

**На правах рукописи**

**Диковская Мария Андреевна**

**ЭНДОГЕННЫЕ ИНГИБИТОРЫ ЦИСТЕИНОВЫХ ПРОТЕАЗ  
В СЫВОРОТКЕ КРОВИ И БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ ГЛАЗА  
ПРИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ И ДОБРОКАЧЕСТВЕННЫХ  
НОВООБРАЗОВАНИЯХ**

**03.01.04 – биохимия**

**АВТОРЕФЕРАТ**

**диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук**

**НОВОСИБИРСК – 2016**

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном учреждении «МНТК «Микрохирургия глаза» имени акад. С.Н. Федорова» Минздрава России, Новосибирский филиал и Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт физиологии и фундаментальной медицины».

**Научные руководители:**

доктор медицинских наук, профессор **Короленко Татьяна Александровна**

доктор медицинских наук **Кулешова Ольга Николаевна**

**Официальные оппоненты:**

**Ефремов Анатолий Васильевич** - доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, заведующий кафедрой патологической физиологии Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России

**Козлов Вадим Викторович** - кандидат медицинских наук, заведующий 3-м онкологическим отделением Государственного бюджетного учреждения здравоохранения Новосибирской области «Новосибирский областной онкологический диспансер» Минздрава России

**Ведущая организация** Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Томский «Научно-исследовательский институт онкологии» (г. Томск)

Защита состоится \_\_\_\_\_ 2016 года в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 001.034.01 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт биохимии» по адресу ул. Тимакова 2, г. Новосибирск, 630117.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт биохимии» по адресу: <http://www.niibch.ru>

Автореферат разослан \_\_\_\_\_ 2016 года.

Ученый секретарь диссертационного совета **Русских Г.С.**

## Общая характеристика диссертации

**Актуальность темы.** Протеазы различных классов вовлечены в развитие и метастазирование злокачественных опухолей (Jäättelä M., 2015). При этом значимую роль играют их регуляторы - эндогенные ингибиторы протеаз, например, цистатины, эквимолярно взаимодействующие с цистеиновыми протеазами - катепсинами В, L, S и др. (Kos J., Lah T., 1998). При наличии в организме опухолевого очага, патологическая секреция протеолитических ферментов сопровождается истощением их эндогенных ингибиторов и приводит к нарушению соотношения «протеазы/ингибиторы протеаз»; уменьшение содержания последних прямо коррелирует с прогрессированием опухолевого процесса (Sloane B.F. et al., 2005; Verbovček U. et al., 2015) (рис.1). Таким образом, дисбаланс в протеолитической системе способствует инвазивному росту опухоли и ее метастазированию.

Цистатины - суперсемейство секретируемых в биологические жидкости эндогенных ингибиторов цистеиновых протеаз, имеющих важное значение в регуляции этих ферментов (катепсина В и др.) (Kos J. et al., 2014). Ряд цистатинов предложены в качестве маркеров опухолей, в частности, цистатин С связан с пролиферацией, дифференцировкой и миграцией клеток (Keppler D., 2006; Aits S., Jäättelä M., 2013; Xu Y. et al., 2015) и рассматривается в качестве маркера неходжкинской лимфомы (Mulaomerović A. et al., 2007). Менее ясна роль цистатина SN, однако, известно, что его содержание изменено при карциномах поджелудочной железы и кишечника (Kim et al., 2013).

