

УДК: 616.62-006.6-073

DOI: 10.15587/2519-8025.2018.148330

## КІЛЬКІСНИЙ ТА ЯКІСНИЙ СКЛАД МОЛЕКУЛ СЕРЕДНЬОЇ МАСИ В ПЛАЗМІ КРОВІ ТА ГОМОГЕНАТАХ ПУХЛИН В ХВОРИХ НА РАК СЕЧОВОГО МІХУРА

© В. В. Дмитрик, Д. І. Креницька, Т. В. Луговська, П. Г. Яковлев

**Мета:** дослідити та охарактеризувати присутність молекул середньої маси в плазмі крові та гомогенатах пухлин у хворих на рак сечового міхура при різних стадіях захворювання.

**Матеріали та методи:** в досліді брали участь пацієнти з діагнозом рак сечового міхура різних стадій згідно загально прийнятій TNM класифікації. Заключний діагноз ставився після рентгенологічних, ендоскопічних, клінічних методів дослідження з морфологічною верифікацією. Жоден із пацієнтів не отримував лікування онкологічних захворювань попередньо дослідженню. В передопераційний період у пацієнтів отримували плазму за стандартною методикою. Тканини пухлин та візуально здорових стінок сечового міхура відбиралися при біопсії та одразу після операції. Отримання молекул середньої маси та визначення їх вмісту в плазмі крові та гомогенатах тканин проводили за методом Ніколайчука. Якісний склад білкової складової фракції молекул середньої маси досліджували за допомогою хроматографії, що поділяє за розмірами на колонці з сефадексом G 15.

**Результати:** в ході дослідження показано достовірні зміни вмісту молекул середньої маси в плазмі крові та гомогенатах пухлин хворих на рак сечового міхура. Зміни корелюють з стадією захворювання. Проведено якісний аналіз складу білкової компоненти молекул середньої маси, використовуючи хроматографію, що поділяє за розмірами. Показано зміни кількості та площі максимумів хроматограми, молекулярну масу сполук у зразках.

**Висновки:** Отримано фракцію молекул середньої маси з плазми крові та тканин пухлин хворих на рак сечового міхура різних стадій. Досліджено кількісний та якісний вміст фракції молекул середньої маси в плазмі крові та в гомогенатах пухлин. Вміст молекул середньої маси в плазмі крові та тканинах пухлин хворих на рак сечового міхура достовірно збільшується в порівнянні з плазмою крові умовно здорових чоловіків та здоровими тканинами стінок сечового міхура. Присутня залежність концентрації молекул середньої маси від стадії раку сечового міхура. Якісний склад молекул середньої маси в плазмі крові та гомогенатах пухлин відрізняється від складу в плазмі умовно здорових пацієнтів або в здорових тканинах сечового міхура

**Ключові слова:** молекули середньої маси, рак сечового міхура, онкомаркери, поліпептидний пул

### 1. Вступ

Рак сечового міхура (PCM) розповсюджене захворювання, яке характеризується високим показником смертності у всьому світі [1]. За частотою діагностування є 9-тим серед онкологічних захворювань населення планети, найчастіше захворювання діагностують в розвинених країнах. Близько 75% пацієнтів, котрим діагностують PCM – є чоловіки [2, 3]. PCM характеризується дефіцитом малоінвазивних методів діагностики. На сьогодні не досліджена точна участь MCM в розвитку захворювання. Кількісні та якісні характеристики MCM можуть бути використані для диференціювання діагностики даної патології.

### 2. Літературний огляд

В структурі клінічної картини онкологічних захворювань характерним є синдром ендогенної інтоксикації [4]. Ендогенна інтоксикація є складним багатокомпонентним процесом, котрий обумовлений патологічною активністю ендогенних продуктів та дисфункцією систем детоксикації та біотрансформації [5]. Розвиток ендогенної інтоксикації супроводжується збільшенням концентрації MCM, та є важливим показником ступеню токсикації організму [6].

