УДК 615.015.43

[1]Сташкевич М. А., [1]Зябліцев С. В., [1]Гайова Л. В., [2]Сидюк А. В.

ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ АКТИВНОСТІ КЛЮЧОВИХ ФЕРМЕНТІВ ОБМІНУ 5-ФТОРУРЦИЛУ В ТКАНИНАХ ШЛУНКА ПРИ ВНУТРІШНЬОАРТЕРІАЛЬНОМУ ВВЕДЕННІ ПРЕПАРАТУ

[1]Національний медичний університет ім. О. О. Богомольця (м. Київ)

[2]Національний інститут хірургії та трансплантології ім. О. О. Шалімова (м. Київ)

matviyenko.maryna@gmail.com

Робота є фрагментом наукових розробок Донецького національного медичного університету ім. М. Горького за темою «Розробити методи первинно-відновної хірургії, комбінованого та комплексного лікування злоякісних пухлин основних локалізацій» (№ державної реєстрації 0109U008703).

Вступ. Протягом останніх 50 років в якості препаратів вибору для схем лікування різних видів раку, зокрема раку шлунка, застосовують фторпіримідини. Перший з представників цієї групи – 5-фторурацил (5-ФУ), який був впроваджений в клінічну практику у 1957 році, досі посідає місце серед найбільш уживаних хіміопрепаратів [10,11]. За своєю хімічною природою 5-ФУ є аналогом природних піримідинових основ, тому його біотрансформація в клітинах здійснюється за рахунок каталітичної активності ключових ферментів обміну цих попередників нуклеотидів.

Метаболізм 5-ФУ протікає за двома напрямками: за шляхом активації і деградації. Ключовим ферментом активації 5-ФУ є тимідинфосфорилаза (ТФ), яка каталізує перший етап біотрансформації препарату, а саме – приєнання пентозофосфату до молекули 5-ФУ з утворенням нуклеозиду [4,13].

Шлях деградації 5-ФУ починається з його перетворення на 5-фтордигідроурацил під дією дігідропіримидиндегідрогенази (ДПД) – ферменту, який лімітує швидкість катаболізму препарату [3]. Було показано, що високий рівень ТФ, низький рівень ДПД в пухлині – хороші прогностичні показники відповіді на терапію 5-ФУ [7].

Оскільки 5-ФУ є антиметаболітом, і здатний пригнічувати синтез клітинних білків, логічним уявляється припущення, що його дія може призводити до супресії білків власного обміну. Явище зниження експресії ТФ як в пухлині, так і в суміжній тканині пацієнтів з раком прямої кишки відмічалося після хіміотерапії капецитабіном – аналогом 5-ФУ, в той же час при радіотерапії експресія ферменту підвищувалась [5]. Японські вчені Honda зі співавторами [8] також виявили у своїх дослідженнях явище зниження активності пуриннуклеозидфосфорилаз, які відіграють важливу роль в активації 5-ФУ [15], у тканинах кишечника після терапії фторпіримідинами. У наших дослідженнях [1,12] було встановлено, що при навантаженні тканин великою дозою 5-ФУ активність ТФ поступово знижується.

При внутрішньоартеріальному введенні 5-ФУ потрапляє в тканини органу, ураженого злоякісним новоутворенням, в високих концентраціях, таких, що на 2-3 порядки перевищують концентрацію препарату при внутрішньовенному введенні [2]. Тому вивчення змін метаболізму тканин саме при такому способі введення дозволяє помітити ті ефекти, які б не проявлялися при інших варіантах введення. **Метою** даного **дослідження** була оцінка впливу високої дози 5-ФУ на активність двох ключових ферментів його обміну – ТФ і ДПД при внутрішньоартеріальному введенні препарату.

Об'єкт і методи дослідження. Активність ключових ферментів обміну 5-ФУ визначали в зразках пухлинної та суміжної тканини, видалених під час гастректомії у пацієнтів з АКШ. Забір тканин проводили у 33 пацієнтів через 2-60 хвилин після болюсної ін'єкції 5-ФУ у дозі 250 мг у шлунково-сальникову артерію, 10 пацієнтів (група контролю) не отримували 5-ФУ. Дослідження було схвалене Комітетом з етики при Донецькому національному медичному університеті ім. М. Горького.

