

**Міністерство освіти і науки України
Чернівецький національний університет
імені Юрія Федьковича**

Навчально-науковий інститут біології, хімії та біоресурсів

Кафедра біохімії та біотехнології

**Біохімічні маркери функціонального стану печінки за умов
розвитку первинних пухлин печінки та пухлин непечінкового
походження**

**Дипломна робота
освітнього рівня «Бакалавр»**

Виконала: студентка IV курсу, групи 411
напряму підготовки 091.6 – «Біологія»

Прядій А. В.

Керівник: к.б.н., доцент Кеца О.В.

До захисту допущено:
Протокол засідання кафедри № ____
від „____” _____ 2024 р.

зав. кафедри _____ проф. Копильчук Г.П.

АНОТАЦІЯ

Бакалаврська робота присвячена вивченню у сироватці крові біохімічних маркерів функціонального стану печінки – ензимних активностей аланінамінотрансферази (АсТ), аспартатамінотрансферази (АсТ) та вмісту прямого та непрямого білірубіну у пацієнтів з первинними пухлинами печінки та пухлинами непечінкового походження.

Встановлено, що підвищення ензимної активності АсТ та АлТ у сироватці крові спостерігається як при первинних пухлинах печінки, так і при новоутвореннях непечінкового походження, яке найбільше виражене при раку легень та раку молочних залоз. Значення показника коефіцієнта де Рітиса нижче 1,0 спостерігається при гепатоцелюлярній карциномі, а також раку шлунку та молочних залоз. Водночас, у хворих раком легень співвідношення АсТ/АлТ підвищується до значення $1,28 \pm 0,976$, що вказує на непечінковий генез гіперферментемії АлТ і АсТ.

Показано, що рівні прямого (кон'югованого) та непрямого білірубіну в сироватці крові підвищуються найбільшою мірою при розвитку первинних пухлин печінки та при раку шлунку.

Ключові слова: аланінамінотрансфераза, аспартатамінотрансфераза, білірубін, гепатоцелюлярна карцинома, рак, печінка.

ЗМІСТ

ВСТУП	4
1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	6
1.1. Біохімічні особливості розвитку новоутворення в організмі	6
1.2. Структурно-функціональна характеристика трансаміназ	10
1.2.1. Структура та механізм дії алінінамінотрансфераз	10
1.2.2. Біологічна роль аспартатамінотрансфераз	12
1.3. Білірубін та його фракції як діагностичні маркери функціонального стану органів гепатобіліарної системи	15
2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	18
2.1. Об'єкт та методи досліджень	18
3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	23
ВИСНОВКИ	29
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	30
ДОДАТКИ	34

ВСТУП

Своєчасне і правильне встановлення діагнозу за умов розвитку новоутворення в організмі є запорукою лікування онкологічних хворих, особливо зі злоякісними новоутвореннями. Для життя онкохворих та прояву рецидивів метастази злоякісних пухлин більш небезпечні ніж первинна пухлина. Тому, рання діагностика цих ускладнень і своєчасне спеціалізоване лікування є основним шляхом боротьби за тривалість життя онкологічних хворих. Інвазія первинних пухлин в інші органи організму людини здійснюється, в першу чергу, в органи гепатобіліарної системи, зокрема в печінку, що зумовлено її інтенсивним кровопостачанням [1].

Виявлення метастазів в печінку зустрічається в клініці значно частіше, ніж первинні пухлини, що може різко погіршити показники виживання онкохворих. Виявлення метастатичних пухлин в печінці на ранніх етапах онкогенезу часто ускладнене у зв'язку із відсутністю специфічних пухлинних маркерів та розуміння напрямку змін біохімічних маркерів функціонального стану печінки, а також розвитку первинних пухлин непечінкового походження. Вивчення інвазивності різних пухлин сьогодні є досить актуальним, оскільки невідомо, які саме первинні пухлини метастазують у печінку в першу чергу. Метастазування у печінку пухлин різної етіології може порушити її нормальне функціонування [2].

Актуальною проблемою біохімічних досліджень в онкології залишається пошук пухлинних маркерів та напряму біохімічних змін, які б дозволили з високою достовірністю діагностувати виникнення пухлинного процесу ще до появи клінічних симптомів.

Комплексне дослідження біохімічних маркерів функціонального стану печінки за умов росту в організмі злоякісних новоутворень дозволить оцінити стан печінки вже на ранніх етапах розвитку непечінкового раку та ймовірність їх метастазування в печінку.

Одними із маркерів функціонального стану печінки є аланінамінотрансфераза (АлТ) та аспартатамінотрансфераза (АсТ), які, є внутрішньоклітинними ферментами та беруть участь в обміні амінокислот. У нормі вміст цих ензимів у сироватці крові незначний. При пошкодженні плазматичних мембран клітин, що характерне для онкогенезу, внутрішньоклітинні ферменти вивільняються і виходять у кров'яне русло, що супроводжується вираженою гіперферментемією. Тому, показники ензимної активності АлТ та АсТ можна віднести до надійних критеріїв пошкодження плазмолем гепатоцитів при цій патології [3].

Мета роботи – оцінити зміни біохімічних маркерів функціонального стану печінки при розвитку в організмі первинних пухлин печінки та пухлин непечінкового походження.

Поставлені наступні завдання:

1. Визначити ензиматичну активність АлТ, АсТ та коефіцієнт де Рітиса у сироватці крові за умов розвитку в організмі первинних пухлин печінки та пухлин шлунку, легень та молочних залоз.

2. Дослідити рівні прямого та непрямого білірубіну у сироватці крові людей з первинними пухлинами печінки та пухлинами непечінкового походження.

1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Біохімічні особливості розвитку новоутворення в організмі

Центральним органом в організмі, який регулює обмінні процеси є печінка. Тому, зміни гомеостазу організму найчастіше відбуваються через порушення білоксинтезуючої, транспортної та екскреторної функцій печінки. Враховуючи участь печінки в детоксикаційних процесах, вона досить часто піддається хімічній агресії. Також, необхідно зауважити, що більшість токсинів, які діють на організм, не лише метаболізуються в печінці, але й можуть проявляти гепатотропну дію. Розвиток новоутворення в організмі призведе до значних змін у печінці як на органному, так і на клітинному та субклітинному рівнях [3, 4].

Печінка займає друге місце за частотою ураження метастазами. На першому місці знаходяться лімфовузли. Те, що у печінку часто метастазують пухлини можна пояснити її великими розмірами та високим печінковим кровообігом. Для печінки характерне подвійне кровопостачанням – це через печінкову артерію і комірну вену. Окрім того, в печінці наявні купферові клітини, які фагоцитують, що також може сприяти метастазуванню інших пухлин у печінку. Окрім цього, інвазивності пухлинних клітин в печінку сприяють ряд місцевих гуморальних факторів та особливості мембран ендотеліальних клітин [2].

Як первинні, так і вторинні пухлини печінки можуть бути злоякісними і доброякісними. Первинні злоякісні пухлини печінки утворюються у тому випадку, коли пухлина виникає і розвивається в самій печінці. Вторинні або і метастатичні пухлини печінки утворюються тоді, коли в печінку потрапляють клітини пухлин іншого походження. Щодо доброякісних пухлин, то вони, як правило, не турбують пацієнтів, тому ми їх не досліджуємо. Серед злоякісних пухлин печінки найбільш часто зустрічаються саме метастатичні ураження [5].