Велика частина MCM характеризується біологічною активністю, для близько 600 таких молекул досліджені регуляторні властивості [7, 8]. За будовою, MCM близькі до регуляторних пептидів, та зда-

тні блокувати клітинні рецептори, змінюючи метаболізм та функції клітин [9, 10]. MCM беруть участь в реалізації функцій нервової, ендокринної, імунної, серцево-судинної та інших систем. Дослідження впливу MCM на клітини вказують на здатність впливати на деконденсацію гетерохоматину в еухроматин, тим самим, підсилюючи транскрипцію генів [11]. Окрім вищеописаного, MCM здатні до формування стійких комплексів з транспортними системами крові, як наслідок, відбуваються коформаційні модифікації транспортних компонентів крові, кількісні характеристики при цьому можуть бути незмінними. Наявні дані літератури свідчать про важливість MCM в підтриманні гомеостазу, в тому числі в регуляції проліферації, диференціації та клітинній гибелі [8, 12]. Рядом авторів було досліджено, що MCM утворюються не тільки за рахунок спеціалізованих білків-прекурсорів, але як і результат процесингу функціональних білків (ензимів, структурних, транспортних, захисних білків) [7, 13]. Літературні дані вказують на тісний зв'язок між вмістом MCM та посиленням вільнорадикальних процесів в організмі, котрі призводять до утворення продуктів перекисного окиснення ліпідів та білків. Порушення в клітинах, тканинах або органах внаслідок розвитку патологічного процесу призводять до значних змін кількісних та якісних характеристик MCM [14]. Висока стабільність кількісного та якісного складу MCM протягом тривалого часу

за фізіологічних умов розглядається як важлива ланка в довготривалих процесах, в тому числі регуляції циклів сну, циркадних ритмів, імунного статусу.

З ростом пухлин в кровотоці підвищується вміст їх метаболітів, важлива частка котрих припадає саме на МСМ [15, 16]. Ріст пухлини супроводжується розвитком синдрому ендогенної інтоксикації. Кількісні та якісні характеристики МСМ можуть бути простим та швидким кореляційним показником, який міг би характеризувати важкість фізіологічного стану онкохворих. Таким чином, МСМ можуть розглядатися як індикатор біохімічного статусу та фізіологічного стану організму.

### 3. Мета та задачі дослідження

Мета дослідження – дослідити та охарактеризувати присутність молекул середньої маси в плазмі крові та тканинах пухлин у хворих на РСМ різних стадій.

Для досягнення мети були поставлені наступні завдання:

1. Отримати фракцію молекул середньої маси з плазми крові хворих на РСМ.
2. Отримати фракцію молекул середньої маси з тканин пухлин сечового міхура.
3. Дослідити кількісний та якісний вміст фракції молекул середньої маси в плазмі крові та в гомогенатах пухлин.

### 4. Матеріали та методи

В досліді брали участь пацієнти з РСМ різних стадій згідно загально прийнятній TNM класифікації. Заключний діагноз ставився після рентгенологічних, ендоскопічних, клінічних методів дослідження з морфологічною верифікацією. Групу контролю склали 11 умовно здорових чоловіків такого ж віку, на плановому обстеженні без онкологічних патологій в анамнезі. Групу хворих на РСМ першої стадії склали 11 чоловіків, другої стадії – 10 чоловіків, третьої стадії – 12 чоловіків, четвертої стадії – 10 чоловіків. Жоден із пацієнтів не отримував лікування онкологічних захворювань попередньо дослідженню. В передопераційний період у пацієнтів отримували плазму

за стандартною методикою. Тканини пухлин та візуально здорових стінок сечового міхура відбиралися при біопсії, одразу після операції, або під час трансуретральної резекції.