Активність ДПД в гомогенатах тканин визначали за методом [6], заснованому на зміні оптичної щільності реакційної суміші при 260 нм через накопичення продукту ДПД урацилу після додавання гомогенату досліджуваних тканин. Реакційна суміш складалася з фосфатного буферу (pH=7,4), меркаптоетанолу (1 ммоль/л), 5,6-дигідроурацилу (25 мкмоль/л), НАДФ$^+$ (750 мкмоль/л), $MgCl_2$ (2,5 ммоль/л). Зміну оптичної щільності суміші при додаванні гомогенату проводили на УФ-спектрометрі «Спекорд-200».

Активність ТФ в тканинах пацієнтів визначали за методом [15] при інкубації гомогенатів тканин з тимідином за накопиченням продукту його фосфоролізу – тиміну. Реакційна суміш складалася з фосфатного буферу (pH=7,4) та тимідину (2 ммоль/л). Реакцію починали додаванням гомогенату. Суміш розділяли на 2 пробірки по 1 мл. В одну з пробірок відразу після внесення гомогенату додавали 0,5 мл ацетонітрилу, що призводило до денатурації білків і зупинки реакції. Вміст іншої пробірки інкубували протягом 45 хвилин при 37°С і аналогічним чином зупиняли реакцію.

Денатурований білок видаляли центрифугуванням при 12000 g протягом 15 хвилин, потім екстрагували ацетонітрил хлороформом. Концентрацію тиміну визначали методом ВЕРХ на хроматографі Konikrom Plus, Konik Group (Іспанія) з PDA-детектором і колонкою YMC TriartC18 (250x4,6 мм, YMC Europe GmbH, Germany) в зворотньофазовому режимі. В якості рухомої фази використовували розчин амонію хлориду з ацетонітрилом. Активність обох ферментів виражали в U/мг білка (де U=нмоль/хв), концентрацію білка в гомогенаті визначали за методом Лоурі. Обробку отриманих даних проводили в статистичному пакеті «Statistica 6.0».

Результати досліджень та їх обговорення

Дані щодо активності ТФ і ДПД в зразках тканин з контрольної групи і у тканинах, видалених через 2-20, 21-40 і 41-63 хвилини після внутрішньоартеріального введення 5-ФУ представлені на **рис.**

Як видно з **рисунка**, у всіх досліджуваних групах для обох ферментів була характерною широка міжіндивідуальна варіабельність показників активності. Коефіцієнт варіації активності ТФ складав від 47 до 111%, ДПД – від 30 до 52%. Навіть на тлі такого розкиду даних, їх оцінка за критеріями непараметричної статистики дозволила виявити достовірні відмінності між певними групами. Через 41-60 хвилин після введення 5-ФУ середня активність ТФ була достовірно (при $p<0,05$ за критерієм Мана-Уїтні), в 3,5 рази нижче за таку в контрольній групі і в пухлинній, і в суміжній тканинах. Таким чином підтверджується виявлений нами раніше [1,12] супресорний вплив великих доз 5-ФУ на ТФ.

Активність ТФ в суміжній слизовій шлунка була достовірно (при $p<0,05$ за критерієм Мана-Уїтні) нижча за таку в пухлині і в групі контролю, і у всіх дослідних групах. Факт гіперекспресії ТФ в солідних пухлинах, у тому числі в АКШ, в порівнянні із немалігнізованими суміжними тканинами був підтверджений іншими дослідженнями [4].

У протилежність такому впливу 5-ФУ на ТФ, для ДПД не було характерною зміна активності при введенні цього цитостатика. Так, не було виявлено статистично значимих відмінностей між активністю ДПД в групі контролю і в усіх дослідних групах, розділених за часом після введення препарату. Рівень цього ферменту, на відміну від ТФ, також достовірно не відрізнявся у пухлині та суміжній слизовій шлунку.