У печінку здатні метастазувати всі види злоякісних пухлин, окрім первинних злоякісних пухлин головного мозку. Аналіз джерел літератури показав [3, 6], що джерелом метастазів у печінку найчастіше є злоякісні пухлини шлунково-кишкового тракту (ШКТ), легень, молочних залоз, шкіри (наприклад, меланома). Рідше у печінку метастазують злоякісні пухлини щитоподібної залози, передміхурової залози та плоскоклітинний рак шкіри.

Як показує аналіз літератури, у більшості хворих метастатичне ураження печінки перебігає безсимптомно, тому найчастіше його виявляють під час обстеження. В деяких випадках ураження печінки проявляється неспецифічними симптомами, які спостерігаються у хворих – слабкістю, схудненням, лихоманкою, пітливістю та зниженням апетиту. Рідше спостерігаються біль у животі, гепатомегалія й асцит [7].

Принцип класифікації онкологічних захворювань базується на великій різноманітності різних форм пухлин. Ці пухлини, зазвичай, відрізняються між собою за гістогенезом, цитологічними і гістологічними характеристиками. Окрім того, виявляється різниця в особливостях виникнення новоутворення, його локалізації, метастазуванні. Відмінності спостерігаються й у клінічному перебігу пухлинного процесу, що є визначальним у прогнозі хвороби. Це визначає вибір лікувальних заходів, тактики їхнього проведення і подальшого динамічного спостереження за хворими [8].

Найчастіше злоякісні пухлини класифікують за походженням і за стадіями розвитку. Розрізняють чотири стадії розвитку пухлин [9]:

- I стадія – пухлина має розміри до 2 см, не спостерігаються ураження регіонарних лімфовузлів. Ця стадія онкогенезу для пухлин внутрішніх органів відповідає ранньому розвитку раку;

- II стадія – пухлина також невелика, яка має діаметр від 2 до 5 см з відсутністю метастазів у регіонарні лімфовузли (стадія ІА) або наявні метастази в одиничних рухливих регіонарних лімфовузлах (стадія ІБ);

- III стадія – розміри пухлини більше 5 см. Пухлина розростається в оточуючі тканини, має обмежену рухливість. Може бути менших розмірів, але з метастазами в регіонарні лімфатичні вузли у вигляді конгломератів;

- IV стадія – пухлина будь-якого розміру, яка має віддалені метастази чи глибокі проростанням у сусідні органи і тканини.

В деяких випадках розвиток метастазу може не відбутися через опірність тканин або їхню імунізаційну здатність. Так, у віддалених органах і тканинах можуть виявлятися цілком життєздатні пухлинні клітини без їхньої проліферації [6].

Незалежно від походження та виду пухлин їх розвиток має кілька стадій [9]:

1. Парадоксальна стадія відбувається після дії канцерогенного фактора. На цій стадії спостерігається ініціація проліферації. Проліферація триває недовго і при цьому рак виникає не обов'язково.
2. Прискорена проліферація супроводжується розмноженням клітин, яке досягає максимуму протягом 4-х діб після дії канцерогену. В клітинах з'являються аномальні фігури поділу. Утворюються клітини зі збільшеною кількістю хромосом. Спостерігається зміна тривалості клітинного циклу, у результаті чого посилено розмножуються клітини (гіперплазія). Гіперплазія добре піддається дії речовин, які відновлюють нормальну проліферацію. Ця стадія не обов'язково змінюється злоякісним переродженням.
3. Стадія злоякісного переродження, полягає в інтенсивній проліферації. При цьому, разом з диплоїдними клітинами, з'являються клітини із зміненою кількістю хромосом. Збільшується кількість аномальних клітин, які можуть агресивно поширюватися по організму (інвазивність). При цьому вони проникають в оточуючі тканини й органи. На цій стадії проведення протипухлинної терапії ускладнено [9].

Під час розвитку в організмі злоякісного новоутворення в організмі спостерігаються значні відхилення біохімічних процесів у клітинах від норми. Окрім того, відбувається перебудова деяких метаболічних процесів, що супроводжується впливом на загальний обмін речовин організму.

Однією із характерних рис обміну пухлинних клітин та організму, в якому розвивається пухлина є порушення співвідношення аеробної та анаеробної фаз вуглеводного обміну. Так, для пухлинних тканин характерний низький рівень тканинного дихання та прискорений процес гліколізу. За рахунок цього процесу пухлина отримує необхідну для безперервного росту енергію. Таким чином проявляється ефект Варбурга. У такий спосіб пухлина стає “пасткою глюкози” з подальшим пуском у хід компенсаторних механізмів у вигляді глікогенолізу та глюконеогенезу. Пізніше вичерпуються і ці механізми. У результаті прогресивної гіпоглікемії зменшуються запаси глікогену в печінці, м'язах та інших тканинах [5]. Поряд з цим, зазнають змін і ензимні системи, які підтримують нормальне співвідношення між анаеробним розщепленням вуглеводів і процесом окислення. Виявлено зниження рівня активності ряду окислювальних ензимів в тканинах організму, який уражений пухлиною – ензимів гліколізу, циклу Кребса і цитохромоксидазної системи. Також активуються деякі ензими фосфоролізу. Активність таких ензимів вуглеводного обміну як малатдегідрогеназа, лактатдегідрогеназа, гексокіназа, глюкозофосфат-ізомераза, триозофосфатізомераза, амілаза та піруваткіназа в більшості випадків канцерогенезу підвищується [9].

Каталазна, глюкокіназна, сукцинатдегідрогеназна, фосфорилазна, аспарагіназна, глюкозо-6-фосфатазна активності, навпаки, знижуються. Пухлинна тканина здатна асимілювати азотні сполуки, що може призвести до посиленого розпаду тканинних білків [9].

У пухлинах міститься більше води, досить високий вміст K^+ та малий – Na^+ . Виявлена велика кількість іонів Ca^{2+} в центральних некротуючих частинах новоутворення [6]. У ракових клітинах багато сполук, які містять

сірку (наприклад, в складі SH-груп) – метіонін, цистеїн, глутатіон. Також багато сполук основного характеру – лізин, аргінін. У пухлинах частково зменшується вміст альбумінів з одночасним підвищенням глобулінів [8]. На перший план виходить катаболізм вуглеводів, інтенсифікується синтез нуклеїнових кислот [6]. Підвищується кількість нейтральних жирів, ефірів холестеролу та фосфоліпідів [9].

Розвиток і ріст пухлини в організмі порушує регуляцію синтезу й обміну білків, гормонів, ензимних систем як в тканинах власне пухлини, так і в організмі в цілому [9].

Отже, у системній дії на обмін речовин пухлини діють неспецифічно, що зумовлено конкуренцією пухлинних клітин за “продукти харчування” (глюкозу, амінокислоти) та специфічну – порушується обмін та активність ензимних систем в напрямку, який характерний для обміну речовин пухлини.

