опухоль – перифокальная зона» до лечения можно констатировать наличие протеолитической агрессии опухоли, некомпенсированной ингибиторами и сопровождаемой избыточным фосфорилированием. Обнаруженный феномен может служить причиной протеолитического расщепления белка-репрессора пролиферации и модуляции активности онкогена H-ras [2]. Состояние гидролитических процессов в окружающей ткани характеризовалось депрессией синтетической фазы процесса активации генома клеток. Активация КСИ и повышение АТА в ткани перифокальной зоны опухоли, наблюдавшиеся в наших исследованиях, приводили к изменениям в системе протеаза-ингибитор в сто-

рону подавления внутриклеточного протеолиза, что может быть причиной нарушения нормальной дифференцировки клеток и синтеза белковых молекул из предшественников [9].

Важную роль в развитии как адаптивных, так и патологических процессов играют фосфомоноэстеразы, к которым относятся кислая и щелочная фосфатазы. При этом большое значение в анализе процессов фосфорилирования придается соотношению этих ферментов. Гиперфосфорилирование в клетках опухоли свидетельствует о повышенном энергетическом потенциале, формирующемся в условиях нарастающей в сравнении с интактной тканью гипоксии, подтверждаемой значительным повышением активности именно кислой фосфатазы. Известно, что активность фосфатаз в клетках зависит от количества свободного ортофосфата, повышенные концентрации которого обуславливают репрессию, а низкие – дерепрессию синтеза ферментов. Полученные результаты позволяют полагать, что обнаруженные в ходе проведенного исследования различия в активности кислой фосфатазы в клетках опухоли и ткани перифокальной зоны могут быть связаны с изменением концентрации внутриклеточного неорганического фосфата, доступность которого в свою очередь является одним из лимитирующих факторов гликолиза. Таким образом, одной из причин повышения активности кислой фосфатазы в ткани опухоли может быть ускорение гликолиза.

Полученные результаты подтвердили высказанное ранее положение о том, что до начала лечения на границе «опухоль – перифокальная зона» имеет место нарушение ауторегуляторных процессов, приводящее к дискоординации межклеточных взаимодействий и нарушению контроля со стороны окружающих опухоль тканей [11, 12].

Внутриопухолевая АГХТ снижает инвазионный и пролиферативный потенциал клеток злокачественных опухолей верхней челюсти, изменяя в них гидролитические процессы. Это, прежде всего, касается нормализации баланса системы «протеаза – ингибитор», сопровождаемой снижением активности кислой фосфатазы до значений, определяемых в интактной ткани. Вторым, не менее важным, механизмом такой химиотерапии является нормализация гидролитических процессов в ткани перифокальной зоны опухоли, способствующая восстановлению межклеточных контактов и обуславливающая на какое-то время сдерживание роста и распространения опухоли в окружающие ткани. Возможно, этим и объясняется удлинение периода до начала прогрессирования процесса.

Литература

1. Гешелин С.А. и соавт. // Вопросы онкологии. 1984. Т. 30. № 10. С. 9–18.
2. Ровенских Ю.А. // Биохимия. 1998. Т. 63. № 9. С. 1204–1221.
3. Ashish G., Chauhan S.S. // Indian J. Exp. Biol. 1997. Vol. 35. № 6. P. 553–564.

4. Локишина Л.А. // Вопросы медицинской химии. 1991. Т. 37. № 6. С. 15–21.
5. Зуева Н.Н., Далев П.Г., Лазарова Д.Л. // Биохимия. 1993. Т. 58. № 7. С. 1009–1023.
6. Барабой В.А., Зинченко В.А. // Журн. АМН Украины. 1999. Т. 5. № 3. С. 453–469.
7. Акбашиева О.Е. и др. // Вопросы онкологии. 2001. Т. 47. № 45. С. 619–621.
8. Morten J. et al. // Curr. Opinion Cell Biol. 1998. Vol. 10. № 5. P. 667–671.
9. Веремеенко К.Н. // Врачебное дело. 1994. № 1. С. 8–13.
10. Оглоблина О. Г., Арефьева Т.И. // Биохимия. 1994. Т. 59. № 3. С. 340–352.
11. Орехович В.Н. и др. // Вестн. АМН СССР. 1984. С.3–10.
12. Rush B.F. // J. Surg. Oncol. 2000. Vol. 75. № 1. P. 1–4.

Ростовский научно-исследовательский онкологический институт 23 апреля 2004 г.