Отримані дані свідчать про різний характер впливу високих доз цитостатика на активність основних ферментів його обміну. Значне падіння активності ТФ за відносно короткий період – 40-60 хвилин після навантаження тканин високою дозою 5-ФУ можна пояснити відомим впливом 5-ФУ на біосинтетичні процеси в клітині. Цей вплив гіпотетично може проявлятися пригніченням експресії гену ТФ, і – відповідно, поступовим зменшенням активності ферменту. Проте такого «швидкого» ефекту 5-ФУ на активність ДПД не виявлено. Вірогідно, що вплив 5-ФУ на синтез ДПД проявляється повільніше, ніж у випадку з ТФ, тому в цьому дослідженні в рамках періоду спостереження в 1 годину його не було виявлено. Раніше нами було показано [2], що після внутрішньоартеріального болюсного введення 5-ФУ концентрація препарату в пухлині знижується експоненційно, тобто з часом після введення швидкість утилізації препарату в тканинах шлунка падає. Цей факт, як випливає з наведених вище результатів, вірогідно, пов'язаний саме із зниженням активності ТФ, що свідчить на користь переважної участі ТФ, а не ДПД, в процесі біотрансформації 5-ФУ в тканинах шлунка.

Оскільки ТФ є одним з ферментів активації 5-ФУ, то зменшення її активності призводитиме до уповільнення процесу перетворення 5-ФУ на активні метаболіти. З іншого боку, ТФ є негативним фактором розвитку карцином різної локалізації, високий рівень цього ферменту в пухлині асоційований з поганим прогнозом і зниженням загальної виживаності, експресія ТФ позитивно корелює

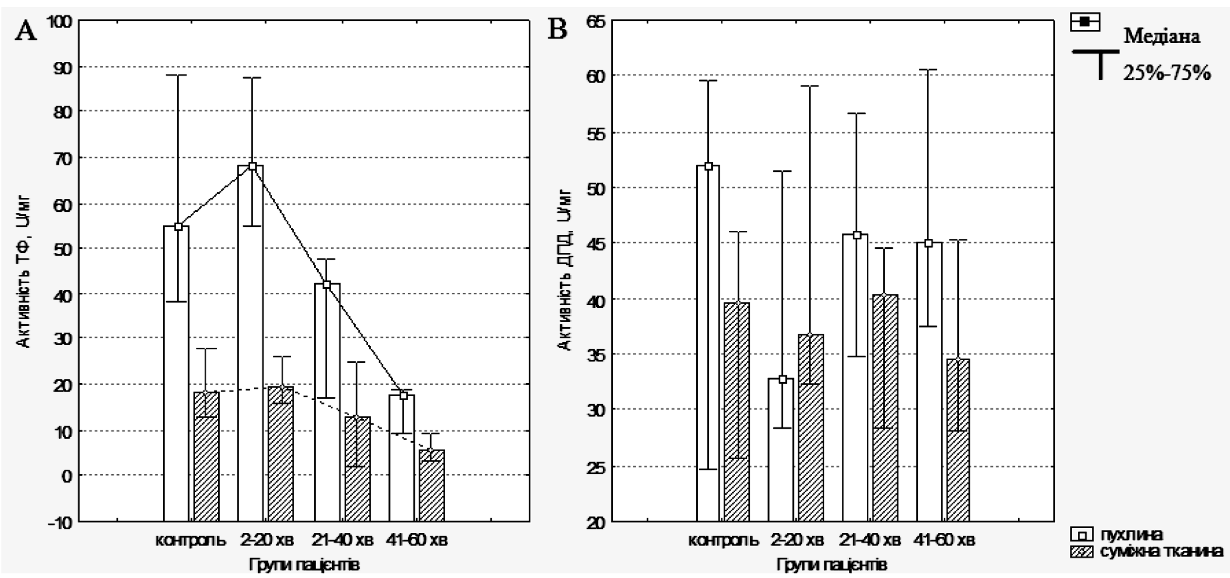

Рис. Активність тимідинфосфорилази (А) і дигідропіримідиндегідрогенази (В) у тканинах пацієнтів через різні проміжки часу після введення 5-фторурацилу і без введення препарату (група контролю)

з щільністю мікросудин, розміром пухлини, стадією раку і наявністю метастазів [4,9]. Тому інгібування цього ферменту є метою багатьох видів протипухлинної терапії, і, відповідно, показаний нами факт зниження активності ферменту під впливом високих доз 5-ФУ є одним з «корисних» ефектів цього препарату.