1.2. Структурно-функціональна характеристика трансаміназ

1.2.1. Структура та механізм дії алінінамінотрансфераз

Трансамінази (амінотрансферази) в організмі каталізують реакції трансамінування. Посередник у переносі аміногруп від амінокислот є вітамін В₆ (піридоксальфосфат). Піридоксальфосфат входить до складу активного центру цих ензимів та взаємодіє з амінокислотою, при цьому приймає на себе аміногрупу (NH₂-групу). Потім NH₂-групу передається на кетокислоту. Реакції трансамінування зворотні, оскільки проходять в обох напрямках, що залежить від співвідношення концентрацій реагуючих компонентів. Всі амінокислоти, окрім лізину і треоніну, піддаються специфічній дії амінотрансфераз [10].

Найбільше клініко-діагностичне значення мають дві трансамінази – АлТ і АсТ. Ці ензими найпоширеніші в органах і тканинах організму людини серед інших трансаміназ. Найбільшу кількість АсТ виявлено в серцевому

м'язі, потім, по мірі зменшення, в печінці, склетних м'язах, головному мозку, нирках, сім'яниках тощо [11].

Найвища активність АлТ виявлена в печінці, потім у підшлунковій залозі, серці та склетній мускулатурі [11].

АлТ каталізує реакцію перенесення аміногрупи від аланіну на α -кетоглутарат. У процесі реакції утворюються глутамат і піруват. Переамінування відбувається в присутності кофермента – піридоксальфосфату, який похідний від вітаміну В₆. Можливий зворотній хід реакції із глутаматом і піруватом, у результаті чого утворюється аланін і α -кетокислота (рис. 1) [12].

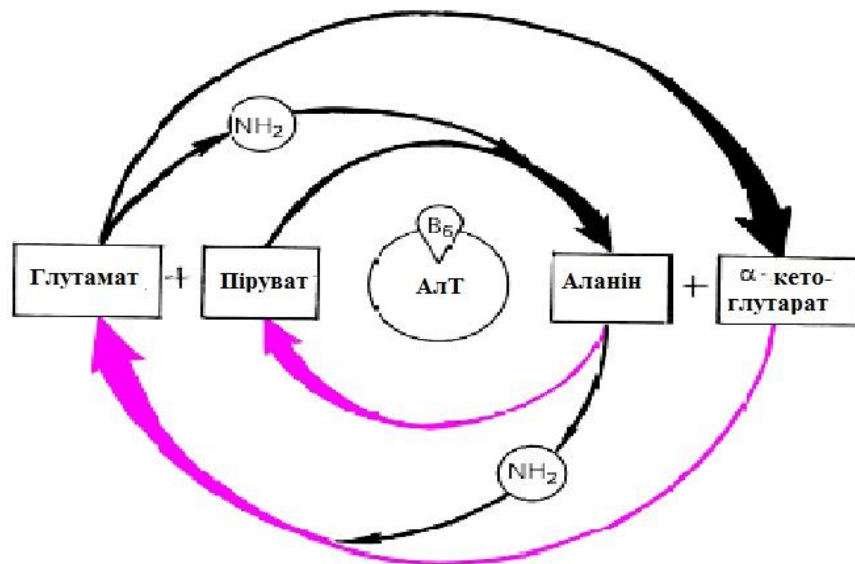


Рис.1.1. Участь аланінамінотрансферази в реакції переамінування амінокислот

АлТ належить до внутрішньоклітинних ферментів, тому вміст цього ензиму в сироватці крові здорових людей незначний. АлТ вважають індикаторним цитоплазматичним ензимом, підвищення активності якого в сироватці крові вказує на пошкодження гепатоцитів, що свідчить про запальну природу захворювання печінки [12].

Чутливість визначення цього біохімічного показника в клініці складає 83 %, специфічність – 84 %, якщо порівняти зі зміною рівня цього ензиму при захворюваннях непечінкової природи [13].

Під час гепатоцелюлярного пошкодження спостерігаються підвищення активності мітохондріального ензиму – АлТ, що зумовлено пошкодженням мітохондрій. Водночас, низька активність АлТ не завжди вказує, що печінка здорова, оскільки на значення цього показника впливає багато факторів. Наприклад, низька активність цього ензиму спостерігається при пошкодженні печінки при гемахроматозі, дефіциті вітаміну В₆, під час блокади токсинами внутріклітинного синтезу АлТ, при цирозі печінки [13].

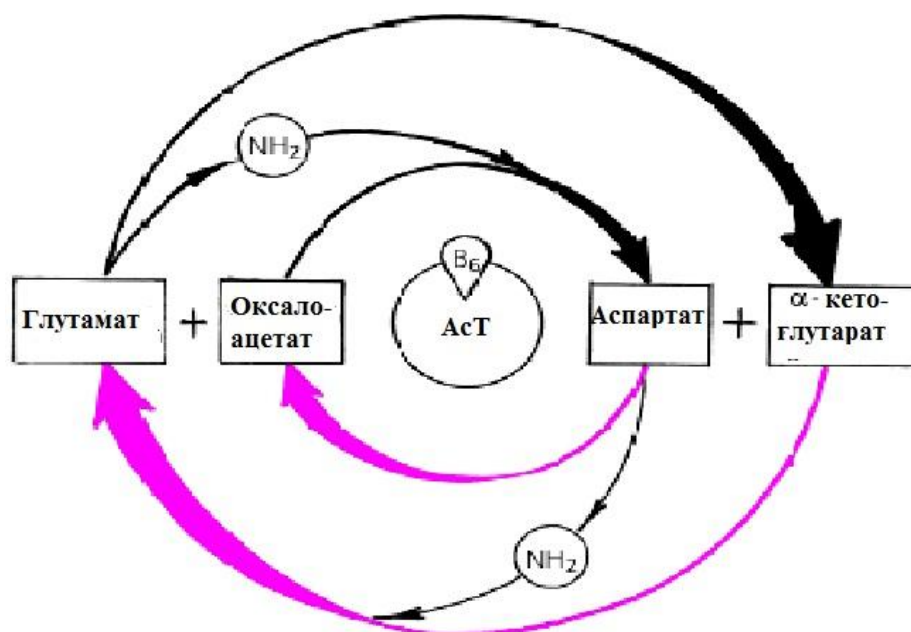
Основними причинами підвищення активності АлТ в сироватці крові є [14]:

- 1) некроз або пошкодження клітин печінки за умов різних факторів, що спричиняють розвиток гострого вірусного гепатиту, хронічного гепатиту, цирозу печінки, пухлин печінки, алкогольної інтоксикації;
- 2) гострий інфаркт міокарда, гострий міокардит;
- 3) травма м'язів або некроз скелетних м'язів;
- 4) гемоліз еритроцитів [11].

Отже, АлТ є одним із основних маркерів функціонального стану печінки при різних патологіях.

1.2.2. Біологічна роль аспаратамінотрансфераз

АсТ (КФ.2.6.1.1) каталізує реакцію переамінування між аспаратом і α -кетоглутаратом. Під час проходження цієї реакції аспарат, втрачає свою NH₂-групу та перетворюється в оксалоацетат, а α -кетоглутарат, навпаки, отримує аміногрупу і перетворюється в глутамат. Можливий зворотній хід реакції, який призводить до утворення аспартату і α -кетоглутарату після взаємодії глутамату і оксалоацетату (рис. 1.) [15].