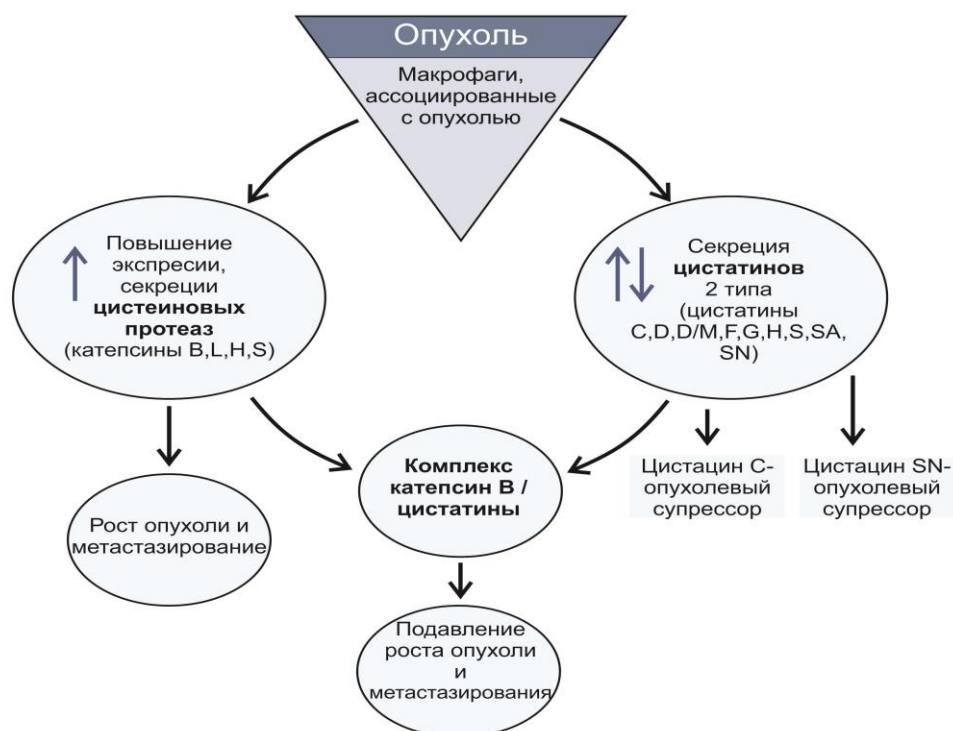


Рисунок 1. Общие механизмы вовлечения цистеиновых протеаз и цистатинов в развитие опухолей

Уvealная меланома (УМ) является высокозлокачественной опухолью и составляет 12% меланом всех локализаций с высоким удельным весом в структуре первичных внутриглазных новообразований органа зрения (80-90% случаев) (Семенова Л.Е., 2002; Damato B.E. et al., 2012; Vlaskamp M. et al., 2012; Coupland S.E. et al., 2013; Lake S.L. et al., 2013). Для УМ характерно

прогрессирующее течение, что приводит к генерализации процесса и смерти больных от метастатической болезни.

Диагностика УМ осложняется схожестью ее клинической картины с другими опухолевыми и неопухолевыми заболеваниями; дифференциальную диагностику проводят с более чем тридцатью патологическими состояниями, в том числе внутриглазными опухолями (ретинобластомой, невусом, гемангиомой), пороками развития, псевдоопухолями (дисциформной возрастной макулодистрофией), а также субретинальными кровоизлияниями и т.д. (Бровкина А.Ф., 2008; Бровкина А.Ф. и др., 2015; Fung A.T. et al., 2013; Shields C.L. et al., 2014). Наиболее часто встречаются имитирующие УМ невус хориоидеи и дисциформная возрастная макулодистрофия (дВМД), что приводит к трудностям дифференциальной диагностики (Shields C.L et al., 2015).

Ни один клинический симптом и результат инструментального исследования с применением современных высокотехнологичных методов диагностики не позволяют однозначно свидетельствовать об УМ, особенно на этапе минимального размера опухоли, в связи с этим, постоянно ведется поиск новых дифференциально-диагностических и прогностических маркеров этой патологии.

**Степень разработанности темы исследования.** Изучению роли цистеиновых протеаз и их эндогенных и экзогенных ингибиторов при опухолевых процессах в последние годы посвящено большое количество исследований (Короленко Т.А. и др., 2015; Потеряева О.Н. 2009; Kessenbrock K. et al., 2010; Kos J. et al., 2014; Jiang J. et al., 2015; Mori J. et al., 2016).

В зависимости от типов опухоли, секреция цистатинов второго семейства внеклеточно может быть усилена или снижена. Повышенная секреция наиболее изученного цистатина С внеклеточно отмечена при раке молочной железы, метастазирующей меланоме, колоректальном раке (Kos et al., 2000). Другие представители цистатинов второй группы (цистатины Е/М, F и др.) исследованы недостаточно, хотя некоторые цистатины обладают значительным потенциалом (прежде всего цистатин SN, ингибитор катепсина В, конкурирующий с цистатином С за ингибирование этой цистеиновой протеазы.). Показано, что при некоторых опухолях формирование комплекса катепсин В/цистатин С происходит неэффективно, что приводит к нарушению баланса протеаз и их ингибиторов в сыворотке больных раком (Magister, Kos, 2013).

