

*Н.В. ГРИНЬ, Ю.Г. КЛИСЬ, Н.М. ВОРОШИЛОВА, С.В. ВЕРЬОВКА*

## **ДОСЛІДЖЕННЯ АКТИВНОСТІ ПРОТЕОЛІТИЧНИХ ФЕРМЕНТІВ ТА ВМІСТУ $\alpha_2$ -МАКРОГЛОБУЛІНУ В ПЛАЗМІ КРОВІ У ХВОРИХ ІЗ ЗЛОЯКІСНИМИ НОВОУТВОРЕННЯМИ НАВКОЛОНОСОВИХ ПАЗУХ І ПОРОЖНИНИ НОСА**

*Лаб. біохімії (зав. – д-р біол. наук С.В. Верьовка) ДУ „Інститут  
отоларингології ім. проф. О.С. Коломійченка НАМН України”  
(дир. – акад. НАМН України, проф. Д.І. Заболотний)*

Злоякісні пухлини порожнини носа та навколоносових пазух займають 0,5-1,5% в статистиці всіх злоякісних новоутворень. Через майже безсимптомність їх початкового розвитку більшість пацієнтів звертається до лікаря на пізніх (III-IV стадія) етапах. Визначено, що лікування з приводу злоякісних пухлин порожнини носа та навколоносових пазух обов'язково має бути комплексним (хіміотерапія, хірургічне втручання, телегамматерапія). Однак токсичні ефекти цитостатичних препаратів та променевої терапії посилюють навантаження на захисні системи організму, що призводить до численних функціональних ускладнень та зменшує ефективність лікування [8]. Тому пошук нових методичних підходів до застосування лікарських препаратів, що дали б змогу зменшити побічні ефекти, становить актуальну задачу. Один з перспективних напрямків подібних пошуків полягає у застосуванні гепатопротекторних препаратів [2]. Як відомо, при онкологічному процесі відбувається порушення обміну речовин та накопичення проміжних і нефізіологічних речовин (метаболічний синдром). Ці процеси значною мірою зумовлені надмірною активацією протеолітичних процесів, що призводить до протеолітичного ураження білків та функціонально необумовленої активації різноманітних ферментів і факторів [5, 11]. Тому показники активності протеїназ належать до інформативних та загальноновизнаних маркерів злоякісного росту. Для виявлення онкогенезу та оцінки ризику ре-

цидиву дедалі більшого поширення набувають підходи, що ґрунтуються на комплексному застосуванні різних показників. До числа таких маркерів належать компоненти системи протеїнази та інгібітори протеїназ. Зокрема, при багатьох видах патології спостерігається надмірна активація трипсинподібних протеїназ, що визначаються не лише протеолітичною, але й активаційною дією по відношенню до проферментів, профакторів та інших видів білків, що підлягають протеолітичній активації. В попередніх дослідженнях колективом авторів показано, що ця група ферментів, а також універсальний інгібітор протеїназ –  $\alpha_2$ -макроглобулін ( $\alpha_2$ -М) належать до інформативних показників молекулярних порушень, характерних для онкологічного процесу [10, 15, 16]. Нещодавно визначена можливість прогнозу ризику ускладнень та рецидиву за умов комплексного вивчення розглянутих показників [4, 12-14]. Однак лишалося відкритим питання щодо їх можливих змін після проведеного лікування. Тому метою даної науково-дослідної роботи було дослідження рівнів трипсинподібної протеолітичної активності (ТПА), тромбінподібної амідолітичної активності (ТрПА) та вмісту  $\alpha_2$ -макроглобуліну в плазмі крові у хворих із злоякісними новоутвореннями навколоносових пазух і порожнини носа до та через 1 міс після проведеного лікування.

Об'єктом дослідження була бідна на тромбоцити плазма крові, яка отримувалась з надосадової рідини після видалення ерит-

роцитів з цитратної крові (1000 об/хв протягом 2 хв в центрифугі ОПН-8) шляхом її центрифугування при частоті обертання 4000 об/хв протягом 20 хв в центрифугі ОПН-8.

