

© Б.Г. Борзенко, О.М. Бакурова, К.О. Миронова, О.М. Заїка, А.В.Сидюк, Р.Б Кондратюк, Ю.О. Попович, 2011

УДК 577.15 : [616.33-006.6]- 053.008

Б.Г. БОРЗЕНКО, О.М. БАКУРОВА, К.О. МИРОНОВА, О.М. ЗАЙКА, А.В.СИДЮК,
Р.Б КОНДРАТЮК, Ю.О. ПОПОВИЧ

Донецький національний медичний університет імені М.Горького, кафедра біохімії, кафедра онкології, кафедра патоморфології; Донецький обласний протипухлинний центр, Донецьк

ПЕРСПЕКТИВИ ЗАСТОСУВАННЯ ФЕРМЕНТАТИВНИХ ТЕСТІВ ПРИ ХІМІОТЕРАПІЇ РАКУ ШЛУНКА

Динаміка активності ферментів в сироватці крові відображає активність пухлинного процесу, корелює з ерадикацією пухлини і може бути використана для прогнозу ефективності різних видів лікування онкологічних хворих. Вивчення індивідуальних особливостей активності ферментів «запасного шляху синтезу нуклеотидів» – тимідинкінази, тимідинфосфорилази, у хворих на рак шлунка в динаміці може допомогти у вирішенні питань щодо індивідуальної ефективності препаратів групи фторпіримідинів, або різних шляхів їх інфузії, а також для ранньої діагностики рецидиву.

Ключові слова: рак шлунка, тимідинкіназа, тимідинфосфорилаза, 5-фторурацил

Вступ. Україна займає 8 – 9 місце в десятці країн з найвищою захворюваністю на рак шлунка (РШ), щорічно в країні реєструються більше 12 000 хворих переважно з III – VI стадіями, тому однорічна летальність досягає 62,2 %. Оскільки на момент встановлення діагнозу велика частина хворих має поширений пухлинний процес, то вони підлягають тільки хіміотерапевтичному лікуванню [1]. Ситуація в світі дещо краща, лише в Японії на ранніх стадіях діагностують близько 53% РШ (в США–27%), тому 5-річне виживання хворих на РШ в Японії досягає 60% (в світі – 20%).

Хоча неоперабельний РШ є малочутливим до сучасних цитостатиків, однак хіміотерапія залишається єдиним реальним способом поліпшення якості життя, збільшення його тривалості з 4–5 до 10–12 місяців в порівнянні з симптоматичним лікуванням. Слід зазначити, що до теперішнього часу постійним компонентом всіх стандартних схем ПХТ, застосованих при РШ, залишається 5-фторурацил (5-ФУ), який в більшості випадків призначається в схемах поліхіміотерапії (ПХТ), що більш ефективні в порівнянні з монотерапією. Схеми ПХТ з 5-ФУ дозволяють отримати позитивний ефект у 31-55% хворих на поширений РШ, але таке лікування не завжди приводить до збільшення подовженості життя хворих. Отже, існує велика кількість хіміопрепаратів, що можуть бути ефективними при РШ, які характеризуються низькою токсичністю і зручністю застосування. Проте на сьогоднішній день не існує достовірних критеріїв, що дозволяють передбачити чутливість пухлини до тих або інших цитостатиків, індивідуалізувати терапію. Отже, актуальними є дослідження діагностичної значущості ферментативних тестів при прогнозуванні відповіді пухлини на хіміотерапію, наприклад, 5-фторурацилом або препаратами його групи – Кселодою (капецитабіном), тегафуром (1-(тетрагідро-2-фурил)-5-фторурацилом), фурулоном (5-дезоксид-5-фторуридином), УФТ –

комбінованим препаратом, що включає тегафур та урацил, S-1 (новий пероральний фторпіримідин, який містить в собі тегафур, 5-хлоро-2,4-дигідропіридин і оксонієву кислоту) [2, 3].