Исследования эндогенных ингибиторов протеаз при увеальной меланоме, являющейся самой часто встречающейся внутриглазной опухолью, малочисленны и касаются лишь изучения экспрессии опухоли протеаз и их ингибиторов на энуклеированных глазах. (Pagaon L. et al., 2009). Очевидно, что исследование содержания эндогенных ингибиторов протеаз при этой патологии в доступных биологических жидкостях, перспективно для изучения онкогенеза

увеальной меланомы, поиска биомаркеров и в дальнейшем разработки новых лекарственных препаратов для таргетной терапии.

**Цель исследования** - изучить содержание эндогенных ингибиторов цистеиновых протеаз - цистатинов С и SN - в сыворотке крови и биологических жидкостях глаза у пациентов со злокачественными (увеальная меланома) и доброкачественными (невус хориоидеи и дисциформная возрастная макулодистрофия) новообразованиями.

**Задачи исследования:**

1. Изучить концентрацию цистатинов С и SN в сыворотке крови, слезе и внутриглазной жидкости у здоровых лиц в зависимости от возраста.
2. Определить концентрацию цистатинов С и SN в сыворотке крови, слезе и внутриглазной жидкости у пациентов с увеальной меланомой различных размеров.
3. Оценить содержание цистатинов С и SN в слезе и сыворотке крови у пациентов с невусом хориоидеи и дисциформной возрастной макулодистрофией.
4. Изучить возможную зависимость содержания цистатина С в сыворотке крови и биологических жидкостях глаза от особенностей васкуляризации увеальной меланомы, определяемой при ультразвуковом исследовании.

**Научная новизна.** Впервые определена концентрация цистатинов С и SN в слезе, внутриглазной жидкости и сыворотке крови при внутриглазных новообразованиях; во внутриглазной жидкости у здоровых; и впервые определена концентрация цистатина SN в слезе.

У здоровых лиц максимальная концентрация цистатина С установлена в сыворотке крови ( $809,99 \pm 146,76$  нг/мл), промежуточная во ВГЖ ( $522,04 \pm 124,7$ ) и минимальная – в слезе ( $287,49 \pm 20,01$  нг/мл). Выявлена прямая корреляция между уровнем цистатина С у здоровых лиц в сыворотке крови и во ВГЖ ( $r=0,82$ ;  $p=0,023$ ). Концентрация цистатина SN также максимальна в сыворотке крови ( $3,12 \pm 0,32$  нг/мл), во ВГЖ -  $2,59 \pm 0,61$  и в слезе -  $0,70 \pm 0,15$  нг/мл с тенденцией увеличения с возрастом при отсутствии гендерных различий. Концентрация цистатина SN в сыворотке крови достоверно выше ( $p=0,0001$ ), чем в слезе и во ВГЖ ( $p=0,000$ ). Обнаружена обратная корреляционная взаимосвязь между концентрациями цистатинов С и SN в сыворотке крови ( $r= - 0,78$ ;  $p=0,02$ ).

Продемонстрировано изменение содержания эндогенных ингибиторов цистеиновых протеаз (цистатинов С и SN) при развитии увеальной меланомы. Концентрация цистатина С в слезе пораженного глаза у больных УМ  $441,70 \pm 14,51$  нг/мл достоверно ( $p=0,0000\dots$ ) превышает показатель условно здоровых лиц контрольной группы -  $287,49 \pm 20,01$  нг/мл. Независимо от размера опухоли повышение цистатина С в слезе симметрично, что свидетельствует о системном характере патологического процесса в условиях роста злокачественной опухоли.

Впервые у пациентов с увеальной меланомой в биологических жидкостях глаза и сыворотке крови обнаружены реципрокные отношения между ингибиторами эндогенных цистеиновых протеаз: повышение концентрации цистатина С и снижение концентрации цистатина SN. Продемонстрирована синхронность изменения концентрации цистатинов С и SN в сыворотке крови и слезе у пациентов с увеальной меланомой.

Проведенное исследование показало, что в сыворотке крови происходят значительные изменения содержания цистатинов С и SN при развитии увеальной меланомы независимо от ее размера, в то время как аналогичные изменения этих ингибиторов в биологических жидкостях глаза выражены в значительно меньшей степени.

Впервые показано содержание цистатина С в слезе у пациентов с невусом хориоидеи и проведено его сравнение с аналогичным показателем у пациентов с меланомой малого размера. При этом пациенты с увеальной меланомой малого размера и с невусом по содержанию цистатина С в слезе отличались от контрольной группы с высокой степенью достоверности ( $p=0,0054$  и  $p=0,00011$ ), при отсутствии различий между концентрацией цистатина С в слезе пациентов увеальной меланомой и невусом.