Дослідження проводились у 15 хворих із злюкисними новоутвореннями навколоносових пазух і порожнини носа. У всіх пацієнтів проводилось загальне клінічне та отоларингологічне обстеження за загальноприйнятою схемою: збір анамнезу, огляд ЛОР-органів, патогістологічне дослідження для верифікації новоутворення, ендоскопічне дослідження ЛОР-органів, КТ голови та ший з внутрішньовенним контрастуванням, УЗД ший та органів черевної порожнини, огляд терапевта, біохімічне дослідження та клінічний аналіз крові. Хворі отримували консервативне лікування або хірургічне втручання в залежності від стадії розповсюдження новоутворення та згідно з медичними протоколами. В післяопераційному періоді та після проведення хіміотерапії пацієнти отримували аргінінвміщуючий гепатопротектор, згідно з інструкцією. Біохімічні показники визначались до початку лікування і через 1 міс після початку. З 15 обстеже-

них хворих із злюкисними пухлинами навколоносових пазух і порожнини носа у 2 було діагностовано II стадію, у 4 – III, у 9 – IV стадію захворювання. Контролем слугували дані у 10 практично здорових осіб (донори).

ТПА в плазмі крові визначалась за методом К.М. Веремеєнка та співавторів [9] за швидкістю розщеплення протаміна сульфату в 1 мл плазми крові за 1 хв. ТрПА виявлялась за інтенсивністю гідролізу хромогенного синтетичного субстрату Хромозим ТН (Tos-Gly-Pro-Arg-пара-нітроанілід) [1] виражався в нмоль пара-нітроаніліну (п-НА), утвореного під дією 1 мл плазми крові за 1 хв. Вміст  $\alpha_2$ -М вимірювався за методом К.М. Веремеєнка та співавторів [9] і виражався в г/л.

Одержані дані було оброблено методом параметричної математичної статистики. Різниця між показниками вважалась достовірною при  $p < 0,05$  [6].

Результати дослідження рівня ТПА, ТрПА та вмісту  $\alpha_2$ -М в плазмі крові у первинних хворих із злюкисними новоутвореннями навколоносових пазух і порожнини носа наведено в табл. 1.

Таблиця 1

Рівні ТПА, ТрПА та вміст  $\alpha_2$ -М в плазмі крові у хворих із злюкисними новоутвореннями навколоносових пазух і порожнини носа в залежності від стадії онкологічного процесу до лікування

Групи обстежених	Показники (М±m)		
	ТПА, нмоль аргініна/ (хв·мл)	ТрПА, нмоль п-НА/мл·хв	вміст $\alpha_2$ -М, г/л
Практично здорові люди (контроль)	34,6±2,0	7,6±1,1	2,10±0,21
Хворі із злюкисними новоутвореннями II-III стадії	27,8±3,5 $p > 0,1$	21,5±6,5 0,1> $p > 0,05$	1,91±0,19 $p > 0,5$
Пухлини IV стадії	26,1±2,7 $p < 0,02$ $p_1 > 0,5$	31,8±9,1 $p < 0,02$	1,68±0,08 $p < 0,05$ $p_1 > 0,2$

*Примітки:* p – достовірність різниці порівняно з контролем;  $p_1$  – достовірність різниці порівняно з даними у пацієнтів з II-III стадіями захворювання.

Як видно з даних табл. 1, відмічається достовірно знижений рівень ТПА та вмісту  $\alpha_2$ -М в плазмі крові у хворих із злюкисними новоутвореннями навколоносових пазух і

порожнини носа IV стадії в середньому у 1,3 рази порівняно з аналогічними показниками у практично здорових осіб. Для хворих з II-III стадією захворювання характерні

подібні зміни, але на рівні тенденції. Рівень тромбінподібної активності до початку лікування був значно вищим у хворих обох груп порівняно з практично здоровими особами. У хворих з II-III стадією злоякісних новоутворень навколоносових пазух і по-

рожнини носа цей показник був збільшений у 2,8 рази, тоді як за IV стадії – у 4,2 рази порівняно з контролем.

