

П.В. Сенько

**ИЗМЕНЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ
ПИРУВАТКИНАЗЫ M2 И ФАКТОРА HIF1A
ПРИ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОМ РАКЕ ЛЕГКИХ**

Научный руководитель: канд. биол. наук, доц. Е.М. Барабанова

Кафедра биологической химии

Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск

P.V. Senko

**CHANGES IN SERUM CONCENTRATIONS OF PYRUVATE KINASE M2
AND FACTOR HIF1A IN NON-SMALL-CELL LUNG CANCER**

Tutor: associate professor E.M. Barabanova

Department of Biological Chemistry

Belarusian State Medical University, Minsk

Резюме. В данной статье автор исследует сыворотки крови здоровых и больных НМРЛ пациентов путем определения концентрации пируваткиназы M2 и фактора HIF1A, в том числе изменения значений данных показателей в зависимости от наличия заболевания и его стадии, предлагает использовать данные показатели в диагностике немелкоклеточного рака легких.

Ключевые слова: пируваткиназа M2, фактор HIF1A, рак легких, диагностика.

Resume. In this article the author examines the blood serum of healthy and sick patients with NSCLC by determining the concentration of pyruvate kinase M2 and HIF1A factor, including changes in the values of these indicators depending on the presence of the disease and its stage, and proposes to use these indicators in the diagnosis of Non-small Cell Lung Cancer.

Keywords: pyruvate kinase M2, HIF1A factor, lung cancer, diagnosis.

Актуальность. За последние 10 лет в Республике Беларусь наблюдается высокая частота постановки диагноза немелкоклеточного рака легких (НМРЛ) [4]. Однако достоверных методов диагностики, выявляющих данную патологию на первых стадиях, до сих пор не найдено. Требуется высокоспециализированное оборудование и многочисленные затраты, которые, даже в совокупности, не могут выявить полную картину и оценить риск рецидива заболевания. Менее затратным, доступным и безопасным способом диагностики может быть исследование ряда маркеров в сыворотке крови, что уже используется для диагностики таких заболеваний как рак толстой кишки или печени [5].

Цель: изучить закономерности изменения концентрации фермента пируваткиназа M2 (ПКМ2) и гипоксия индуцибельного фактора 1 альфа (HIF1A) в сыворотке крови у людей с разными стадиями НМРЛ и у здоровых добровольцев. Оценить перспективы использования данного метода для диагностики заболевания на ранних стадиях и для оценки риска перехода на последующие стадии.

Задачи:

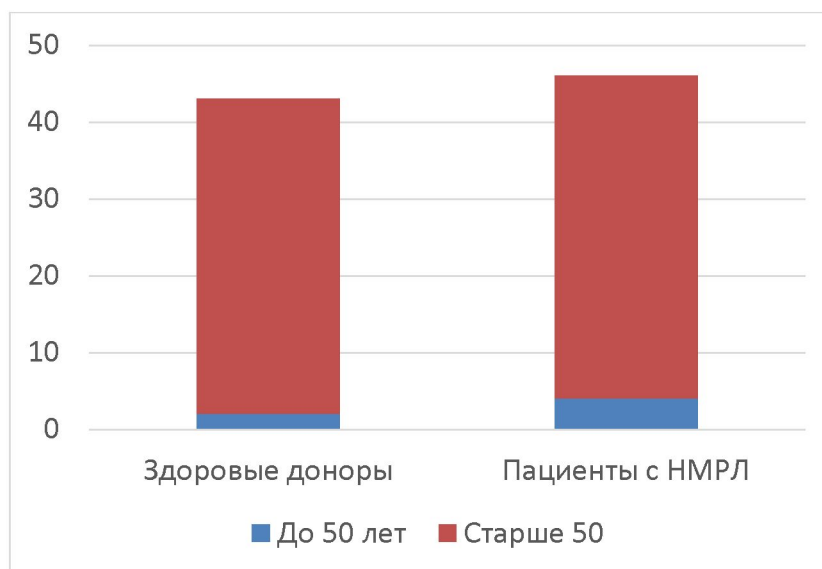
1. Распределить пациентов в группы в соответствии с разными стадиями немелкоклеточного рака легких.

2. Изучить концентрацию пируваткиназы и HIF1 α у здоровых людей и больных НМРЛ.

3. Сравнить изменение концентрации данных показателей у людей с ранними, поздними стадиями болезни и здоровых доноров.

4. Оценить их перспективы использования в качестве маркеров НМРЛ.