**Рис.1.2. Участь аспартатамінотрансферази в реакції
переамінування амінокислот**

У тваринних клітинах АсТ представлена двома ізоферментами: мітохондріальним і цитозольним. Ці ізоформи являють собою димер, який складається з двох ідентичних поліпептидних ланцюгів, що містять по 400 амінокислот [15].

Дослідження первинної структури показало, що одна субодиниця АсТ складається з 412 амінокислот і має у своєму складі Lys19, Arg26, (Asp+Asn)42, Thr25, Ser26, Pro24, Gly28, Ala32, Val29, Met6, Ile19, Tyr12, Phe23, Trp9. Відповідно молекулярна маса одного поліпептидного ланцюга АсТ рівна 46,3 кДа, а молекулярна маса холоферменту, якщо врахувати ще два піридоксальфосфати дорівнює 93,1 кДа [16].

У молекулі АсТ міститься високий вміст α -спіралей. Так, на частку α -спіралей, β -шарів і реверсивних повторів припадає 47 %, 13 % і 9 % амінокислот відповідно [17].

Субодиницю АсТ можна умовно розділити на три домени:

1. До складу великого домену входять залишки амінокислот, які знаходяться в положенні з 75 по 300. Ця частина є найстабільнішою

частиною субодиниці. В основі великого домена лежить сильно зігнутий β -лист, який містить сім ланцюгів, оточених з двох боків α -спіралями.

2. Малий домен складається із сильно зближених NH_2 і COOH -кінцевих ділянок поліпептидного ланцюга. Це залишки 15 – 50 і 360 – 412. Із малого домена ензиму виходить NH_2 -кінцевий фрагмент ланцюга, який перетинає вихід до активного центру, а потім прилягає до поверхні великого домену у сусідній субодиниці.

3. Перехідна ділянка між великим і малим доменами. Є дві перехідні ділянки, які зв'язують великий і малий домени [18].

Таким чином, АсТ належить до білків, в яких α -спіралі є сегментами витягнутого ланцюга. Найпоширенішим “будівельним блоком” молекули АсТ є, так звана «шпилька» – α -спіральний сегмент, який переходить далі в ділянку ланцюга витягнутої конформації.

Отже, субодиниця АсТ складається з трьох рівних доменів, один із яких є єдиним відрізком поліпептидного ланцюга, який близький за структурою до так званого нуклеотид-зв'язуючого домену. Цей домен складається із 5 паралельних α -ланцюгів. Два інших домени складаються із N-кінцевих відрізків ланцюга, які вбудовані між C-кінцевими фрагментами ланцюга [11].

Активний центр міститься між трьома доменами. Біля першого витка α -спіралі “нуклеотид-зв'язуючого” домену міститься фосфатна група. У молекулі АсТ знаходиться два активних центри, які функціонально незалежні один від одного та розташовані в глибоких впадинах на протилежних сторонах молекули. Активні центри утворені великим і малим доменом однієї субодиниці. До складу активного центра входять амінокислоти, які належать обом субодиницям, що пояснює відсутність каталітичної активності у мономерів [18]. Кофермент знаходиться в глибині щілини активного центра.

В клініці часто визначають в сироватці крові співвідношення активностей АсТ/АлТ, так званий коефіцієнт де Рітіса. У нормі коефіцієнт де

Рітиса рівний $1,0 \pm 0,42$. При порушеннях печінки це співвідношення знижується, а при захворюваннях серця, наприклад при інфаркті міокарда, навпаки, різко підвищується [19].

Останніми роками велика увага приділяється дослідженням різних ензимів при онкогенезі. Серед біохімічних показників, які вивчаються при дослідженнях злоякісних пухлин, важливе місце має ензимологія амінокислотного обміну. Особливу увагу слід приділити вивченню реакцій азотистого обміну в пухлинах [8]. Це дозволить встановити природу тих порушень обміну амінокислот й інших азотвмісних сполук, які могли б відігравати важливу роль у переродженні нормальної клітини в пухлинну. Пошук на основі біохімічних даних дозволить визначити ефективні методи боротьби з онкозахворюваннями. Оскільки важливу роль в азотистому обміні відіграють амінотрансферази, то при ряді досліджень виявлено підвищення активностей АлТ і АсТ крові при онкогенезі та інших патологіях печінки [7].

Отже, збільшення амінотрансферазної активності у сироватці крові може спостерігатися при різних патологічних станах, при токсичних і запальних пошкодженнях органів, під час перебудови внутрішньоклітинних мембран. Тому дослідження активності трансаміназ у крові дозволить передбачити порушення печінки при первинних і вторинних пухлинах.

1.3. Білірубін та його фракції як діагностичні маркери функціонального стану органів гепатобіліарної системи

Білірубін – належить до пігментів, які є компонентами жовчі та утворюються під час розпаду еритроцитів у селезінці та кістковому мозку. У нормі еритроцити руйнуються через 110-120 днів після їхнього потрапляння у кров і виходу із кісткового мозку. При руйнуванні еритроцитів спочатку із загиблих клітин звільняється гемоглобін, який складається із залізовмісної частини – гема та протеїнової частини – глобіну. Далі від гему

відокремлюється залізо, яке може повторно використовуватися як компонент ензимів та білків. Гемова частина білків перетворюється на білірубін [21].

Непрямий (некон'югований) білірубін, що не з'єднаний з глюкуроною кислотою, транспортується кров'ю в печінку у зв'язаному з альбумінами вигляді. Тут, за дії ензиму глюкуронілтрансфери непряний білірубін з'єднується з глюкуроною кислотою, у результаті чого утворюється прямий (кон'югований) білірубін. Прямий (кон'югований) білірубін стає водорозчинним, а сам процес називається кон'югацією [22]. Зв'язана фракція білірубіну в нормі майже не надходить у кров, а екскретується з жовчю у просвіт кишечника, де за дії бактерій кишечника метаболізується, а далі виводиться з калом, надаючи йому темного кольору.

Прямий білірубін отримав таку назву, у зв'язку з методикою лабораторного дослідження. Під час його визначення цей водорозчинний пігмент безпосередньо взаємодіє з діазореактивом Ерліха, який додається в пробу крові. Некон'югований (непряний, вільний) білірубін не розчиняється у воді, тому для його визначення потрібні додаткові реактиви [23].

У нормі в організмі людини виробляється 250-350 мг білірубіну щодоби. Якщо добовий рівень білірубіну перевищує понад 30-35 мкмоль/л, то проявляється жовтяничність шкірних покривів та склер. За механізмом розвитку жовтяниці розрізняють надпечінкову (гемолітичну) жовтяницю, печінкову (паренхіматозну) або підпечінкову (обтураційну) жовтяницю [24].

При підвищеному гемолізі або при порушеннях захоплення цього пігменту печінкою збільшується вміст білірубіну в сироватці крові за рахунок некон'югованої фракції, при цьому не підвищується рівень зв'язаного пігменту. Такі зміни спостерігаються при патологічних станах, які супроводжуються порушеннями кон'югації білірубіну [25].