Результати біохімічних досліджень у хворих до та після консервативного лікування наведені в табл. 2.

Таблиця 2

Рівні ТПА, ТрПА та вміст  $\alpha_2$ -М в плазмі крові хворих на злоякісні новоутворення навколоносових пазух і порожнини носа до та після консервативного лікування

Групи обстежених	Показники (M $\pm$ m)		
	ТПА, нмоль аргініна/ (хв·мл)	ТрПА, нмоль п-НА/мл·хв	вміст $\alpha_2$ -М, г/л
Практично здорові люди (контроль)	34,6 $\pm$ 2,0	7,6 $\pm$ 1,1	2,10 $\pm$ 0,21
Хворі до лікування	24,4 $\pm$ 2,6 p<0,01	27,3 $\pm$ 5,9 p<0,01	1,84 $\pm$ 0,14 p>0,2
Хворі після лікування	26,1 $\pm$ 2,3 p<0,02 p <sub>1</sub> >0,5	21,7 $\pm$ 4,6 p<0,01	1,71 $\pm$ 0,14 p>0,1 p <sub>1</sub> >0,5

*Примітки:* p – достовірність різниці порівняно з контролем; p<sub>1</sub> – достовірність різниці порівняно з даними у хворих до лікування.

Як видно, в плазмі крові у хворих із злоякісними новоутвореннями навколоносових пазух і порожнини носа до лікування достовірно зменшується рівень ТПА в 1,4 рази і на рівні тенденції – вміст  $\alpha_2$ -М порівняно з відповідними показниками у практично здорових осіб. Після проведеного лікування як рівень ТПА, так і вміст  $\alpha_2$ -М в плазмі крові у хворих залишався практично на рівні значень цих показників у них до лікування. Як бачимо, рівень тромбінподібної активності в плазмі крові онкологічних хворих до лікування статистично достовірно підвищений у 3,6 рази порівняно з таким у практично здорових осіб. Після проведеного лікування він не зазнає суттєвих змін, лишаючись достовірно підвищеним у 2,9 рази у порівнянні з контролем.

Слід зазначити, що в деяких наукових роботах констатується збільшення рівня ТПА, а також ріст активності інгібіторів протеїназ в плазмі крові у хворих із злоякісними новоутвореннями [3, 17]. Однак результати наших досліджень показали достовірне зниження рівня ТПА та вмісту  $\alpha_2$ -М в плазмі крові у хворих із злоякісними новоутвореннями навколоносових пазух і поро-

жнини носа порівняно з вказаними показниками у практично здорових осіб. Це узгоджується і з результатами досліджень інших авторів, які вивчали ТПА та вміст  $\alpha_2$ -М в плазмі крові у хворих на рак шлунка [7].

Підсумовуючи одержані результати, можна зробити наступні висновки.

1. При злоякісних новоутвореннях навколоносових пазух і порожнини носа спостерігалось збільшення рівня ТрПА на тлі зменшення ТПА та вмісту  $\alpha_2$ -М.

2. У хворих із злоякісними новоутвореннями навколоносових пазух і порожнини носа значно підвищена ТрПА, що більшою мірою виражено при IV стадії онкологічного процесу (p<0,02); після лікування цей показник не зазнає достовірних змін.

3. В кінці курсу лікування пацієнтів з діагнозом злоякісних новоутворень навколоносових пазух і порожнини носа нормалізації рівнів ТПА, ТрПА та вмісту  $\alpha_2$ -М не відбувалось.

Все це свідчить про складний та системний характер порушень регуляції біохімічних процесів, що задіяні в перебігу онкологічного процесу.