Відомо, що рівень проліферативних процесів в тканинах істотно залежить від рівня піримідинового попередника ДНК – ТМФ. Для пухлинних тканин значна частина його напрацьовується за «запасним» шляхом, під дією його ключових ферментів – тимідинкінази (ТК) і тимідинфосфорилази (ТФ). Саме ТК підтримує баланс дезоксирибонуклеозидфосфатів, необхідних для реплікації ДНК [4]. В останні роки вивчені локалізація, ізоферменти і властивості ТК. Виявлено, що максимальна активність ТК виявлена у S-фазі клітинного циклу і прямо корелює зі швидкістю синтезу ДНК та проліферативними процесами. Встановлено, що деякі препарати, що інгібують синтез ТМФ за «основним» шляхом (наприклад, фторпіримідини), можуть бути неефективні через високу активність ТК, яка каталізує «запасний» шлях синтезу.

В метаболізмі тимідину активну участь бере фермент тимідинфосфорилаза (ТФ). Цей фермент має ряд структурних та функціональних особливостей. Маючи одночасно анаболічну дію, стимулює синтез тимідину, а за рахунок катаболічної дії, руйнує його. ТФ активно впливає на включення тимідину в ДНК. Незвичайним є те, що ТФ ідентична фактору росту тромбоцитів – PD ECGF і стимулює ангиогенез [4]. Після цього відкриття даний білок став позначатися одночасно як фермент і фактор ангиогенезу – ТФ / PDECGF. [5,6]. Не менш важлива активність ТФ, яка бере участь у летальному синтезі фторурацилу та інших фторпіримідинів.

Мета дослідження. Порівняти та вивчити активність ТК, анаболічну та катаболічну активність ТФ в сироватці крові і тканинах у хворих на рак шлунка до та в процесі лікування.

Матеріали та методи. Матеріалом для дослідження були тканини раку шлунка та нетрансформованої слизової оболонки країв резекції 40 хворих з верифікованим діагнозом T3NxM0 стадії, сироватка крові 60 хворих на РШ віком від 36 до 60 років. Як контроль, використовували сироватку крові 60 умовно здорових осіб того ж віку, що не мали патології гастродуоденальної зони. Активність ТК визначали за стандартним методом [4] в деякій модифікації, використовуючи як субстрат 14С-тимідин російського виробництва. Радіоактивність дисків диетіл-аміно-етілцелюлозного паперу (диски ДЕАЕ-целюлозного паперу «Лімбро», Великобританія) підраховували в сцинтиляційній рідині СЖ-8 на лічильнику біологічному сцинтиляційному (СБС-2). Активність ТК виражали в наномолях тимідинфосфата, утвореного за 1 годину в перерахунку на 1 мг сироваткового білка. Активність ТФк і ТФан визначали спектрофотомет-

рійно [5] на СФ-46 при 300 нм по зміні оптичної щільності тиміна (тимідина) в 0,01 nNaOH. Концентрацію білка визначали за методом Лоурі [5]. Статистичне опрацювання результатів проводили з використанням параметричних та непараметричних методів програм пакету «MedStat».

Результати досліджень та їх обговорення. При вивченні активності ТК і ТФ в сироватці крові здорових людей і хворих на рак шлунка різного віку (табл.1) встановлено достовірне збільшення активності ТК в 1,5–2 рази у онкологічних хворих всіх досліджуваних вікових груп. Активність ТФк у хворих віком 36–45 років, практично не відрізняється від норми, але в наступних вікових групах достовірно знижується. Такі метаболічні зрушення в організмі хворих на рак шлунка, після 45 років, можуть свідчити про інтенсивніший синтез ТМФ, а значить і ДНК та проліферацію клітин.

Таблиця 1

Активність ферментів метаболізму тимідилата в сироватці крові в нормі та при раці шлунка

Вік	ТК, нмоль/год·мг		ТФан, нмоль/хв·мг		ТФк, нмоль/хв·мг	
	контроль	РШ	контроль	РШ	контроль	РШ
36 – 45	2,96±0,51	5,98±1,10*	9,82±0,78	15,23±0,51*	41,61±3,12	35,26±3,12
46 – 60	3,87±0,71	6,78±0,98*	11,06±1,03	18,40±1,88**	47,88±2,62	14,65±2,38***
61 – 70	3,05±0,32	4,28±0,89*	9,54±1,45	16,15±2,54*	52,01±2,89	17,32±2,28***

Примітка: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$, порівняно з контролем

З метою розробки прогностичних критеріїв проводяться численні дослідження до і в процесі лікування онкологічних хворих [6, 7]. Проте в даний час досить важко дати однозначну їх інтерпретацію. З прогностичною метою нами вивчалася активність ТК і ТФ в сироватці крові хворих на рак шлунка в процесі лікування. По-

передньо нами було показано, що активність сироваткових ферментів прямо корелює з активністю відповідних ферментів в тканинах (табл. 2). Наші дані узгоджуються з результатами вітчизняних і закордонних вчених, які вважають можливим використання активності сироваткових ферментів [4-7].