При порушеннях жовчовиділення у крові підвищується прямий білірубін, який потрапляє в кров, а потім і в сечу. Це єдина фракція білірубіну, яка виділяється нирками та забарвлює сечу у темний колір [26].

При збільшенні в сироватці крові прямої та непрямої фракцій білірубіну вказує на захворювання печінки, які супроводжуються порушеннями захоплення та виділення жовчних пігментів. Некон'югований білірубін проявляє токсичну дію на клітини нервової системи, що супроводжуватиметься пошкодженням головного мозку [26].

Отже, за визначенням рівня прямого або непрямого білірубіну в сироватці крові можна встановити стан органів гепатобіліарної системи – печінки та жовчного міхура при розвитку в організмі новоутворення. Такі зміни біохімічних показників дозволять встановити порушення функціонального стану печінки та зниження її детоксикаційної функції, що досить важливо при онкозахворюваннях.

2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Об'єкт та методи досліджень

У дослідженні були проаналізовані результати пацієнтів із діагностованими пухлинами різної локалізації. Серед обстежених пацієнтів були як жінки, так і чоловіки віком 45-55 років.

За даними історій хвороб діагноз встановлювали на основі клініко-лабораторних методів та комплексного обстеження пацієнтів сучасними неінвазивними методами діагностики. У всіх пацієнтів була II стадія розвитку онкологічної патології, тому видимих ознак метастазування в печінку не виявлялося при пухлинах непечінкової локалізації. Залежно від локалізації новоутворення, хворих розділили на чотири групи:

I група – 6 хворих, у яких спостерігалися первинні пухлини печінки. Серед первинних пухлин печінки найчастіше діагностували злоякісну гепатому, так званий гепатоцелюлярний рак. Слід зауважити, що у 50% хворих розвиток новоутворення відбувався на фоні цирозу печінки.

II група – 6 пацієнтів, хворих на рак шлунку "дифузного" типу. Цей тип раку представлений малодиференційованими аденокарциномами.

III група – 6 пацієнтів з раком легень. У хворих спостерігався недрібноклітинний рак легень. Клітини при цій формі раку утворювали великі пухлинні вузли із здатністю до метастазування. Ймовірне походження цих пухлин легень – епітелій бронхів.

IV група – 6 жінок, хворих на недиференційований рак молочних залоз.

Отже, у дослідженнях було проаналізовано результати 24 хворих злоякісними пухлинами різної локалізації.

Біохімічний аналіз крові проводили на визначення ензимних активностей АлТ, АсТ та співвідношення АсТ/АлТ, а також на визначення вмісту прямого та непрямого білірубіну в сироватці крові всіх груп пацієнтів.

Визначення аланінамінотрансферазної активності в сироватці крові.

Принцип методу. АлТ каталізує реакцію амінування 2-оксоглутарату L-аланіном, при якій утворюється L-глутамін та піруват. Далі проводили визначення продукту реакції – пірувату. Піруват, під час проведення аналізу, взаємодіє з 2,4-динітрофенілгідразином, у результаті чого утворюється гіdraзон пірувату, який має максимальне поглинання при 520 нм [27].

Хід визначення

1. Реакцію розпочинали шляхом додавання до інкубаційної суміші, яка містила визначені реактиви та сироватку крові. Інкубаційна суміш місткістю 0,4 мл вміщувала 0,1 моль/л фосфатний буфер, 0,2 моль/л розчин α -аланіну, 2 ммоль/л 2-оксоглутарової кислоти.

2. Після додавання сироватки крові проби інкубували 60 хв при 37 °С.

3. Після інкубації в дослідну пробу додавали розчин 2,4-динітрофенілгідразину, розчиненого в 1 ммоль/л розчині соляної кислоти.

4. Проби далі витримували протягом 20 хв при кімнатній температурі, після чого як в дослідну, так і в контрольну проби додавали розчин NaOH концентрацією 4 моль/л.

5. Проби залишали на 20 хв при кімнатній температурі.

Вимірювання оптичної густини здійснювали на спектрофотометрі при довжині хвилі 520 нм.

Для підрахунку результатів будували калібрувальний графік на основі робочих стандартних розчинів 2 моль/л пірувату. Ензимну активність АлТ розраховували за кількістю утвореного продукту (мкмоль) за хв (в умовах експерименту) на 1 мл сироватки крові.

Визначення аспартатамінотрансферазної активності в крові.

Принцип методу. За дії АсТ відбувається амінування 2-оксоглутарату L-аспартатом, у результаті чого утворюються L-глутамат та оксалоацетат. Оксалоацетат самовільно декарбоксилується, у результаті чого утворюється

піруват. Визначення ензимної активності базується на вимірюванні оптичної щільності 2,4-динітрофенілгідразонів пірувату, які утворюються в лужному середовищі [27].

Хід визначення

1. Відповідно до інструкції готували робочий розчин.
2. У дослідну та контрольну пробірки вносили по 1 мл робочого розчину та інкубували при 37 °С протягом 1 хвилини.
3. До проб додавали сироватку крові та залишали на інкубації протягом 60 хв при 37 °С.
4. Після інкубації в дослідну пробірку додавали розчин 2,4-динітрофенілгідразину, який розчинений в 1 ммоль/л соляній кислоті.
5. Проби витримували протягом 20 хв при кімнатній температурі, після чого як в дослідну, так і в контрольну пробірки додавали 4 моль/л розчин NaOH.
6. Проби залишали на 20 хв при кімнатній температурі та вимірювали оптичну щільність при довжині хвилі 520 нм.

Ензимну активність АсТ виражали у мкмоль/хв на мл сироватки крові.

Визначення загального білірубіну в сироватці крові.

Принцип методу: Білірубін взаємодіє з діазотованою сульфаніловою кислотою з утворенням азобілірубіну, який дає максимум поглинання при 560 нм в розчині диметилсульфоксиду (ДМСО). Інтенсивність забарвлення проби прямо пропорційна концентрації загального білірубіну в зразку [28].

Хід визначення

1. Пробірки промаркувал як «холоста», «стандарт», «контроль», «дослід».
2. У холості пробірки вносили 1 мл реагенту загального білірубіну.
3. Додавали 1 мл робочого реагенту у всі пробірки, окрім холостих.
4. Вносили 0,1 мл стандарту, контролю і зразка у відповідні пробірки, після чого їх добре перемішували.

5. Інкубувати протягом 5 хвилин при кімнатній температурі, після чого вимірювали оптичну густину при довжині хвилі 560 нм.

Розрахунок

$$(Abs\text{-зразка} - Abs\text{-хол. проби}) / (Abs\text{-калібратора} - Abs\text{-хол. проби} \cdot \text{калібратора}) \cdot \text{Конц. калібратора}, \text{¶}$$

де Abs – поглинання.

Визначення прямого білірубіну в сироватці крові.

Принцип методу: Білірубін ваємодіє з діазотованою сульфаніловою кислотою при чому утворюється азобілірубін, який має максимальне поглинання при довжині хвилі 560 нм у водному розчині. Інтенсивність забарвлення прямо пропорційна вмісту прямого білірубіну в сироватці крові [28].

