

## БИОХИМИЯ

УДК 616-006.6-07:616.15

### **ХАРАКТЕР ИЗМЕНЕНИЙ МАРКЕРОВ АКТИВАЦИИ И АПОПТОЗА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ НОВООБРАЗОВАНИЯМИ ЯЗЫКА И ДРУГИХ ЛОКАЛИЗАЦИЙ**

**С.Н. Лебедев, Н.Н. Слюсарь, А.И. Шматко**

Тверская ГМА Минздрава России, Тверь

Статья посвящена исследованию в сыворотке крови маркеров активации и апоптоза у больных карциномой языка, желудка, предстательной железы, шейки матки, молочной железы. Изучено содержание растворимых мембранных рецепторов активации, также модулирующих процессы апоптоза – sCD30, sCD40, sCD95 (sAPO-1/FAS), лиганда TRAIL (APO-2L), ранних свидетелей эффекторной стадии апоптоза фермента Caspase-1/ICE. Установлено, что количество указанных маркеров в сыворотке крови онкологических больных достоверно отличается от их уровня у здоровых лиц. Существуют достоверные отличия концентрации указанных показателей у больных карциномой языка III-IV стадии.

**Ключевые слова:** сыворотка крови, маркеры апоптоза, рак языка, карцинома.

**Введение.** Апоптоз – запрограммированная асинхронная гибель клеток, обеспечивающая физиологическое равновесие и генетическую стабильность организма за счет самоуничтожения генетически измененных клеток. Апоптоз играет важную роль в обеспечении гомеостаза, осуществляет защитную функцию, оптимизируя функции иммунной и нервной системы. В последние годы большое внимание уделяется изучению апоптоза с точки зрения влияния его на патологические процессы, в том числе и при онкологической патологии (Jalving, 2006; Holoch, Griffin, 2009; Хараева и др., 2011). Особая роль отводится исследованиям маркеров семейства фактора некроза опухолей (TNF), способных вызвать различные биохимические изменения в клеточных структурах (Zhang Y., Zhang B., 2008; McLornan et al., 2010; Stadel et al., 2010). Наряду с мембранными молекулами активации и апоптоза в иммунных реакциях принимают участие и их растворимые формы (s-формы) рецепторов и лигандов, которые обладают иммунорегуляторными свойствами, а их уровни также отражают процессы активации и элиминации клеток иммунной системы и могут служить маркерами течения патологического процесса. В настоящее время растворимые мембранные молекулы клеток иммунной системы, особенно маркеры активации и апоптоза, исследуются при

аутоиммунных, инфекционных и онкологических заболеваниях (Новиков и др., 2005, 2007) Вместе с тем, в этих исследованиях отсутствуют данные о количественных изменениях маркеров активации и апоптоза при злокачественных новообразованиях (ЗН) различных локализаций, а также в зависимости от стадии онкозаболевания.

Все вышеизложенное и определило цель настоящей работы как исследование маркеров активации и апоптоза в сыворотке крови у больных с карциномой различной локализации и стадии.

**Методика.** Обследовано 132 пациента с первичновыявленной карциномой до начала противоопухолевого лечения, госпитализированных в специализированные отделения Тверского областного клинического онкологического диспансера. Среди них было 30 пациентов (22 мужчины и 8 женщин со ЗН желудка (код по МКБ-10 С16), 27 мужчин со ЗН предстательной железы (С61), 25 женщин со ЗН шейки и тела матки (С53, С54), 26 женщин со ЗН молочной железы (С50). II-III стадия ЗН указанных локализаций была установлена клинически на догоспитальном этапе, а диагноз карциномы был подтвержден данными морфологических исследований. Средний возраст онкологических больных составил 49 лет и колебался от 38 до 60 лет. Кроме того, указанное биохимическое исследование проведено и 24 больным (16 мужчин и 8 женщин, в возрасте 45-60 лет) с карциномой подвижной части языка (С02) I, II, III и IV стадии опухоли. Диагноз и стадия карциномы языка у всех больных были дополнительно подтверждены данными инструментальных и морфологических исследований. Обследованные пациенты не имели признаков ИБС, сахарного диабета, носительства маркеров гепатита В, С, ВИЧ, аллергических, аутоиммунных и инфекционных заболеваний. Контрольную группу составили 15 практически здоровых лиц (без признаков аллергических, аутоиммунных, инфекционных и паразитарных заболеваний), проходивших диспансеризацию, в возрасте 35-42 лет.