Тканини пухлин та здорових стінок сечового міхура гомогенізували за допомогою скляного гомогенізатора в 10 мМтрис-НСІ-буфері, рН 7,4, що містив 1 мМ ЕДТА та 250 мМ сахарозу у співвідношенні 1:5 (тканина:буфер). Центрифугували 10 хв при 1500 g. Супернатант розфасовували в мікропробірки і заморожували при  $-20^{\circ}\text{C}$  до подальшого використання.

Отримання МСМ та визначення їх вмісту в плазмі крові та гомогенатах тканин проводили за методом Ніколайчука [9]. Всі маніпуляції проводили на льоду, на кожному кроці витримували 15 хвилин інкубації. Високомолекулярні комплекси в біологічних матеріалах були осаджені 1,2 М  $\text{HClO}_4$  у співвідношенні 1:1, після чого центрифугували 20 хв при 5000 g. Надосад нейтралізували 5МКОН до рН 7,0. Після чого, суміш центрифугували 20 хв. при 2500 g. Етанол додавали до фінальної концентрації 80% та центрифугували впродовж 15 хвилин при 2500 g. Концентрацію МСМ в надосаді вимірювали на спектрофотометрі при довжині хвилі 254 нм.

Якісний склад білкової складової фракції МСМ досліджували за допомогою хроматографії, що поділяє за розмірами на колонці з сефадексом G 15. Отримані зразки МСМ з 500 мкл зразків плазми крові або тканини піддавались ліофілізації, після якої розчиненню в 1 мл 0,05 М Tris-НСІ, рН 7,4 з додаванням 0,13 М NaCl. Швидкість хроматографічного процесу складала 18 мл/год. Хроматографічна колонка була відкалібрована з застосуванням розчинів стандартних маркерів, таких як: лізоцим (молекулярна маса 14,3 кДа), інсулін (5,7 кДа) та вітамін В12 з молекулярною масою 1,35 кДа.

### 5. Результати досліджень та їх обговорення

Нами були досліджені зміни вмісту МСМ плазми крові та в тканинах пухлин хворих на РСМ різних стадій. Вміст МСМ в плазмі крові пацієнтів був вищий в порівнянні з вмістом в плазмі умовно здорових пацієнтів (рис. 1).

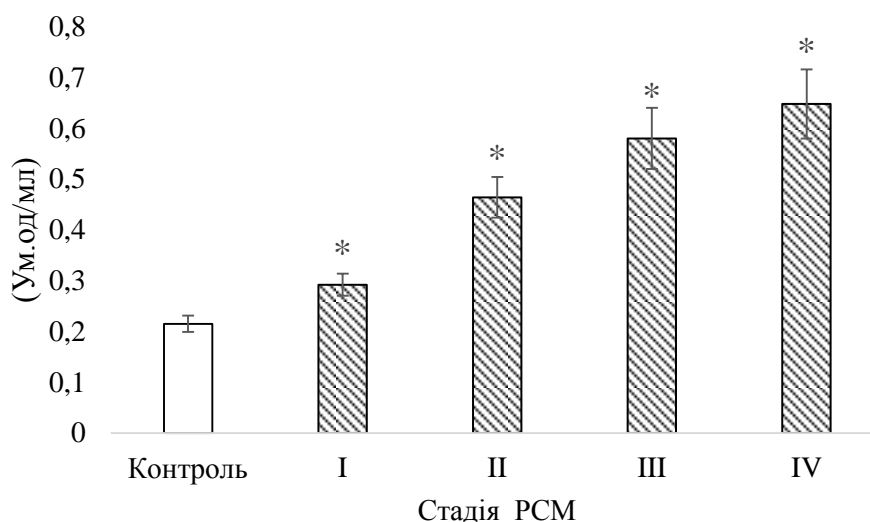


Рис. 1. Вміст МСМ в плазмі крові хворих на РСМ різних стадій в передопераційний період

Вміст МСМ в плазмі крові пацієнтів хворих на РСМ першої стадії в 1,35 разів вищий в порівнянні з групою умовно здорових чоловіків на плановому обстеженні. В пацієнтів з другою та третьою стадіями РСМ вміст МСМ був вищий в 2,16 та в 2,7 разів відповідно. В пацієнтів з четвертою стадією РСМ вміст МСМ був вищий в три

рази достовірно, в порівнянні з групою умовно здорових пацієнтів.