Хід визначення

1. Всі пробірки позначили як «холоста», «стандарт», «контроль», «дослід».
 2. У всі холості пробірки вносили 1 мл реагенту прямого білірубіну.
 3. Згідно інструкції готували робочий реагент.
 4. В марковані тест пробірки вносили 1 мл робочого реагенту.
 5. Додавали 0,1 мл стандарту, контролю і зразка у відповідну пробірку.
- Пробірки перемішували та інкубувати протягом 5 хвилин при кімнатній температурі.
6. Оптичну густину вимірювали при довжині хвилі 560 нм.

Розрахунок

$$(Abs\text{-зразка} - Abs\text{-хол. проби}) / (Abs\text{-калібратора} - Abs\text{-хол. проби} \cdot \text{калібратора}) \cdot \text{Конц. Калібратора} = \text{Концентрація прямого білірубіну в зразку} \cdot (\text{мг/дл}) \cdot (\text{мкмоль/л}) \text{¶}$$

Визначення непрямого білірубіну проводили за різницею концентрації між загальним та прямим білірубіном

Статистична обробка результатів

Статистична обробка результатів проводилася з використанням програми “Excel 2000 for Windows” в опції «аналіз даних» [29]. Для визначення статистично достовірної різниці між досліджуваними групами застосовували t-критерій Стюдента. Статистично достовірними вважалися результати при $p \leq 0,05$ [30].

3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Розвиток первинних пухлин у печінці, зокрема гепатоцелюлярної карциноми, може бути наслідком хронічних інфекційних та неінфекційних захворювань печінки [23]. Дослідження біохімічних показників функціонального стану печінки як при первинних пухлинах печінки, так і при пухлинах непечінкового походження допоможе зрозуміти механізми розвитку злоякісного новоутворення печінки та можливість метастазування пухлин іншої локалізації у печінку.

Деструктивні зміни при онкогенезі можуть позначитись на змінах метаболічних процесів печінки, маркерами чого є визначення ензимних активностей амінотрансфераз в сироватці крові.

Результати проведених досліджень показали, що у хворих з гепатоцелюлярною карциномою та пухлинами непечінкового походження змінюється активність амінотрансфераз у сироватці крові, що може відображати характер пошкоджуючих змін у печінці, інтенсивність і фазу розвитку патологічного процесу.

Виявлено, що у хворих з первинними пухлинами печінки спостерігалось збільшення рівня ензимної активності АлТ в сироватці крові, який у 6 разів перевищував значення верхньої межі норми (рис.3.1), що свідчить про значне порушення функціонального стану печінки.

Результати досліджень ензимної активності АлТ також показали суттєве підвищення активності цього ензиму за умов розвитку в організмі злоякісних новоутворень непечінкового походження. Так, при розвитку в організмі злоякісних новоутворень шлунку спостерігалася гіперферментемія АлТ, яка у 4,5 рази перевищувала показник верхньої межі норми. При раку молочних залоз ферментативна активність АлТ підвищувалася у 2,4 рази порівняно з нормою (рис.3.1). Найменше підвищення аланінамінотрансферазної активності спостерігалось при раку легень, оскільки досліджуваний показник у 1,6 рази перевищував показник верхньої межі норми (рис.3.1).

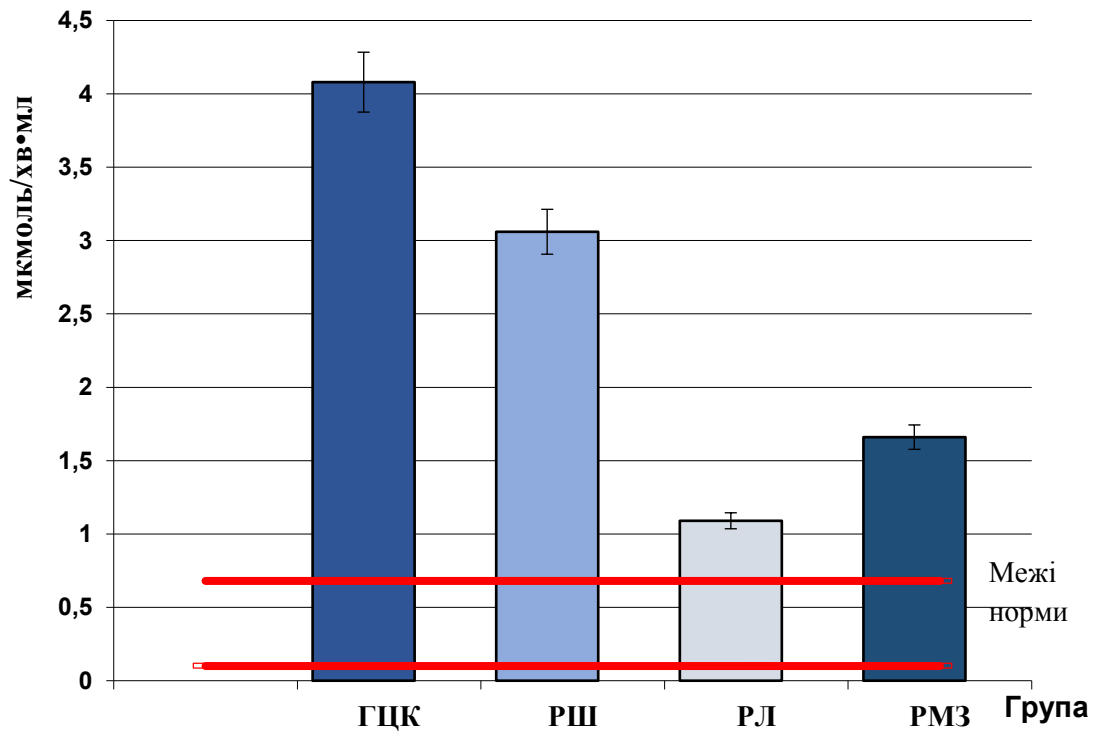


Рис.3.1. Аланінамінотрансферазна активність у сироватці крові за умов розвитку первинних пухлин печінки та пухлин непечінкового походження

Примітка (тут і надалі): ГЦК – хворі з гепатоцелюлярною карциномою; РШ – хворі раком шлунку; РЛ – пацієнти з недрібноклітинним раком легень; РМЗ – жінки, хворі на недиференційований рак молочних залоз.

Різке підвищення ензимної активності АлТ у сироватці крові при гепатоцелюлярній карциномі може бути наслідком виходу ензиму в кров у результаті некрозу гепатоцитів та фрагментації печінкових дольок [31].

Щодо ензимної активності АсТ, то активність даного ензиму також підвищувалася. Так, при гепатоцелюлярній карциномі аспартатамінотрансферазна активність підвищувалася у 3,7 рази. Відповідні зміни спостерігалися і при розвитку новоутворення непечінкового походження. Так, активність АсТ при раку шлунку підвищувалася у 2,4 рази при раку легень – у 3,1 рази, а при раку молочних залоз у 2,3 рази порівняно з верхньою межею норми (рис.3.2).