Исследование содержания в сыворотке крови растворимых мембранных маркеров апоптоза sCD95(sAPO-1/FAS), растворимого индуцирующего апоптоз TNF-зависимого лиганда TRAIL, свидетелей ранней стадии эффекторного этапа апоптоза фермента Caspase-1/ICE, а также sCD30 и sCD40 – маркеров активации, модулирующих также процессы апоптоза, осуществляли посредством иммуноферментного анализа по общепринятым методикам (Koga et al., 2004; Macher-Goeppinger et al., 2009) с использованием коммерческих наборов (BCM Diagnostis, Великобритания, «Human sAPO-1/FAS ELISA», «Human TRAIL ELISA», «Human Caspase-1/ICE ELISA», «Human sCD30 ELISA», «Human sCD40 ELISA», Австрия) на автоматическом иммуноферментном анализаторе «Униплан» (Россия). Единицы

измерений для лиганда TRAIL, фермента Caspase-1/ICE, а также sCD95 и sCD40 – pg/ml, для sCD30 – U/ml.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием критерия Стьюдента, различия считали достоверными при  $p < 0,05$ .

**Результаты и обсуждение.** Анализ исследуемых биохимических показателей в сыворотке крови больных со ЗН позволил установить, что содержание лиганда TRAIL, индуцирующего апоптоз, у них в 1,4 раза ниже его уровня у здоровых лиц (табл. 1).

Т а б л и ц а 1

Содержание сывороточных маркеров активации и апоптоза у онкологических больных и у здоровых лиц ( $M \pm m$ )

Группы обследованных	TRAIL, pg/ml	sCD30, U/ml	sCD40, pg/ml	sCD95, pg/ml	Caspase-1/ICE, pg/ml
Здоровые лица, n=15	98±3,7	25,1±3,5	30±2,8	347±11,2	47,4±2,8
ЗН языка, n=24	76,5±2,7*	39,7±3,4*	44,7±4,1*	437±12,6*	38,2±2,1*
ЗН желудка, n=30	80,6±3,4*	36,8±2,7*	41,7±3,5*	418±10,3*	39,1±1,4*
ЗН предстательной железы, n=27	85,5±3,1*	41,7±4,8*	39,6±2,5*	422±9,8*	40,7±2,5
ЗН шейки и тела матки, n=25	86,2±2,9*	40,6±5,1*	42,4±3,4*	430,1±10,1*	41,2±2,6
ЗН молочной железы, n=26	79,6±3,8*	37,6±3,5*	43,7±3,2*	427±10,4*	42,5±3,0

*Примечание.* \* - достоверность различий ( $p < 0,05$ ) в сравнении со здоровыми лицами.

Вместе с тем, показатели лиганда TRAIL статистически не отличались при различных локализациях злокачественного процесса. Обращает на себя внимание тот факт, что содержание sCD30, способного передавать информацию для иммунной системы и связанного с пролиферацией Т- и В-клеток, в сыворотке крови онкологических больных, в среднем, в 1,35 раза выше их значений у здоровых лиц. Та же тенденция к увеличению количества маркера апоптоза обнаружена и при исследовании sCD40, соединения влияющего на опосредованный В-клеточный апоптоз и, соответственно, на различные фазы В-клеточного ответа. Так, содержание sCD40 у больных с различной локализацией ЗН достоверно превышало их уровень у здоровых лиц. Причем, коэффициент соотношения маркеров sCD30/ sCD40 у больных раком составлял, в среднем, 0,9, тогда как у здоровых лиц – 0,83. Среди ключевых молекул апоптоза, которые являются рецептором смерти, наибольший интерес представлял sCD95, выступающий как маркер поздней активации и локализирующийся преимущественно на Т-лимфоцитах-хелперах. Содержание sCD95 в сыворотке крови онкологических больных, в среднем, в 1,3 раза выше их уровня у здоровых лиц ( $p < 0,05$ ). Достоверных различий количества sCD95 у больных с различной локализацией рака не обнаружено.