Материал и методы. Исследовались образцы крови 89 человек, среди которых 43 человека были абсолютно здоровыми донорами, а у 46 диагностировали НМРЛ. Средний возраст пациентов с НМРЛ в выборке - 62 года (минимальный возраст - 43 года, максимальный - 77), при этом стоит принять во внимание, что возраст 51 из 54 пациентов (94%) составляет более 50 лет (диаграмма 1).



Диагр. 1 – Возраст пациентов с НМРЛ и здоровых доноров

Материалом для исследования служила сыворотка крови. Определение концентрации ПКМ2 и HIF1A проводилось с помощью ИФА-наборов Fine Test (КНР) на автоматическом ИФА-анализаторе Brio (Seac, Италия). Статистический анализ полученных данных осуществляли с использованием компьютерных пакетов статистических программ SPSS Statistics v23, Excel 2013 («Microsoft Office»). Для статистического описания результатов вычисляли медиану (Me), первый и третий квартили (Q1 и Q3). С целью сравнительного анализа различий между малыми выборками использовали непараметрический критерий Манна – Уитни. Результаты считали достоверными при уровне статистической значимости $p < 0,05$. Была дана сравнительная характеристика и выделены статистически значимые величины, различия в значениях между малыми выборками оценивались по критерию Манна-Уитни.

Объяснить повышение концентрации ПКМ2 можно тем, что большинство раковых клеток способны производить энергию преимущественно с помощью очень активного гликолиза с последующим образованием молочной кислоты, а не посредством медленного гликолиза и окисления пирувата в митохондриях с использованием кислорода как в большинстве нормальных клеток. В клетках быстро растущей злокачественной опухоли уровень гликолиза почти в 200 раз выше, чем в нормальных тканях. При этом гликолиз остаётся предпочтительным даже в условиях, когда кислород в избытке.

Ранее предполагалось, что эти изменения в обмене веществ являются фундаментальной причиной рака. Сегодня известно, что главные причины злокачественной трансформации клеток — это мутации в онкогенах и генах-супрессорах опухолей, а изменения метаболизма – лишь следствие этих мутаций [6]. Таким образом, клетке не хватает кислорода и по нашим предположениям она также должна экспрессировать фактор HIF1A (выделяющийся в ответ на гипоксию ткани) [1].

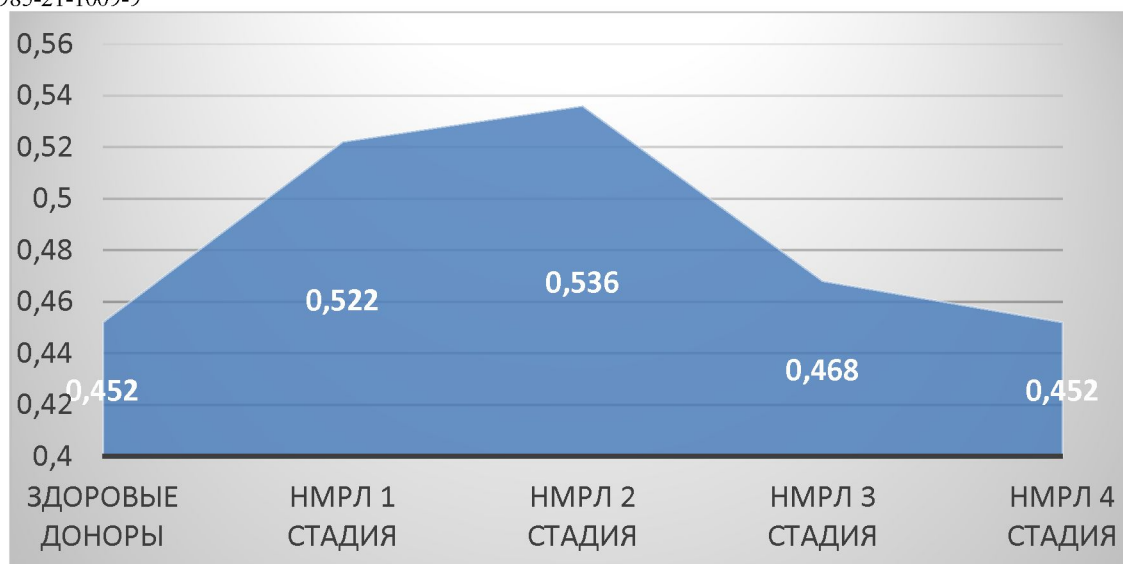
Аналогичных исследований измерения концентрации HIF1A в сыворотке крови найдено не было. Однако, ранее проведённые исследования выявили экспрессию HIF1A при большинстве злокачественных новообразований человека в тканях. Zhong H. и соавторы подтвердили это своим исследованием: экспрессия HIF1A иммуногистохимически была определена в 179 образцах опухолей человека. Также было установлено, что его гиперэкспрессия отмечается в 13 из 19 типов опухолей (опухоли толстого кишечника, молочной железы, легкого, кожи, яичника, поджелудочной, предстательной железы, почки и желудка) [3].