На наступному етапі було досліджено вміст МСМ в гомогенатах тканин пухлин хворих на РСМ різних стадій. Вміст МСМ в гомогенатах тканин пухлин вищий в порівнянні з гомогенатами тканин здорових стінок РСМ (рис. 2).

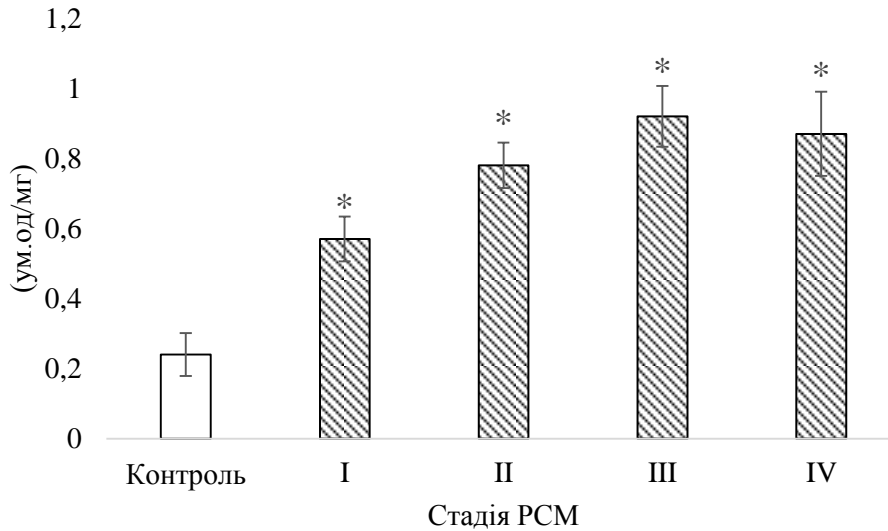


Рис. 2. Вміст МСМ в гомогенатах тканин пухлин хворих на РСМ різних стадій

Вміст МСМ в тканинах пухлин був в 2,38 разів вищим для пухлин першої стадії РСМ. В тканинах пухлин першої та другої стадії РСМ вміст МСМ був вищим в 3,25 та в 3,84 рази відповідно до тканин візуально здорової стінки сечового міхура. В пухлинах 4 стадії РСМ вміст МСМ був вищим в 3,63 рази відносно вмісту в візуально здорових стінках РСМ.

Вміст МСМ може бути інтегральним показником порушення метаболізму, і перш за все відобразити патологічні зміни білкового обміну [5].

Після дослідження кількісного вмісту, було проведено якісний аналіз вмісту МСМ в плазмі крові та гомогенатах тканин пухлин в пацієнтів хворих на РСМ різних стадій.