Эффекторное плечо апоптозного пути представлено семейством внутриклеточных протеаз, называемых каспазами. В наших исследованиях представлена Caspase-1/ICE, отвечающая за протеолитические процессы на ранней стадии апоптоза, способная функционировать как медиатор сигнала смерти. Содержание Caspase-1/ICE в сыворотке крови больных, в среднем, в 1,32 раза ниже его значений у здоровых лиц. Учитывая регулируемую роль протеаз в иммунном ответе можно констатировать, что снижение их концентрации у больных карциномой свидетельствует о ферментных изменениях и, следовательно, нарушении элиминации иммунных клеток, что может приводить к утяжелению патологического процесса.

На примере пациентов с карциномой подвижной части языка, у которых, с учетом визуализации первичного опухолевого очага и доступности обнаружения регионарного метастатического процесса при первичном обследовании, точно устанавливается стадия (I,II,III,IV) онкологического процесса, было проанализировано содержание маркеров активации и апоптоза в зависимости от стадии ЗН (табл. 2).

Таблица 2

Содержание сывороточных маркеров активации и апоптоза у больных карциномой языка в зависимости от стадии заболевания (M±m)

Группы обследованных	TRAIL, pg/ml	sCD30, U/ml	sCD40, pg/ml	sCD95, pg/ml	Caspase-1/ICE, pg/ml
I стадия, n=6	84,3±2,5	35,5±2,1	41,5±1,7	402±10,8	40,1±1,8
II стадия, n=6	80,6±3,0	36,8±2,0	42,8±3,1	422±9,4	39,4±2,2
III стадия, n=6	72,5±3,1*	40,1±2,2	47,2±2,4	443,2±10,3*	35,2±1,5*
IV стадия, n=6	69,5±2,4*	43,4±1,5*	49,1±1,8*	448,4±11,2*	34,7±1,1*

*Примечание.* \* - достоверность различий (p<0,05) в сравнении с больными I стадией опухоли.

Содержание исследуемых маркеров у больных карциномой языка I стадии статистически не отличалось от их уровня при II стадии. Вместе с тем, обнаружены достоверные различия содержания в сыворотке крови больных TRAIL, лиганда семейства TNF, индуцирующего апоптоз, sCD95 и Caspase-1/ICE между I и III стадиями заболевания. Более существенные изменения уровня содержания маркеров обнаружены между I-II и IV стадиями ЗН. Однако, показатели содержания TRAIL, sCD30, sCD40, sCD95 и Caspase-1/ICE у больных карциномой языка III стадии незначительно отличались от их уровня у больных с IV стадией.

**Заклучение.** Полученные результаты свидетельствуют о достоверных изменениях в сыворотке крови маркеров активации и апоптоза у больных с различной локализацией ЗН и при запущенных (III–IV) стадиях злокачественного процесса до проведения противоопухолевого лечения. Оценка уровня сывороточных маркеров активации и апоптоза иммунных клеток может быть использована в

качестве дополнительного диагностического и прогностического критерия, служить методом иммуномониторинга заболевания и назначенной терапии. Считаем, что только определение комбинации маркеров позволит разработать критерии диагностики, контроля за лечением и прогнозирования заболевания.