Таблиця 2

Активність ферментів в тканинах слизової оболонки шлунка та пухлинах у хворих на РШ

ТК, нмоль/год·мг		ТФан, нмоль/хв·мг		ТФк, нмоль/хв·мг	
СШ	пухлина	СШ	пухлина	СШ	пухлина
15,00 ± 1,77	48,00 ± 4,15	40,46 ± 4,77	88,01 ± 5,32**	57,82 ± 7,99	21,92 ± 4,60**

Примітка: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, порівняно із слизовою оболонкою краю резекції (СШ)

Вивчено активність ТК і ТФк в сироватці крові хворих на рак шлунка T3N1M0 віком 46–60 років до і в динаміці через кожні 3 дні (протягом двох тижнів) після різних форм оперативного втручання. При цьому встановлено, що через 3 дні після радикальної гастректомії активність ТК вірогідно знижена в 1,85 рази (відповідно, з $6,29 \pm 1,47$ до $3,40 \pm 0,58$ нмоль/год·мг, $p < 0,01$) та збільшена в 1,6 рази ТФк (з $16,04 \pm 2,51$ до $39,48 \pm 3,44$ нмоль/хв·мг, $p < 0,01$). Після паліативного втручання активність ТК знизилася в 2,79 рази (відповідно, з $5,50 \pm 0,67$ до $1,97 \pm 0,20$ нмоль/год·мг, $p < 0,001$), а ТФк збільшилась в 1,3 рази (з $9,04 \pm 1,05$ до $11,75 \pm 2,85$ нмоль/хв·мг, $p < 0,01$). Але при

цьому абсолютна активність ТФк була дуже низькою, як до, так і після операції. При діагностичній лапаротомії, активність досліджуваних ферментів вірогідно не змінювалася. Порівняльний аналіз даних показав, що більш виражені зміни ферментативної активності в післяопераційний період виявлені при радикальному втручання, що може бути обумовлено видаленням всієї пухлини з організму онкологічного хворого. Додаткові корективи внесло спостереження за динамікою активності ТК і ТФк протягом двох наступних тижнів після операції.

Після радикального втручання тривало послідовне зниження активності ТК, вона поступово

наближалася до норми ($2,09 \pm 0,56$ нмоль/год·мг). Активність ТФк вірогідно збільшувалася і складала $42,03 \pm 1,52$ нмоль/хв·мг, також наближаючись до норми.

У цей же період після паліативної операції, коли пухлина залишалась в організмі, активність ТК вже на 6-ий день після операції починала збільшуватись (небезпечний симптом) і до кінця другого тижня, перевищувала вихідну передопераційну активність, досягаючи $4,17 \pm 0,66$ нмоль/год·мг. Активність ТФк у цей час знижувалась, повертаючись до початкових значень. Таким чином, до та післяопераційна динаміка активності ТК, ТФк відображала характер операційного втручання і певною мірою стан онкологічного хворого.

З 1981 року в Донецькому обласному протипухлинному центрі успішно застосовується ендолімфатична хіміотерапія. Методика катетеризації лімфатичної судини в ділянці верхньої третини стегна відрізняється простотою і надійністю, дозволяє проводити тривалу інфузію хіміопрепаратів. Курсова доза препаратів вводиться в лімфатичну судину в перші 5 днів циклу, проте при необхідності тривалість розміщення катетера в судині може бути продовжено до 2 тижнів. Нами ретроспективно оцінено результати проведення ендолімфатичної хіміотерапії серед 68 хворих місцево розповсюдженим і метастазуючим РШ. Об'єктивний ефект відзначений у 29,4 % хворих, медіана виживання – 8,2 місяця. В середньому проводилося 3–4 курси лікування. Серед ускладнень при її проведенні найчастішими були місцеві у вигляді набряку кінцівки і лімфангіту на боці введення, а також системні ускладнення – помірне нейтропенія, блювота, які були відзначені лише у 2,4 % і 10,2 % хворих відповідно.