Недавние исследования, в которых сравнили экспрессию ПКМ2 в нормальных тканях и тканях злокачественной опухоли молочной железы, а также рака желудка, показало, что содержание ПКМ2 значительно повышается в клетках опухоли по сравнению с нормальными клетками.

Кроме того, имеются данные, что уровни мРНК ПКМ2 были также повышены при колоректальном раке, раке пищевода, раке печени, раке легкого, раке груди и раке мочевого пузыря. Следовательно, высокая экспрессия ПКМ2 в тканях связана с различными типами рака у людей. Таким образом стоит более детально исследовать специфичность предполагаемого маркера, вести поиск комбинации из нескольких маркеров для достоверного диагностирования или опровержения диагноза НМРЛ [2].

Однако данных по повышению концентрации пируваткиназы непосредственно в крови, а не в тканях, в условиях развития опухолевого процесса найдено не было. Стоит отметить закономерность, что доказанное повышение содержания ПКМ2 в клетках, в случае разрушения мембран, вызывает попадание фактора в кровь, следовательно, повышенную по сравнению с нормой концентрацию, что скорее всего мы и получим в результате.

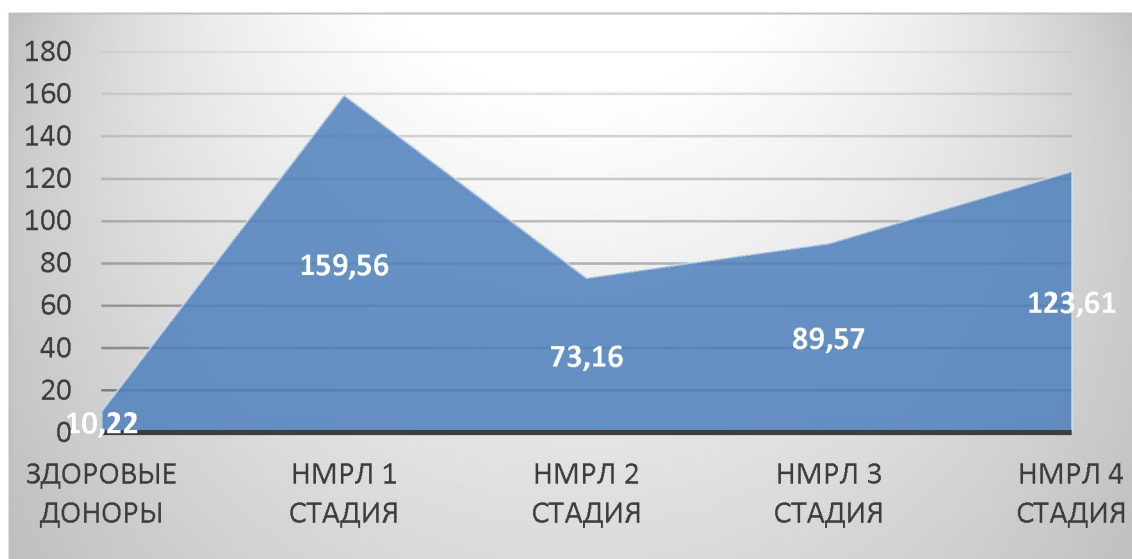
Результаты и их обсуждение. В исследуемой выборке определена концентрация HIF1A в сыворотке крови. У доноров без онкологии она составила 0,214-1,520 пг/мл (медиана – 0,452 пг/мл), у пациентов, имеющих 1 стадию НМРЛ – 0,434-1,839 пг/мл (0,522 пг/мл), 2 стадию – 0,413-0,980 пг/мл (0,536 пг/мл), 3 стадию – 0,265-2,420 пг/мл (0,468 пг/мл), 4 стадию – 0,283-0,570 пг/мл (0,452 пг/мл). Исходя из полученных данных можно сделать вывод, что концентрация HIF1A в сыворотке крови доноров и пациентов с НМРЛ находится в одних пределах, с незначительными изменениями на 1 и 3 стадиях (диаграмма 2).