## Література

1. Веремеєнко К.Н., Голобородько О.П., Кизим А.И. Протеолиз в нормі і при патології. Київ: Здоров'я. – 1988. – 200 с.
2. Веремеєнко К.М., Кизим О.Й., Досенко В.Є.  $\alpha$ 2-макроглобулін: структура, фізіологічна роль і клінічне значення // Лабораторна діагностика. – 2000. – № 2. – С. 3-6.
3. Веремеєнко К.Н., Заболотный Д.И., Кизим А.И. Роль протеолиза в инвазии и метастазировании злокачественных опухолей // Журн. АМН Украины. – 2002. – Т. 8, № 2. – С. 217-237.
4. Верьовка С.В., Голобородько О.П., Кизим О.Й., Клись Ю.Г., Зайцева Н.В. Показники гемостатичної системи для оцінки перебігу захворювання на рак верхніх дихальних шляхів (Методичні рекомендації) (27.11/183.11), Київ, 2012, 20 с.
5. Верьовка С.В., Голобородько О.П., Кизим О.Й., Клись Ю.Г., Зайцева Н.В. Оцінка ризику післяопераційних ускладнень та рецидиву онкозахворювань верхніх дихальних шляхів за передопераційними показниками гемостатичної системи / Мат. щорічної традиційної весняної конференції Українського наукового медичного товариства оториноларингологів “Сучасні методи діагностики і лікування запальних захворювань ЛОР-органів” // Журн. вушних, носових і горлових хвороб. – 2012. – № 3-с. – С.33.
6. Верьовка С.В., Голобородько О.П., Кизим О.Й., Бурлака Ю.Б., Клись Ю.Г., Зайцева Н.В. Дослідження стану компонентів систем протеїнази-інгібітори, гемостазу, ендогенної інтоксикації та гостро фазових реагентів в плазмі крові хворих на рак верхніх дихальних шляхів з метою оцінки перебігу захворювання // Ринологія. – 2012. – № 1. – С.3-8.
7. Зорин Н. А. и др. Универсальный регулятор –  $\alpha$ 2-макроглобулин (обзор литературы) // Клини. лаб. диагностика. – 2004. – № 11. – С. 18-22.
8. Зорин Н.А., Зорина В.Н., Зорина Р.М. Роль альфа-2-макроглобулина при онкологических заболеваниях // Вопросы онкологии. – 2004. – Т. 50, № 5. – С. 515-519.
9. Кизим О.Й., Голобородько О.П., Клись Ю.Г., Зайцева Н.В., Верьовка С.В. Спосіб прогнозування виникнення рецидиву і метастазів у хворих на рак гортані // Патент на корисну модель № 61639 від 25.07.2011. Бюлетень № 14 від 25.07.2011.
10. Оглоблина О.Г., Арефьева Т.И. Роль протеолитических ферментов и их ингибиторов в инвазии злокачественных опухолей // Биохимия. – 1994. – №3. – С. 340-352.
11. Ойвин И.А. Статистическая обработка результатов экспериментальных исследований // Пат. физиол. – 1960. – № 4. – С. 76-85.
12. Петросян А.М., Харченко В.З. Изменения протеиназингибиторной системы у больных раком желудка // Онкология. – 2007. – Т.9, № 4. – С. 303-306.
13. Сперанский И.И., Самойленко Г.Е., Лобачева М.В. Общий анализ крови — все ли его возможности исчерпаны? Интегральные индексы интоксикации как критерии оценки тяжести течения эндогенной интоксикации, ее осложнений и эффективности проводимого лечения // Здоровье Украины. – 2009. – № 6 (19). – С. 51-57.
14. Черемисина О.В., Чайнзонов Е.Л. Возможности эндоскопической диагностики предопухольных заболеваний и рака гортани в современной онкологии // Сибирский онкологический журнал. – 2007. – № 3 (23). – С. 5-9.
15. Abilgaard U., Lie M., Odegard O.R. Antitrombin assay with new chromogenic substrates (S-2238 and chromozym TH) // Tromb. Res. – 1977. – Vol. 11, № 4. – P. 549-553.
16. Andrade R.J., Lucena M.I., Fernandez M.C. et al. Drug-induced liver injury: An analysis of 461 incidences submitted to the Spanish registry over a 10-year period // Gastroenterology. – 2005. – Vol. 129, № 2. – P. 512-521.
17. Zorina V.N., Zorin N.A., Lykova O.F., Konysheva T.V. Alpha2-macroglobulin ligands and mechanisms of their biotransport // Biochemistry (Moscow) Supplement series B: Biomedical chemistry. – 2007. – Vol.1. – № 3. – P. 216-219.