Інший, альтернативний шлях введення хіміопрепаратів, розроблений в ДОПЦ – внутрішньоартеріальна хіміотерапія. Для порівняння ефективності різних шляхів введення препаратів, нами відібрано 74 пацієнти з неоперабельним раком шлунка, які увійшли до досліджуваної групи. Пацієнти одержували від 3 до 6 курсів хіміотерапії 5-фторурацилом, який вводився внутрішньоартеріально (10–15 мг на кг маси тіла) протягом 5 днів. Курси повторювалися з інтервалом 21 день. Вік досліджуваних хворих – від 32 до 80 років, середній вік 62,4 року. Найчастіше в шлунку мали місце тотальне (28%) і субтотальне ураження (37%), у 92 % хворих під час інтраопераційних ревізій виявлені віддалені метастази. Гістологічна структура пухлин найбільш часто представлена аденокарциномою різного ступеня диференціювання і складала 86 %. Вивчення віддалених результатів лікування показало, що медіана виживання складала $11 \pm 0,6$ місяця.

Зараз активно вивчається прогностична значимість ТФ при визначенні ефективності хіміотерапії фторпіримідинами [6]. Слід враховувати, що її ефективність може безпосередньо залежати від гістологічного типу РШ, це необхідно враховувати

при її проведенні в кожному індивідуальному випадку. Добре відомо, що для РШ інтестинального та дифузного типів характерні різні проліферативні та апоптозні режими. Визначення особливостей активності ферментів метаболізму тимідилату в динаміці під час застосування наведених вище шляхів введення хіміопрепаратів мало б допомогти в з'ясуванні причин різної їх ефективності, а саме відмінностей термінів виживання. Індивідуальною особливістю пухлини може бути напрацювання попередників ДНК за двома шляхами, що протікають з різною інтенсивністю, а це, безумовно, впливатиме на відповідь пухлини або на сам 5-FU (азотова основа), або на нуклеозидні чи нуклеотидні форми фторпіримідинів. Ми вивчили особливості катаболічної та анаболічної активностей ТФ в пухлинах РШ різного гістогенезу. Активність ТФк в тканинах РШ інтестинального типу була знижена до $19,96 \pm 3,48$ нмоль/хв·мг порівняно з тканинами слизової краю резекції – $60,11 \pm 9,16$ нмоль/хв·мг, $p < 0,01$. В карциномах раку дифузного типу, відповідно – $24,25 \pm 3,52$ та в контролі – $56,22 \pm 6,77$ нмоль/хв·мг, $p < 0,01$. ТФан в тканинах РШ інтестинального типу була $93,74 \pm 5,64$, в контролі – $41,03 \pm 7,04$ нмоль/хв·мг, $p < 0,01$. В карциномах раку дифузного типу, відповідно $73,42 \pm 5,62$, в контролі – $40,71 \pm 8,07$ нмоль/хв·мг, $p < 0,01$. Остання мала вірогідні відмінності в пухлинах різного типу ($t = 2,55$, $p < 0,05$). Вона була вищою переважно в високодиференційованих аденокарциномах (ВДАК), що належать до РШ інтестинального типу. У випадках, коли хворі одержували на доопераційному етапі 5-фторурацил, в матеріалі ВДАК ми реєстрували випадки зі зниженням анаболічної активності ТФ. При гістологічному дослідженні в цих зразках спостерігався виражений лікувальний патоморфоз.

Зараз ТФ визнають показником ефективності препаратами фторурацилу, а також показником прогнозу виживання [8, 9]. На наш погляд, також можливим є застосування цього ферментативного тесту для індивідуального оцінювання в динаміці ефективності різних шляхів введення препаратів.

Висновки. Більшості хворим на рак шлунка показана хіміотерапія як компонент комбінованого або паліативного лікування.

Основу сучасної хіміотерапії раку шлунка складають фторурацил та його похідні групи фторпіримідинів.