### **Список литературы**

- Новиков В.В., Евстигнеева И.В., Караулов А.В., Барышников А.Ю.* 2005. Растворимые формы мембранных антигенов клеток иммунной системы при социально-значимых заболеваниях // Рос. биотерапевтический журнал. № 3. С. 131-142.
- Новиков В.В., Барышников А.Ю., Караулов А.В.* 2007. Растворимые формы мембранных антигенов клеток иммунной системы // Иммунология. №4. С. 249-253.
- Хараева З.Ф., Иванова М.Р., Шевченко А.А.* 2011. Особенности ФНО-индуцированного апоптоза у больных с парентеральными гепатитами и герпетической инфекцией // Фундам. исследования. №7. С. 152-154.
- Jalving M., de Long S., Koomstra J.J.* 2006. Trail induced apoptosis in human colorectal cell lines and human colorectal adenomas // Clin. Cancer Res. V.12. P. 4350-4356.
- Holoch P.A., Griffin T.S.* 2009. TNF-related apoptosis-inducing ligand (Trail): A new path to anti-cancer therapies // Eur. J. Pharmacol. V. 625. № 1-3. P. 63-72.
- Koga Y., Matsuzaki A., Suminoe A.* 2004. Neutrophil-derived TNF-related apoptosis-inducing ligand (Trail): a novel mechanism of antitumor effect by neutrophils // Cancer Research. V. 64. P. 1037-1043.
- Macher-Goeppinger S., Aulmann S., Tagscherer R.E.* 2009. Prognostic value of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (Trail) and Trail receptors in renal cell cancer // Clin. Cancer Res. V. 15. P. 650-659.
- McLornan D.P., Barret H.L., Cummins P.* 2010. Prognostic significance of Trail signaling molecules in Stages II and III of colorectal cancer // Clin. Cancer Res. V. 16. P. 3442-3451.
- Stadel D., Mohr A., Ref C.* 2010. Trail-induced apoptosis in preferentially mediated via Trail receptor 1 in pancreatic carcinoma cells and profoundly enhanced by XIAP inhibitors // Clin. Cancer Res. V.16. P. 5734-5749.
- Zhang Y., Zhang B.* 2008. Trail resistance of breast cancer cells is associated with constitutive of death receptors 4 and 5 // Mol. Cancer Res. V.6. P. 1861-1871.

**CHANGES IN MARKERS OF ACTIVATION  
AND OF APOPTOSIS IN THE SERUM OF PATIENTS WITH  
MALIGNANT TUMORS OF THE TONGUE  
AND OF THE OTHER LOCATIONS**

**S.N. Lebedev, N.N. Slusar, A.I. Shmatko**

Tver State Medical Academy, Tver

The article investigates the serum markers of activation and apoptosis in patients with carcinoma of the tongue, stomach, prostate, cervix and breast. We studied the content of soluble membrane receptors of activation, which modulate the apoptosis: sCD30, sCD40, sCD95 (sAPO-1/FAS), ligand TRAIL (APO-2L), representing the early witnesses of the effector stage of the apoptosis of the enzyme Caspase-1/ICE. It was found that the number of these markers in the serum of cancer patients was significantly different from their level in healthy persons. There are significant differences in concentrations of these parameters in patients with carcinoma of the first stage III-IV.

**Keywords:** *serum blood, markers of apoptosis, cancer of tongue, carcinoma.*

*Об авторах:*

ЛЕБЕДЕВ Сергей Николаевич – кандидат медицинских наук, доцент кафедры хирургической стоматологии и реконструктивной челюстно-лицевой хирургии, ГБОУ ВПО «Тверская ГМА Минздрава России», 170100, Тверь, ул. Советская д. 4, e-mail: lebedev\_s@tvergma.ru

СЛЮСАРЬ Николай Николаевич – доктор медицинских наук, профессор кафедры биохимии с курсом клинической лабораторной диагностики, ГБОУ ВПО «Тверская ГМА Минздрава России», 170100, Тверь, ул. Советская д. 4, e-mail: slusar2011@rambler.ru

ШМАТКО Андрей Иванович – аспирант кафедры биохимии с курсом клинической лабораторной диагностики, ГБОУ ВПО «Тверская ГМА Минздрава России», 170100, Тверь, ул. Советская д. 4, e-mail: abertolletti@rambler.ru

Лебедев С.Н. Характер изменений маркеров активации и апоптоза в сыворотке крови больных злокачественными новообразованиями языка и других локализаций // С.Н. Лебедев, Н.Н. Слюсарь, А.И. Шматко // Вестн. ТвГУ. Сер. Биология и экология. 2015. № 1. С. 45-50.