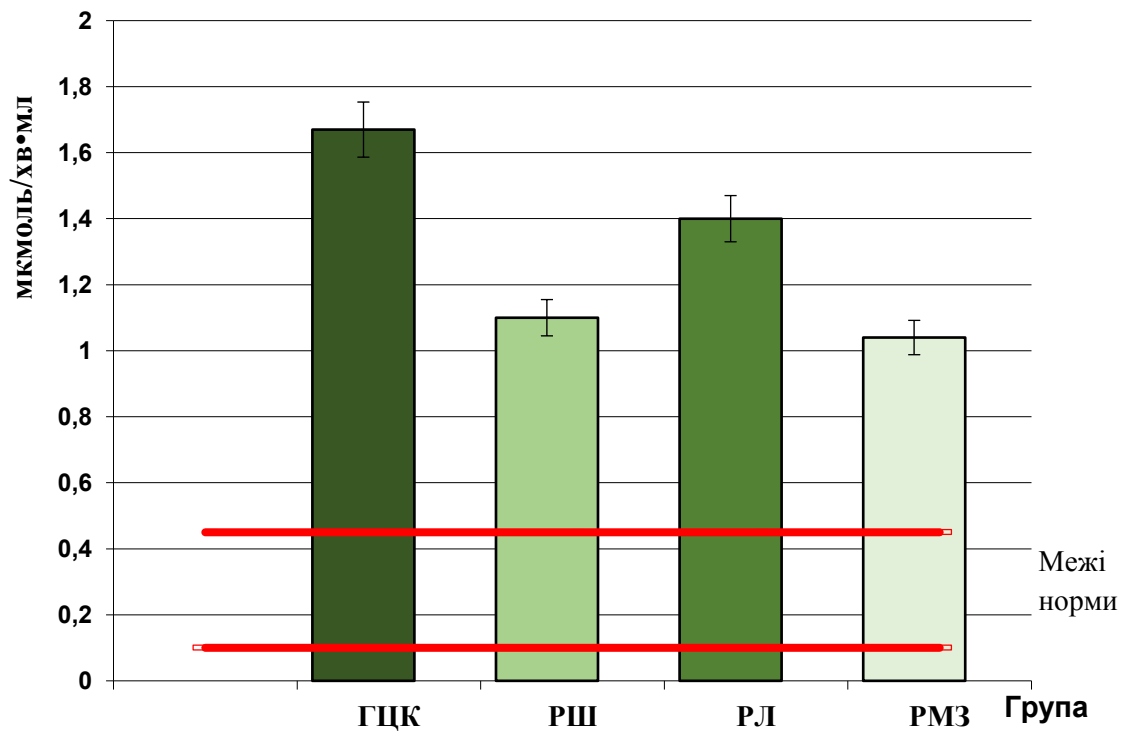


Рис.3.2. Аспартатамінотрансферазна активність у сироватці крові за умов розвитку первинних пухлин печінки та пухлин непечінкового походження

Як видно з результатів дослідження ензимна активність АлТ при первинних пухлинах печінки та деяких пухлинах непечінкового походження підвищується більшою мірою ніж АсТ, що може бути пов'язано з пошкодженням плазматичних мембран клітин печінки. Для перевірки цього припущення в наших дослідженнях розраховано співвідношення АсТ/АлТ (коефіцієнт де Рітіса). Як показує аналіз літературних джерел [32], значення коефіцієнта де Рітіса менше 0,7 додатково підтверджує "печінковий" генезис гіперферментемії, а підвищення більше 1,0 свідчить про "непечінкове" походження гіперферментемії АлТ та АсТ.

Результати проведених досліджень показали, що у хворих гепатоцелюлярною карциномою коефіцієнт де Рітіса знижувався порівняно з контрольною групою до $0,409 \pm 0,034$, що підтверджує "печінковий" генезис гіперферментемії. Подібні зміни спостерігалися при раку шлунку, оскільки

коефіцієнт де Рітиса знаходився на рівні $0,359 \pm 0,025$ (рис.3.3), що також може вказувати на пошкодження плазматичних мембран печінки [32].

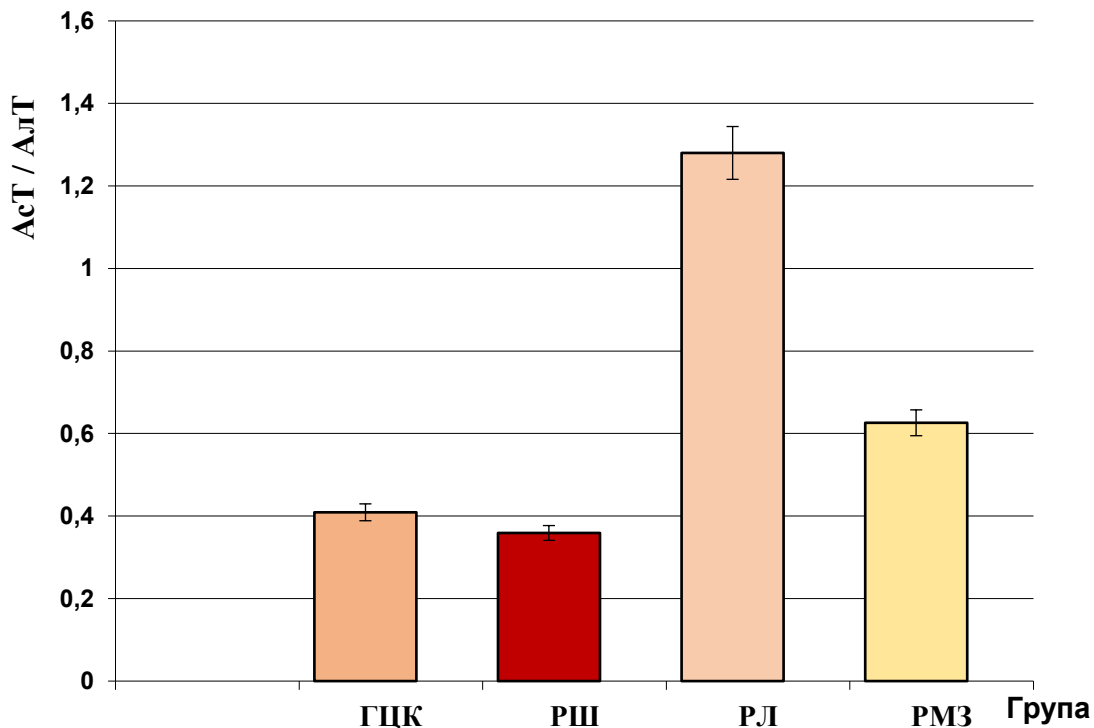


Рис.3.3. Співвідношення АсТ/АлТ (коефіцієнт де Рітиса) у пацієнтів при розвитку первинних пухлин печінки та пухлин непечінкового походження

При недрібноклітинному раку легень ензимна на активність АлТ у сироватці крові підвищувалася у 1,6 рази (рис.3.1), водночас ензимна активність АсТ підвищувалася у 3,1 рази (рис.3.2). Імовірно, при розвитку в організмі злоякісних новоутворень легень функціональні порушення спостерігаються, в першу чергу, в серці, у результаті чого ускладнюється кровообіг через легені. При цьому в печінці можуть спостерігатися вторинні пошкодження. На цей факт також вказує коефіцієнт де Рітиса, який перевищує значення 1,0 та у цієї групи пацієнтів знаходиться на рівні $1,28 \pm 0,976$ (рис.3.3). Щодо раку молочних залоз, то цей вид раку непечінкового походження також значною мірою негативно впливає на

функціонування печінки, оскільки поряд із гіперферментемією АлТ і АсТ спостерігалось зниження коефіцієнта де Рітіса до значення $0,626 \pm 0,0453$, що вказує на печінковий генезис гіперферментемії (рис.3.3).