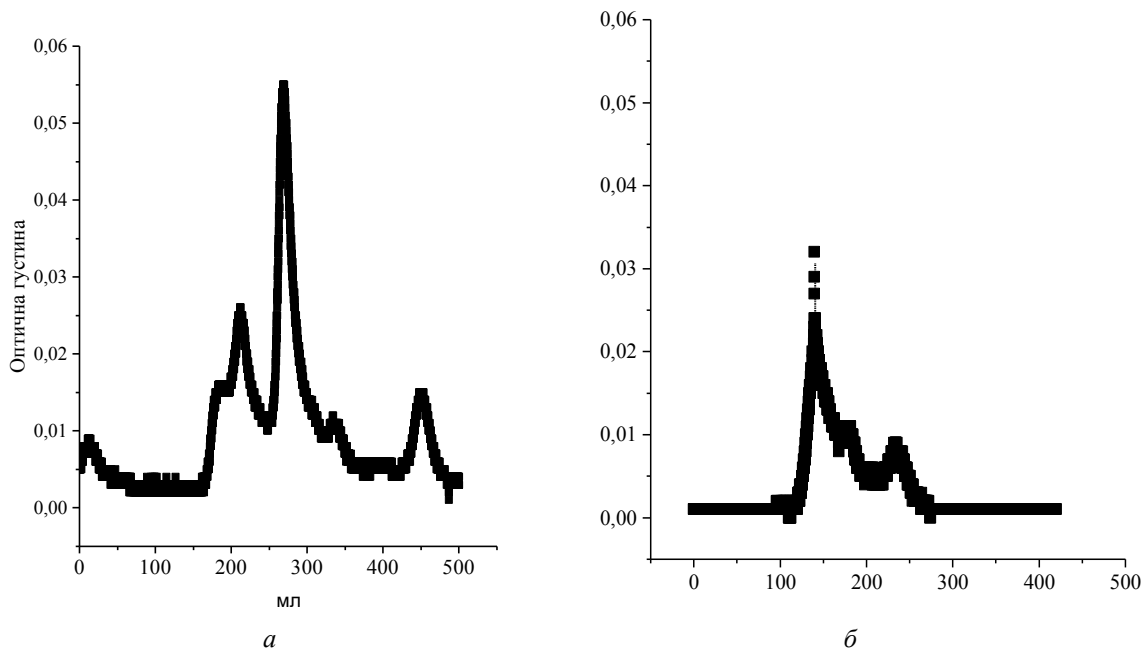


Рис. 3. Типові хроматограми розділення білкової компоненти МСМ хворих на РСМ: а – типова хроматограма фракції плазми крові; б – типова хроматограма фракції гомогенатів тканин пухлин

Дослідження якісного складу білкової компоненти МСМ проводили, використовуючи хроматографію, що поділяє за розмірами на колонці з сефадексом G 15. Представлені хроматограми є типовими

для кожної досліджуваної групи, і різниця складається тільки в кількості та параметрах піків. Для кількісної характеристики отриманих хроматограм були зроблені їх обрахунки, дані представлено в табл. 1, 2.

Таблиця 1

Характеристики якісного складу МСМ в плазмі крові пацієнтів хворих на РСМ різних стадій

Фракція МСМ, отримана з плазми крові:	Загальна площа піків (ум.од)	Кількість піків	Молекулярна маса білкових молекул піку (Да)	Площа піка (ум.од)
Умовно здорових пацієнтів	2.25	1	1113.2	0.102
		2	958.5	0.442
		3	697.3	0.367
		4	662.3	1.089
		5	443.6	0.145
		6	386.5	0.106
		7	-----	-----
		8	-----	-----
Пацієнтів з РСМ I стадії	3.46	1	1124.5	0.616
		2	963.8	0.944
		3	678.5	0.704
		4	625.9	1.149
		5	383	0.052
		6	-----	-----
		7	-----	-----
		8	-----	-----
Пацієнтів з РСМ II стадії	3.01	1	862.6	0.11
		2	744.8	0.525
		3	585.1	0.681
		4	550.4	1.378
		5	349.7	0.317
		6	-----	-----
		7	-----	-----
		8	-----	-----
Пацієнтів з РСМ III стадії	1.93	1	1160.4	0.084
		2	1084.9	0.082
		3	947.3	0.487
		4	682.5	0.266
		5	655.9	0.25
		6	626.4	0.624
		7	432.3	0.046
		8	384.8	0.095
Пацієнтів з РСМ IV стадії	1.78	1	895.2	0.102
		2	840.4	0.183
		3	746.4	0.266
		4	573.3	1.09
		5	351.8	0.14
		6	-----	-----
		7	-----	-----
		8	-----	-----

У пацієнтів з РСМ I та II стадії загальна площа нижче піків (максимумів хроматограми) була більшою в 1,54 та в 1,34 рази відповідно до значень в плазмі відносно здорових пацієнтів. В пацієнтів з РСМ III та IV стадій загальна площа піків була нижчою по відношенню до значень контролю. Окрім різ-

ниці в кількості піків суттєво змінюються якісні характеристики (табл. 1).