Впервые установлено, что содержание цистатина С в слезе пораженного глаза у пациентов с псевдотуморозной формой дисциформной возрастной макулодистрофии составляет  $435,6 \pm 21,9$  нг/мл, в слезе непораженного глаза  $449,3 \pm 35,2$  нг/мл ( $p=1$ ) при достоверном превышении показателя контрольной группы ( $p=0,006$ ). Отсутствие достоверных различий в содержании цистатина С в слезе обоих глаз у каждого пациента свидетельствует о системности дистрофического процесса, затрагивающего хориоидею и сетчатку. Следует отметить, что в сыворотке крови у пациентов с возрастной макулодистрофией получено достоверное снижение концентрации цистатина SN ( $1,39 \pm 0,43$  нг/мл;  $p = 0,027$ ) по сравнению с контрольной группой, однако, в сравнении с содержанием цистатина SN в сыворотке крови пациентов с увеальной меланомой, достоверного отличия не выявлено. Сравнение концентрации цистатина С в слезе пораженного глаза пациентов с увеальной меланомой и дисциформной возрастной макулодистрофией не выявило различий. Кроме того, статистический анализ реципрокных отношений цистатинов С и SN в сыворотке крови и слезе свидетельствует о достоверной значимости этого параметра для установления различий между контрольной группой здоровых и пациентами с пролиферативными процессами.

Среди ультразвуковых параметров увеальной меланомы наибольшую диагностическую значимость имели максимальная систолическая скорость и индекс резистентности в новообразованной артерии, которые увеличивались с размером опухоли; начиная от размера 8 мм, показатели гемодинамики уменьшались; корреляция между показателями кровотока и содержанием цистатина С в трех биологических жидкостях не выявлена.

**Практическая значимость.** Полученные данные об уровне содержания эндогенных ингибиторов цистеиновых протеаз при развитии увеальной меланомы развивают существующие теоретические представления о биохимических аспектах опухолевого роста. Для практического здравоохранения получены вспомогательные диагностические маркеры увеальной меланомы. Продолжение проведенных исследований эндогенных ингибиторов протеаз перспективно для создания новых противоопухолевых препаратов.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. У здоровых лиц и пациентов с катарактой наибольшая концентрация цистатинов С и SN - в сыворотке крови, промежуточная во внутриглазной жидкости и наименьшая – в слезе при отсутствии гендерных и возрастных различий. Обнаружена обратная корреляционная взаимосвязь между концентрацией цистатина С и цистатина SN в сыворотке крови.

2. Инициация и прогрессирование увеальной меланомы (независимо от размеров опухоли) сопровождаются изменением содержания и баланса эндогенных ингибиторов цистеиновых протеаз, проявляющееся повышением концентрации цистатина С и уменьшением концентрации цистатина SN в сыворотке крови, слезе и внутриглазной жидкости.

3. Увеличение концентрации цистатина С при одновременном уменьшении концентрации цистатина SN в биологических жидкостях глаза и сыворотке крови при увеальной меланоме свидетельствует о реципрокном взаимоотношении цистатинов, отражающем системный и опухоль-специфичный характер процесса.

**Апробация работы.** Основные положения диссертационной работы были представлены и обсуждены на 15th International Congress on Circumpolar Health (Fairbanks, AK, USA, 2012 г.); на Межрегиональной научно-практической конференции «Актуальные вопросы в современной офтальмологии» с интернет-трансляцией (Новосибирск, 2013 г.); на областной школе офтальмолога, посвященной вопросам офтальмоонкологии (Новосибирск, 2013); на Всероссийской конференции «Протеолитические ферменты: структура, функции, эволюция» (Петрозаводск, 2014), на международной научной конференции «Клеточные и молекулярные механизмы взаимоотношения опухоли и микроокружения» («Cellular and molecular mechanisms of tumor-microenvironment crosstalk») (Томск, 2015 г.).

**Публикации.** Материалы диссертации опубликованы в 9 научных работах, из них 4 статьи в рецензируемых периодических изданиях, рекомендуемых для публикации результатов кандидатских диссертаций.