Отже, вивчення індивідуальних особливостей активності ферментів «запасного шляху синтезу» піримідина-тимідилата – ТК, ТФ, у хворих на рак шлунка в динаміці може допомогти у вирішенні питань щодо індивідуальної ефективності препаратів групи фторпіримідинів або різних шляхів їх інфузії, а також для ранньої діагностики рецидиву. Динаміка активності ферментів в сироватці крові, певною мірою, відображає активність пухлинного процесу і може бути використана для прогнозу ефективності різних видів лікування онкологічних хворих.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Бакурова О.М. Зміни активності ферментів обміну нуклеотидів у пацієнтів із виразковою хворобою та раком шлунка / О.М. Бакурова, С.О. Зуйков, Я.Г. Жебеленко // Науковий вісник Ужгородського університету, серія «Медицина». — 2008. — Вип. 34. — С. 3—5.
2. Бондарь Г.В. Рак желудка / Г.В.Бондарь, А.Ю.Попович // Новоутворення.- 2007. — №2. — С.151 — 162.
3. Волков Н.М. Лекарственная терапия метастатического рака желудка / Н.М.Волков // Практическая онкология. — Т. 10, №1. — 2009. — С. 41—48.
4. Использование ферментов метаболизма тимидина в качестве критерия эффективности лечения онкобольных / Б.Г. Борзенко, Е.М. Бакурова, Ю.Д. Турсунова [и др.] // XI Российский онкологический конгресс. — 20—22 ноября 2007 года. — Москва: Российская академия государственной службы при Президенте РФ. — С. 240.
5. A Phase II Study of Oxaliplatin, 5-Fluorouracil, Leucovorin, and High-Dose Capecitabine in Patients With Metastatic Colorectal Cancer / Sam J. Lubner, Noelle K. LoConte, Kyle D. Holen [et al.] // Clinical Colorectal Cancer. — 2010.- Vol. 9, № 3. — P. 157-161.
6. Chemotherapy in advanced gastric cancer: A systematic review and analysis on aggregate data / Wagner A., Grothe W., Haerting J. [et all] // J. Clin. Oncol. — 2006. — Vol. 24. — P.2903— 2909.
7. Daozhen Ch. An experimental study on cervix cancer with combination of HSV-TK/GCV suicide gene therapy system and 60Co radiotherapy/ Daozhen Chen, Qiusha Tang // BMC Cancer. — 2010. — №10. — P. 609 — 614.
8. Higher expression of deoxyuridine triphosphatase may predict the metastasis potential of colorectal cancer/ A. Kawahara, Y. Akagi, S. Hattori [et all] // J. Clin. Pathology. — 2009. — Vol. 62, № 4. — P. 364 — 369.
9. Low Thymidylate Synthase, Thymidine Phosphorylase, and Dihydropyrimidine Dehydrogenase mRNA Expression Correlate With Prolonged Survival in Resected Non—Small-Cell Lung Cancer/ Peter P. Grimmering, Paul M. Schneider, Ralf Metzger [et all] // Clinical Lung Cancer. — 2010.- Vol. 11, № 5. — P. 328 — 334.
10. The cytosol activity of thymidine phosphorylase in endometrial cancer / E. Miszczak-Zaborska, R. Kubiak, A. Bienkiewicz [et all]// J. of Experimental and Cancer Research. — 2008. — Vol. 27 — P. 64 — 69.
11. Thymidine phosphorylase and dihydropyrimidine dehydrogenase expression in hepatocellular carcinoma and metastatic liver cancer / T. Hotta, Y. Kobayashi, K. Taniguchi [et all]// Oncol. Rep. — 2004. —Vol.12, №2. — P. 347 —351

B.G.BORZENKO, H.M.BAKUROVA, K.O.MIRONOVA, O.N.ZAIKA, A.B.SYDIUK, R.B.KONDRATIUK,
Y.O. POPOVICH

Donetsk National Medical University, Department of Biochemistry, Department of Oncology, Department of Pathomorphology; Donetsk Regional Tumor Center, Donetsk

THE PERSPECTIVES OF ENZYME ACTIVITY TESTS USING IN STOMACH CARCINOMA THERAPY

Age-dependant peculiarities of nucleotide metabolism enzymes activity were revealed both in normal health and under the researched pathological state. The activity of thymidine kinase, thymidine phosphorylase in serum of patients with stomach cancer is close to their activity in the stomach cancer tissue. Enzyme testes were proposed, which may be used when determine the efficacy of treatment, making prognosis.

Key words: stomach cancer, thymidine phosphorylase, thymidine kinase, 5-fluorouracil

Стаття надійшла до редакції: 6.04.2011 р.