При дослідженні розвитку РСМ важливо охарактеризувати локальні зміни МСМ, а саме в гомогенатах пухлин сечового міхура. Нами було проведено якісний аналіз вмісту МСМ в тканинах пухлин (табл. 2).

Таблиця 2

Характеристики якісного складу МСМ в гомогенатах пухлин пацієнтів хворих на РСМ різних стадій

Фракція МСМ, отримана з гомогенатів:	Загальна площа піків (ум.од)	Кількість піків	Молекулярна маса білкових молекул піку (Да)	Площа піка (ум.од)
Здорових стінок сечового міхура	0.082	1	274	0.008
		2	269.7	0.014
		3	259.9	0.04
		4	244.7	0.005
		5	236.1	0.015
		6	-----	-----
		7	-----	-----
		8	-----	-----
Пухлин РСМ I стадії	0.120	1	271.79	0.021
		2	0.26	0.065
		3	0.24	0.031
		4	0.21	0.003
		5	-----	-----
		6	-----	-----
		7	-----	-----
		8	-----	-----
Пухлин РСМ РСМ II стадії	0.105	1	1104.5	0.032
		2	997.9	0.004
		3	904.8	0.047
		4	667.9	0.022
		5	-----	-----
		6	-----	-----
		7	-----	-----
		8	-----	-----
Пухлин РСМ РСМ III стадії	0.089	1	512.8	0.022
		2	273	0.019
		3	267	0.005
		4	243.5	0.032
		5	237.2	0.005
		6	227.4	0.006
		7	-----	-----
		8	-----	-----

В зразках пухлин РСМ першої стадії площа максимумів хроматограми була вищою в 1,46 рази, порівняно з площею максимумів в зразках здорових стінок сечового міхура. Зміни в якісному складі МСМ показані й для зразків гомогенатів інших стадій РСМ (табл. 2). Якісний склад фракцій МСМ в гомогенатах пухлин відрізняється від здорових стінок сечового міхура. Для II та III стадій характерні значні відмінності в молекулярній масі.

## 6. Висновки

1. Отримано фракцію молекул середньої маси з плазми крові хворих на РСМ.

2. Отримано фракцію молекул середньої маси з тканин пухлин сечового міхура.

3. Досліджено кількісний та якісний вміст фракції молекул середньої маси в плазмі крові та в тканинах пухлин.

Вміст молекул середньої маси достовірно збільшується при РСМ як в плазмі крові пацієнтів так і в тканинах пухлин. Присутня залежність концентрації МСМ від стадії РСМ. Якісний склад МСМ в плазмі крові та тканинах пухлин відрізняється від складу МСМ в плазмі умовно здорових пацієнтів або в здорових тканинах сечового міхура.

## Література

- Ploeg M., Aben K. K. H., Kiemeny L. A. The present and future burden of urinary bladder cancer in the world // World Journal of Urology. 2009. Vol. 27, Issue 3. P. 289–293. doi: <http://doi.org/10.1007/s00345-009-0383-3>
- Epidemiology of urinary bladder cancer: from tumor development to patient's death / Murta-Nascimento C. et. al. // World Journal of Urology. 2007. Vol. 25, Issue 3. P. 285–295. doi: <http://doi.org/10.1007/s00345-007-0168-5>
- Plasma levels of MMPs and TIMP-1 in urinary bladder cancer patients / Ishchuk T. et. al. // Biomedical Research and Therapy. 2018. Vol. 5, Issue 1. P. 1931–1940. doi: <http://doi.org/10.15419/bmrat.v5i1.407>