Варто також зазначити, що активність ДПД в нормальних тканинах, детермінує токсичність 5-ФУ, адже цей фермент забезпечує знешкодження фторпіримідинів [3]. Тому при внутрішньоартеріальному введенні пригнічення активності ТФ на тлі відсутності супресорного впливу високих доз 5-ФУ на активність ДПД в суміжній тканині також є бажаним ефектом, асоційованим з меншим цитотоксичним впливом препарату на нормальні клітини.

Висновки

Встановлено, що при внутрішньоартеріальному введенні пацієнтам з аденокарциномою шлунка високих доз 5-фторурацилу відбувається достовірне зниження активності ферменту активації препарату – тимідинфосфорилази вже через 40 хвилин після введення, при цьому суттєвих змін в активності ферменту деградації 5-ФУ – дегідропіримідиндегідрогенази не відмічається.

Перспективи подальших досліджень

Доцільним є вивчення рівня експресії ТФ в тканинах шлунку при внутрішньоартеріальному введенні різних доз фторпіримідинів, а також проведення аналогічного дослідження на більш віддалених строках після внутрішньоартеріального введення 5-ФУ.

Література

1. Сташкевич М. А. Влияние нагрузки 5-фторурацилом на активность тимидинфосфорилазы печени крыс / М. А. Сташкевич // Питання експериментальної та клінічної медицини. – 2014. – Т. 18, № 4. – С. 60-66.
2. Сташкевич М. А. Фармакокинетика 5-фторурацила в опухолевой и нормальной ткани пациентов с аденокарциномой желудка / М. А. Сташкевич, Е. В. Хомутов, О. П. Шатова [та ін.] // Онкологія. – 2012. – Т. 1, № 41. – С. 19-23.
3. Amstutz U. Dihydropyrimidine dehydrogenase gene as a major predictor of severe 5-fluorouracil toxicity / U. Amstutz, T. K. Froehlich, C. R. Largiader // Pharmacogenomics. – 2011. – Vol. 12, № 9. – P. 1321-1336.
4. Bronckaers A. The dual role of thymidine phosphorylase in cancer development and chemotherapy / A. Bronckaers, F. Gago, J. Balzarini [et al.] // Med. Res. Rev. – 2009. – Vol. 29, № 6. – P.903-953.
5. Derwinger K. Changes in thymidine phosphorylase gene expression related to treatment of rectal cancer / K. Derwinger, E. B. Lindskog, E. Palmqvist [et al.] // Anticancer Res. – 2013. – Vol. 33, № 6. – P. 2447-2451.
6. Dolegowska B. Spectrophotometric methods as a novel screening approach for analysis of dihydropyrimidine dehydrogenase activity before treatment with 5-fluorouracil chemotherapy / B. Dolegowska, A. Ostapowicz, M. Stanczyk-Dunaj [et al.] // J. Physiol. Pharmacol. – 2012. – Vol. 63, № 4. – P. 411-421.
7. Hirashima Y. Predicting drug efficacy-fluorinated pyrimidines (fluorouracil, S-1 and capecitabine) / Y. Hirashima, K. Shirao // Gan To Kagaku Ryoho. – 2012. – Vol. 39, № 11. – P. 1603-1607.
8. Honda T. The relationship between clinicopathological factors and the reduction of pyrimidine nucleoside phosphorylase activity after preoperative administration of 5'-deoxy-5-fluorouridine / T. Honda, H. Inagawa, T. Nishizawa [et al.] // Anticancer Res. – 2010. – Vol. 30, № 8. – P. 3207-3211.
9. Ikeda R. Molecular basis for the inhibition of anticancer agents-induced apoptosis by thymidine phosphorylase / R. Ikeda //Yakugaku Zasshi. – 2007. -Vol. 127, № 7. – P. 1097-1102.
10. Pharmacogenetics, Kinetics, and Dynamics for Personalized Medicine / [D. F. Kisor, M. D. Kane, J. E. Sprague et al.] – Burlington, 2014. – 204 p.
11. Orditura M. Treatment of gastric cancer / M. Orditura, G. Galizia, V. Sforza [et al.] // World J. Gastroenterol. – 2014. – Vol. 20, № 7. – P. 1635-1649.
12. Stashkevych M. The influence of 5-fluorouracil on activity of thymidine phosphorylase in gastric adenocarcinoma and normal adjacent tissue / M. Stashkevych, E. Khomutov, Y. Dumanskiy [et al.] // Exp. Oncol. – 2014. – Vol. 36, № 4. – P. 267-270.
13. Thorn C. F. PharmGKB summary: fluoropyrimidine pathways / C. F. Thorn, S. Marsh, M. W. Carrillo [et al.] // Pharmacogenet. Genomics. – 2011. – Vol. 21, № 4. – P. 237-242.
14. Tozzi M. G. Pentose phosphates in nucleoside interconversion and catabolism / M. G. Tozzi, M. Camici, L. Mascia [et al.] // FEBS J. – 2006. – Vol. 273, № 6. – P. 1089-1101.
15. Van Kuilenburg A. B. Determination of thymidine phosphorylase activity by a non-radiochemical assay using reversed-phase high-performance liquid chromatography / A. B. Van Kuilenburg, L. Zoetekouw // J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. – 2005. – Vol. 820, № 2. – P. 271-275.