## References

1. Veremeenko KN, Goloborod'ko OP, Kizim AI. Proteolysis in normal and pathological conditions. Kiev: Zdorov'ia; 1988. 200 p. Russian.
2. Veremeenko KM, Kizim OJ, Dosenko VJe.  $\alpha$ 2-macroglobulin: structure, physiological role and clinical significance. Laboratorna diagnostyka. 2000;(2):3-6. Ukrainian.
3. Veremeenko KM, Zabolotnyy DI, Kyzym OJ. The role of proteolysis in invasion and metastasis of malignant tumors // Zhurn. NAMNU. 2002;8(2): 217-237. Ukrainian.
4. Ver'ovka SV, Goloborod'ko OP, Kyzym OJ, Kly's' JuG, Zajceva NV. Indicators of hemostatic system to assess progress of cancer of the upper respiratory tract (Guidelines) (27.11/183.11). Kyi'v; 2012. 20 p. Russian.
5. Ver'ovka SV, Goloborod'ko OP, Kyzym OJ, Kly's' JuG., Zajceva NV. Assessment of risk of postop-

- erative complications and recurrence of cancer of the upper airway by preoperative hemostatic system performance. Proceedings of the annual spring conference of Ukrainian ENT scientific medical society "Modern methods of diagnosis and treatment of inflammatory diseases of ENT organs" Zhurn. vushnyh, nosovyh i gorlovyh hvo-rob. 2012;(3-s):33. Ukrainian.
6. Ver'ovka SV, Goloborod'ko OP, Kyzym OJ, Burlaka JuB, Klys' JuG, Zajceva NV. Research of the components of proteinase inhibitors, hemostasis, endogenous intoxication and acute phase reactants in plasma of patients with cancer of the upper respiratory tract to assess the course of the disease. Rynologija. 2012;(1):3-8. Ukrainian.
  7. Zorin NA. Universal regulator –  $\alpha_2$ -macroglobulin (review). Klin. lab. diagnostika. 2004;(11):18-22. Ukrainian.
  8. Zorin NA, Zorina VN, Zorina RM. The role of alpha-2-macroglobulin in oncology. Voprosy onkologii. 2004;50(5):515-9. Russian.
  9. Kyzym OJ, Goloborod'ko OP, Klys' JuG, Zajceva NV, Ver'ovka SV. Method of predicting recurrence and metastasis in laryngeal cancer patients. Ukraine patent for utility model number № 61639. 25.07.2011. Bjuletен' № 14 from 25.07.2011. Russian.
  10. Ogloblina OG, Aref'eva TI. The role of the proteolytic enzymes and their inhibitors in cancer invasion. Biokhimiia. 1994;(3):340-52. Ukrainian.
  11. Oivin IA. Statistical analysis of the results of experimental studies. Pat. fiziol. 1960;(4):76-85. Russian.
  12. Petrosian AM, Kharchenko VZ. Changes proteinase inhibitor system in patients with gastric cancer. Onkologija. 2007;9(4):303-6. Russian.
  13. Speranskii II, Samoilenko GE, Lobacheva MV. Complete blood count – whether all its possibilities have been exhausted? Integral indices of intoxication as criteria for assessing the severity of endogenous intoxication, its complications and treatment efficacy. Zdorov'e Ukrainy. 2009;19(6): 51-7. Russian.
  14. Cheremisina OV, Chainzonov EL. The possibility of endoscopic diagnosis of precancerous diseases and cancer of the larynx in modern oncology. Sibirskii onkologicheskii zhurnal. 2007; 23(3):5-9. Russian.
  15. Abilgaard U, Lie M, Odegard OR. Antitrombin assay with new chromogenic substrates (S-2238 and chromozym TH). Tromb Res. 1977;11(4):549-53.
  16. Andrade RJ, Lucena MI, Fernandez MC. Drug-induced liver injury: An analysis of 461 incidences submitted to the Spanish registry over a 10-year period. Gastroenterology. 2005;129(2):512-21.
  17. Zorina VN, Zorin NA, Lykova OF, Konysheva TV. Alpha2-macroglobulin ligands and mechanisms of their biotransport. Biochemistry (Moscow) Supplement series B: Biomedical chemistry. 2007;1(3):216-9.