Диагр. 2 – Концентрация фактора HIF1A у здоровых доноров и людей с разными стадиями НМРЛ (пг/мл)

Сравнение значений концентраций HIF1A у доноров со значениями концентраций пациентов с НМРЛ на разных стадиях не выявили статистически значимые различия между выборками. Возможность использования HIF1A как диагностирующего фактора данным исследованием не подтверждается.

Концентрация фермента пируваткиназа M2 в сыворотке крови различается у здоровых людей и пациентов с онкологией. Так, у доноров средняя величина составила 10,22 пг/мл, у пациентов с первой стадией заболевания – 159,56 пг/мл, 2 стадией – 73,16 пг/мл, 3 стадией – 89,57 пг/мл, 4 стадией – 123,61 пг/мл (диагр. 3).



Диагр. 3 – Концентрация фермента Пируваткиназа M2 у здоровых доноров и людей с разными стадиями НМРЛ (пг/мл)

В результате сравнения значений концентраций доноров без диагноза НМРЛ со значениями концентраций ПКМ2 пациентов с точно установленным диагнозом НМРЛ на разных стадиях по критерию Манна-Уитни, можно сделать вывод о степени

значимости различий между переменными, считая их независимыми выборками. В результате различия между выборками оказались статистически значимыми и существует возможность использования пируваткиназы М2 в качестве диагностирующего фактора. Средняя концентрация ПКМ2 в крови пациентов с опухолью в 11 раз превышает данный показатель в крови доноров.

В результате последовательного сравнения значений концентраций пируваткиназы М2 пациентов с различными стадиями НМРЛ (1 стадию со 2; 2 стадию с 3; 3 стадию сравнивали с 4) по критерию Манна-Уитни, достоверных различий выявлено не было. Таким образом можно сделать вывод, что по нашим данным ранжировать заболевание по стадиям на основании концентрации пируваткиназы М2 затруднительно, однако наблюдалась тенденция роста показателя ПКМ2 от 2 стадии к 4: увеличение концентрации от 2 стадии к 3 составило 22%, от 3 к 4 – 38%. Явный скачок показателя концентрации пируваткиназы на 1 стадии нельзя объяснить теоретически, что требует дополнительных исследований (таблица 1).

Табл. 1. Возможность использования фермента Пируваткиназа М2 и фактора HIF1A как потенциальных маркеров для ранжирования НМРЛ

Показатель	Здоровые и больные	Здоровые и I и II стадия	Здоровые и III и IV стадия	I и II стадия и III и IV стадия
Пируваткиназа М 2	+	+	+	–
Фактор HIF1A	–	+	–	–

Выводы:

1. В ходе исследования выяснилось, что определение концентрации в сыворотке крови фермента пируваткиназа М2 может использоваться для диагностики НКРЛ, так как на ранних стадиях были выявлены статистически значимые различия в уровне фермента между пациентами и здоровыми донорами.

2. Дальнейшее повышение концентрации (от 2 к 4 стадии) подтверждает целесообразность использования этих показателей в качестве маркеров для ранжирования данного процесса по стадиям.

3. Определение уровня HIF1A с целью диагностики данного заболевания не является целесообразным.

Литература

1. Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha / N. V. Lyer et al. // Genes and Development. – 1998. – Vol. 12. – № 2. – С. 149-162.
2. The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth / M. G. Vander Heiden et al. // Nature. – 2008. – Vol. 452. – № 7184. – С. 220-235.
3. Гуменюк, Л. Д. Экспрессия гипоксия индуцибельного фактора-1А в ткани рака желудка человека и ее связь с некоторыми клиническими характеристиками заболевания / Л. Д. Гуменюк, С. П. Меренцев // Онкология. – 2006. – Т. 8. – № 1. – С. 1-7.
4. Джемаль, А. Статистика рака / А. Джемаль, Р. Сигел, Дж. Сью // CA Pak J Clin. – 2010. – № 60. – С. 277-300.
5. Крацке, Р. Эпидемиология рака легкого / Р. Крацке, М. Дж. Франклин // Springer: конф. – Берлин, 2011. – С. 2100-2124.
6. Нидюлин, В. А. Об эпидемиологии рака легких / В. А. Нидюлин, Б. В. Эрдниева // Медицинский вестник Башкортостана. – 2009. – Т. 4. – № 1. – С.63-82.