УДК 615.015.43

ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ АКТИВНОСТІ КЛЮЧОВИХ ФЕРМЕНТІВ ОБМІНУ 5-ФТОРУРЦИЛУ В ТКАНИНАХ ШЛУНКА ПРИ ВНУТРІШНЬОАРТЕРІАЛЬНОМУ ВВЕДЕННІ ПРЕПАРАТУ

Сташкевич М. А., Зяблiцев С. В., Гайова Л. В., Сидюк А. В.

Резюме. Ключовими ферментами метаболізму 5-фторурацилу (5-ФУ) є тимідинфосфорилаза (ТФ), яка реалізує перший етап його активації, і дигідропіримідиндегідрогеназа (ДПД), що забезпечує його деградацію. Метою цього дослідження була оцінка впливу високих доз 5-ФУ при його внутрішньоартеріальному введенні на активність ферментів власного обміну – ТФ і ДПД. Активність ферментів визначали в гомогенатах пухлинної та суміжної слизової тканини, видалених під час гастректомії у пацієнтів з аденокарциномою шлунка, серед них – 33 пацієнта отримували 5-ФУ у вигляді внутрішньоартеріальної ін'єкції, через 2-60 хвилин, після чого тканини видаляли. Контрольна група (10 пацієнтів) не отримувала 5-ФУ. Активність ДПД визначали спекторофотометрично, ТФ – методом ВЕРХ. Отримані результати показали, що активність ТФ поступово знижується з часом після введення 5-ФУ. Середня активність цього ферменту в групі контролю була в 3,5 рази вище за таку у пацієнтів, яким видаляли тканини через 41-60 хвилин після введення препарату (відмінності достовірні при p<0,05) в обох тканинах. Активність ДПД не відрізнялася між контрольною та дослідною групами пацієнтів і не залежала від часу після введення. Таким чином, високі дози 5-ФУ сприяють зниженню активності ферменту його активації ТФ і не впливають на рівень ферменту деградації – ДПД в тканинах шлунка.

Ключові слова: 5-фторурацил, тимідинфосфорилаза, дигідропіримідиндегідрогеназа, аденокарцинома, внутрішньоартеріальне введення

УДК 615.015.43

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ АКТИВНОСТИ КЛЮЧЕВЫХ ФЕРМЕНТОВ ОБМЕНА 5-ФТОРУРАЦИЛА В ТКАНЯХ ЖЕЛУДКА ПРИ ВНУТРИАРТЕРИАЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ ПРЕПАРАТА

Сташкевич М. А., Зяблицев С. В., Гаевая Л. В., Сидюк А. В.