Отже, виявлені нами зміни активності АлТ та АсТ вказують на пошкодження клітин печінки не тільки при розвитку первинних пухлин у печінці, але й при розвитку віддалених пухлин непечінкового походження, з виявленою найбільшою пошкоджуючою дією на печінку при розвитку злоякісних новоутворень шлунку та молочних залоз. Тривале напруження функцій печінки, може бути спрямоване на забезпечення компенсаторних реакцій організму, що призведе до виснаження і зниження функціонування печінки. Тобто при розвитку віддалених пухлин створюються передумови для виникнення передпатологічних і патологічних змін в самій печінці.

Встановлені закономірності спонукали нас до дослідження жовчоутворюючої та жовчовидільної функції печінки, індикатором чого є визначення рівнів прямого та непрямого білірубіну.

Результати досліджень показали, що при гепатоцелюлярній карциномі, при раку шлунку, раку легень і раку молочних залоз в сироватці крові підвищувався вміст непрямого білірубіну у 3,4 рази, 2,9 рази, 1,8 рази та 2,3 рази порівняно з верхньою межею норми відповідно (рис.3.4А).

Щодо рівня прямого (кон'югованого) білірубіну, то його рівень також підвищувався у всіх досліджуваних групах з найвищими показниками у пацієнтів з гепатоцелюлярною карциномою та раком шлунку. Так, результати досліджень показали, що рівень прямого білірубіну в 3,6 рази, 2,5 рази, 1,5 рази та 2,2 рази перевищував показники верхньої межі норми у пацієнтів з гепатоцелюлярною карциномою, раком шлунку, легень і раком молочних залоз відповідно (рис.3.4Б).

Як показують результати дослідження найбільше рівень прямого та непрямого білірубіну підвищувався за умов росту в організмі гепатоцелюлярної карциноми та пухлин шлунку.

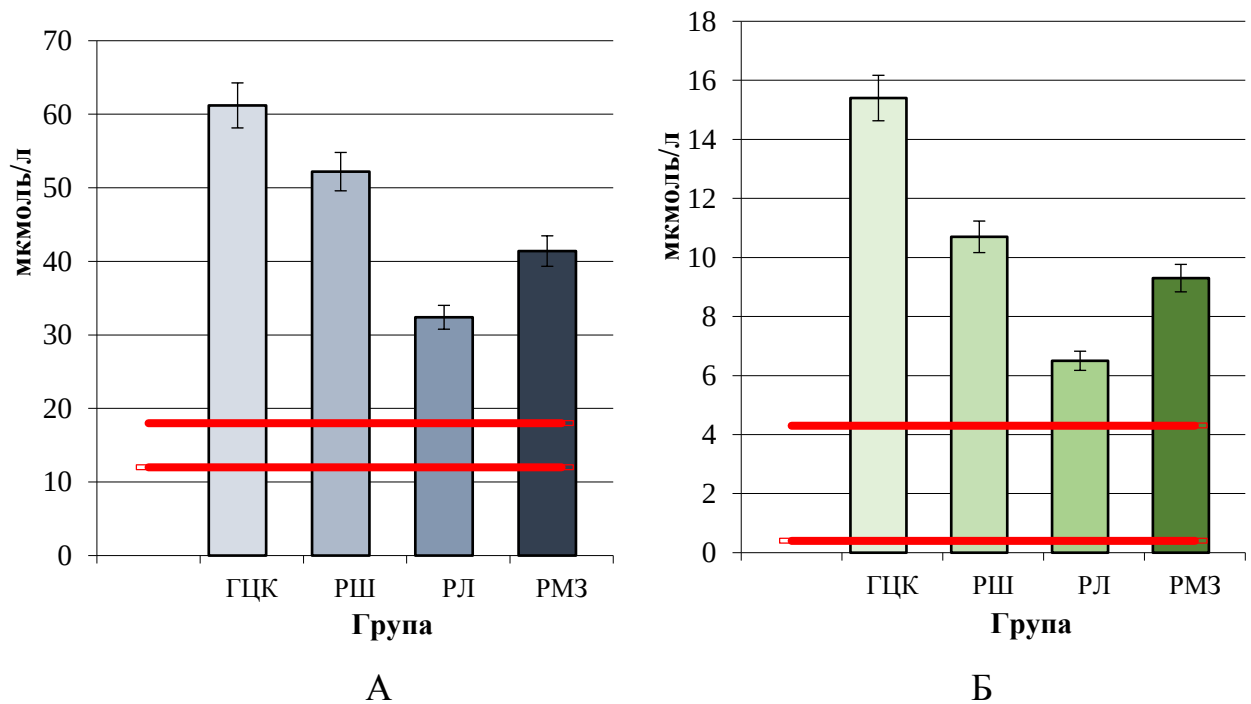


Рис.3.4. Вміст непрямого (А) та прямого (Б) білірубіну в сироватці крові за умов розвитку первинних пухлин печінки та пухлин непечінкового походження

Виявлена нами гіпербілірунемія може бути пов'язана зі зниженням його поглинання печінкою або зниженою екскрецією з жовчю. Встановлені зміни, імовірно, є результатом паренхіматозних уражень печінки в результаті росту в організмі первинних пухлин печінки або деяких пухлин непечінкового походження.

Отже, розвиток в організмі непластичного процесу як в печінці, так і віддалених органах супроводжується зміною функціональних зв'язків між цими органами. Функціонування печінки при онкогенезі залежить від характеру перебігу та надійності детоксикаційних, синтетичних і енергетичних процесів у цьому органі. Пухлини різного походження по-різному можуть впливати на функціональні зміни печінки. Так, серед досліджених нами пухлин найдеструктивніший вплив на печінку виявлений для злоякісних новоутворень шлунку, а найменший – для пухлин легень.

ВИСНОВКИ

1. Підвищення ензимної активності АсТ та АлТ у сироватці крові виявлено не лише при первинних пухлинах печінки, але й при новоутвореннях непечінкового походження, яке найбільше виражене при раку легень та раку молочних залоз.

2. Знаження показника коефіцієнта де Рітіса нижче 1,0 спостерігається при гепатоцелюлярній карциномі, а також при раку шлунку та молочних залоз. Водночас, у хворих раком легень співвідношення АсТ/АлТ підвищується до значення $1,28 \pm 0,976$, що вказує на непечінковий генез гіперферментемії АлТ і АсТ.

3. Рівні прямого (кон'югованого) та непрямого білірубіну в сироватці крові підвищуються найбільшою мірою при розвитку первинних пухлин печінки та при раку шлунку.