Надійшла до редакції 02.02.15.

© Н.В. Гринь, Ю.Г. Клись, Н.М. Ворошилова, С.В. Верьовка, 2015

## ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ И СОДЕРЖАНИЯ $\alpha_2$ -МАКРОГЛОБУЛИНА В ПЛАЗМЕ КРОВИ У БОЛЬНЫХ СО ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ НОВООБРАЗОВАНИЯМИ ОКОЛОНОСОВЫХ ПАЗУХ И ПОЛОСТИ НОСА

*Гринь Н.В., Клись Ю.Г., Ворошилова Н.М., Верёвка С.В. (Киев)*

### Резюме

Изучалось содержание  $\alpha_2$ -макроглобулина, суммарная протеолитическая и тромбинподобная активность в плазме крови у больных со злокачественными новообразованиями околоносовых пазух и полости носа. Показано, что при онкологическом процессе в околоносовых пазухах и полости носа увеличивается уровень ТрПА на фоне уменьшения ТПА и содержания  $\alpha_2$ -М. У больных с IV стадией злокачественного роста отмечено значительное повышение уровня ТрПА ( $p < 0,02$ ). В конце проведенного лечения у пациентов нормализации уровней ТПА, ТрПА и содержания  $\alpha_2$ -М не наблюдалось.

**Ключевые слова:** злокачественные новообразования, трипсин-, тромбинподобная активность,  $\alpha_2$ -макроглобулин.

**STUDY OF THE LEVELS OF PROTEOLYSIS AND CONTENT OF  $\alpha_2$ -MACROGLOBULIN  
IN PLASMA OF PATIENTS WITH MALIGNANT TUMORS OF NASAL CAVITIES**

*Gryn' N.V., Klys' Yu.G., Voroshylova N.M., Verevka S.V.*

*State institution «O.S. Kolomiychenko Institute of Otolaryngology  
of National Academy of Medical Sciences of Ukraine»  
e-mail: amtc@kndio.kiev.ua*

*A b s t r a c t*

**State of the problem:** Metabolic disorders are the integral circumstance of oncologic disease. All these processes are associated with excessive activation of proteolysis that cause to non-functional activation of various enzymes and factors with following proteolytic damage of proteins and development of endogenous intoxication. That's why the indices of proteolytic system accumulation of.

**Objective:** To investigate the relationship between the complaints of patients with initial SHL of the vascular origin and audiometry data in the extended (9-16 kHz) frequency band while having normal perception in the conventional band (0,125-8).

**Materials and Methods:** The levels of trypsin-like proteolytic and thrombin-like amidolytic activities commonly with the content of  $\alpha_2$ -macroglobulin in plasma of 15 patients with malignant tumors in nasal cavities before and after treatment were studied. The control group consisted of 10 healthy young men

**Results:** It was found that malignant tumors in nasal cavities are accompanied by increase of thrombin-like activity commonly with decrease of trypsin-like one. These effects are the most expressed at IV stage of diseases. The content of  $\alpha_2$ -macroglobulin didn't manifest noticeable digression of normal one. There was no annealing of both enzymatic indices after treatment as well as  $\alpha_2$ -macroglobulin's level.

**Conclusions:** The data obtained show the complicated and systemic character of the process abnormalities which are involved in the progress of oncologic disease.

**Key words:** malignant tumors, trypsin, thrombin,  $\alpha_2$ -macroglobulin.