Резюме. Ключевыми ферментами метаболизма 5-фторурацила (5-ФУ) являются тимидинфосфорилаза (ТФ), которая реализует первый этап его активации, и дигидропиримидиндегидрогеназа (ДПД), которая обеспечивает его деградацию. Целью настоящего исследования была оценка влияния высоких доз 5-ФУ при его внутриартериальном введении на активность ферментов собственного обмена – ТФ и ДПД. Активность ферментов определяли в гомогенатах опухоли и смежной слизистой, иссеченных при гастректомии у пациентов с аденокарциномой желудка, среди них – 33 пациента получали 5-ФУ в виде внутриартериальной инъекции, через 2-60 минут после которой ткани иссекали. Контрольная группа (10 пациентов) не получала 5-ФУ. Активность ДПД определяли спекторофотометрически, ТФ – методом ВЭЖХ. Полученные результаты показали, что активность ТФ постепенно снижается со временем после введения 5-ФУ. Средняя активность этого фермента в группе контроля была в 3,5 раз выше таковой у пациентов, которым иссекали ткани через 41-60 минут после введения препарата (различия достоверны при p<0,05) в обеих тканях. Активность ДПД не отличалась в контрольной и опытной группах пациентов и не зависела от времени после введения. Таким образом, высокие дозы 5-ФУ способствуют снижению активности фермента его активации – ТФ и не влияют на уровень фермента деградации – ДПД в тканях желудка.

Ключевые слова: 5-фторурацил, тимидинфосфорилаза, дигидропиримидиндегидрогеназа, аденокарцинома, внутриартериальное введение

UDC 615.015.43

COMPARATIVE ANALYSIS OF 5-FLUOROURACIL METABOLIC ENZYMES ACTIVITY IN GASTIC TISSUES UPON INTRAARTERIAL ADMINISTRATION OF THE DRUG

Stashkevych M., Zyablitsev S., Gayova L., Sidyuk A.

Abstract. The biotransformation of the widely used cytostatic 5-fluorouracil (5-FU) is realized by enzymes of pyrimidine metabolism. Thymidine phosphorylase (TP) catalyzes the first step of 5-FU active metabolites formation whereas dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) promotes degradation of 5-FU. These enzymes are known to be associated with clinical efficacy and toxicity of fluoropyrimidines. Previously the suppresive effect of fluoropyrimidines on enzymes of nucleotide metabolism including TP was shown, so we suggested that 5-FU may also influence the level of it`s own metabolic enzymes. In our recent studies we have demonstrated that upon the administration to the gastroepiploic artery 5-FU is accumulated in gastric tissue in high concentrations. High drug load of the tissues allows to find out it's metabolic effects which may be undetectable upon other types of administration. The aim of the present study was the comparison of 5-FU influence on the activity of TP and DPD in tumor and normal gastric mucosa upon intraarterial administration.

Methods. Activities of TP and DPD were determined in the homogenates of gastric tumor tissue and normal adjacent mucosa obtained from 43 patients with gastric adenocarcinoma. Test group (33 patients) received 250 mg of 5-FU in the form of intrarterial injection during gastrectomy. Tissues were excised in 2-60 minutes after 5-FU dose. Control group (10 patients) had not received 5-FU before surgery. DPD activity was determined using spectrophotometric method based on the increase of the absorbance at 260 nm after incubation of tissue homogenates with 5,6-dihydrouracil and $NADP^+$ due to the accumulation of uracil. TP activity was measured using HPLC by accumulation of it's product thymine after the incubation of homogenates with thymidine.

*Results. T*est group was divided into subgroups "2-20 min", "21-40 min" and "41-60 min" according to the time after 5-FU administration. With the course of time after 5-FU injection the linear decreasing of TP activity was observed. Mean TP activity in group "41-60 min" was up to 3.5 times lower than one in control group in both tissues (differences are significant at p<0.05). Mean TP activity in adjacent mucosa was 2.5 times lower than one in tumor tissue (differences are significant at p<0.05). For DPD there were no differences between control and all time-divided groups found. As distinct from TP the activity of DPD was not higher in tumor comparing to normal mucosa. For both enzymes high interindividual variability was characteristic: variation coefficient for TP activity in different groups ranged from 47 to 111%, for DPD – from 30 to 52%. In our previous study it was shown that velocity of 5-FU utilization in the examined tissues decreases with the time after administration. These results seemed to be associated with the suppression of TP activity but not DPD shown in the present study.

Conclusion. The obtained data testify that the action of high dose of 5-FU upon intraarterial administration leads to the suppression of TP activity both in tumor and adjacent tissues. Meanwhile loading gastric tissues with 5-FU does not affect the activity of it's catabolic enzyme – DPD.

Keywords: 5-fluorouracil, thymidine phosphorylase, dihydropyrimidine dehydrogenase, adenocarcinoma, intraarterial administration.

Рецензент – проф. Непорада К. С.

Стаття надійшла 05.10.2015 р.