4. Лопухин Ю. М., Добрецов Г. Е., Грызунов Ю. А. Конформационные изменения молекулы альбумина; новый тип реакции на патологический процесс // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2000. № 130 (7). С. 4–9.
5. Малахова М. Я. Эндогенная интоксикация как отражение компенсаторной перестройки обменных процессов в организме // Эфферентная терапия. 2000. № 6 (4). С. 3–14.
6. Афанасьева А. Н., Евтушенко В. А. Эндогенная интоксикация у больных раком желудка в раннем послеоперационном периоде // Клиническая лабораторная диагностика. 2005. № 2. С. 18–21.
7. Филиппова М. М., Карелин А. А., Иванов В. Т. Биологически активные протеолитические фрагменты функциональных белков, полученные *in vitro* // Биоорганическая химия. 1997. № 23 (5). С. 388–409.
8. Хавинсон В. Х., Рыжак Г. А. Пептидная регуляция основных функций организма // Вестник Росздравнадзора. 2010. № 6. С. 58–62.
9. Николайчук В. В., Корковский Б. В., Лобычева Г. А. «Средние молекулы» – образование и способы определения // Лабораторное дело. 1989. № 8. С. 31–33.
10. Чаленко В. Возможные причины повышения концентрации молекул средней массы при патологии // Патологическая физиология. 1998. № 4. С. 13–15.
11. Никольская В. А., Данильченко Ю. Д., Меметова З. Н. Биохимический аспект рассмотрения роли молекул средней массы в организме // Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского. Серия «Биология, химия». 2013. Т. 26, № 1 (65). С. 139–145.
12. Стволовые клетки и короткие пептиды: перспективы применения в геронтологии / Линькова Н. С. и др. // Геронтология. 2013. № 2. С. 12–18.
13. Yackin O. Isolation of functional fragments of proteins and quantitative determination their content in the cells and tissues of human and rat // Expert Review of Molecular Diagnostics. 2005. Vol. 5. P. 145–157.
14. Астахова Т. А., Асташов В. В., Морозов С. В. Хромато-масс-спектрофотометрический анализ продуктов ПОЛ в органах и тканях в условиях модели токсикоза // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 1998. № 4. С. 52–55.
15. Лабораторные показатели эндогенной интоксикации при раке тела матки и значение их определения для оценки стадии и степени дифференцировки опухоли / Принькова Т. Ю. и др. // Лабораторная диагностика. Восточная Европа. 2012. № 4. С. 79–87.
16. Lowenthal M. S. Analysis of Albumin-Associated Peptides and Proteins from Ovarian Cancer Patients // Clinical Chemistry. 2005. Vol. 51, Issue 10. P. 1933–1945. doi: <http://doi.org/10.1373/clinchem.2005.052944>

*Рекомендовано до публікації д-р біол. наук Савчук О. М.  
Дата надходження рукопису 02.10.2018*

**Дмитрик Віктор Васильович**, аспірант, кафедра біохімії, ННЦ "Інститут біології та медицини", Київський національний університет імені Тараса Шевченка, пр. Академіка Глушкова, 2, м. Київ, Україна, 03127

E-mail: victordmytryk@gmail.com

**Креницька Дарина Ігорівна**, кафедра біохімії, ННЦ "Інститут біології та медицини", Київський національний університет імені Тараса Шевченка, пр. Академіка Глушкова, 2, м. Київ, Україна, 03127

**Луговська Тетяна Василівна**, кандидат біологічних наук, кафедра біохімії, ННЦ "Інститут біології та медицини", Київський національний університет імені Тараса Шевченка, пр. Академіка Глушкова, 2, м. Київ, Україна, 03127

**Яковлев Павло Георгійович**, кандидат медичних наук, кафедра урології, Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, бул. Тараса Шевченка, 13, м. Київ, Україна, 01601