**Объем и структура диссертации.** Диссертация изложена на 118 страницах компьютерного текста, содержит введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты исследования, обсуждение, выводы, практические рекомендации и список цитируемой литературы (36 отечественных и 172 иностранных источников). Диссертация содержит 9

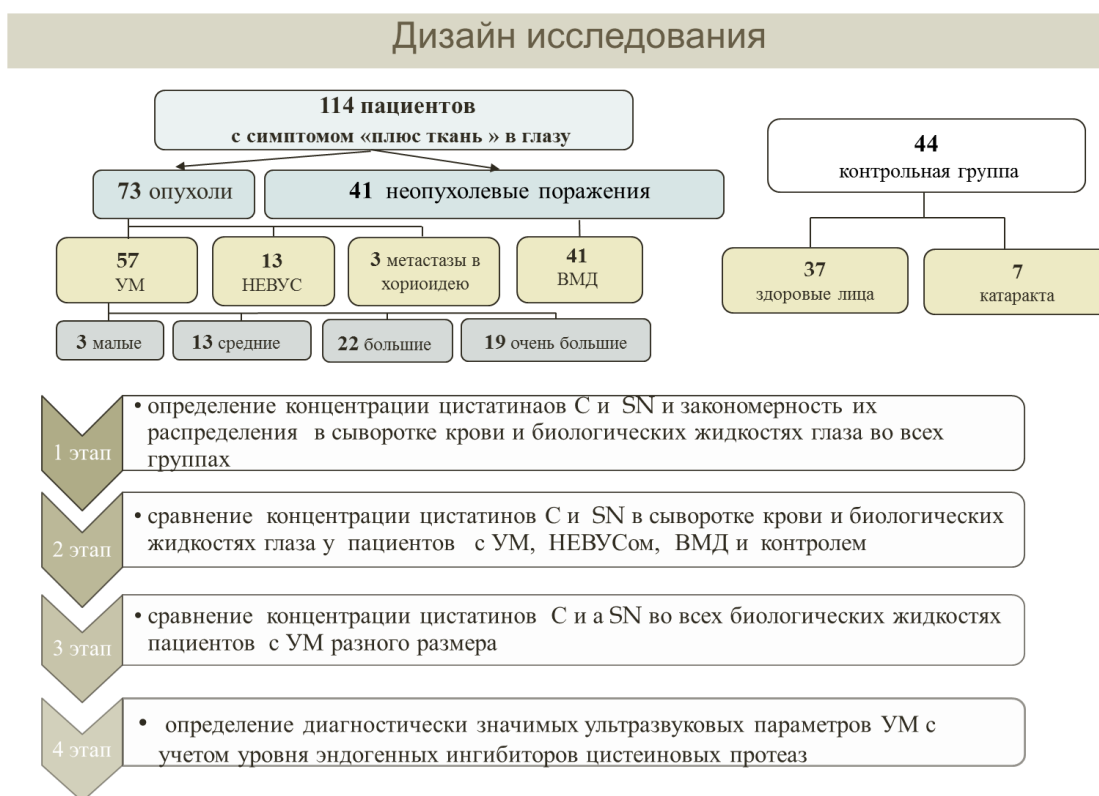
таблиц и 25 рисунков.

Работа выполнена в соответствии с планом НИР ФГБНУ «Научно-исследовательский институт физиологии и фундаментальной медицины». Тема диссертации утверждена Ученым советом Института, протокол № 33-02/386 от 28 октября 2010 г. Исследование одобрено локальным этическим комитетом ФГБНУ «НИИ физиологии и фундаментальной медицины»

**Личный вклад автора.** Автор лично участвовал в комплексном обследовании пациентов, сборе биологических жидкостей у исследуемых, проведении лабораторных исследований, статистической обработке и анализе полученных результатов. Опубликованные работы написаны лично автором или при непосредственном его участии.

Автор выражает глубокую благодарность за помощь и поддержку при выполнении исследования профессору Валерию Вячеславовичу Черных и профессору Александру Николаевичу Трунову.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ



Проведено комплексное исследование 114 пациентов (41 мужчина и 73 женщины) в возрасте от 24 до 89 лет ( $63,6 \pm 6,4$  года) с клиническим симптомом «плюс-ткань» в глазу различной этиологии, обратившихся для обследования и лечения в Новосибирский филиал ФГАУ МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова в период с 2010 по 2013 г. Из них 57 пациентов с УМ, 13 – с невусом хориоидеи, 41 – с дВМД, 3 – с метастазами в хориоидею рака молочной железы. Критерием исключения из исследования служило наличие у пациента тяжелой соматической патологии (почечной и/или сердечно-сосудистой).

**Биохимическое исследование биологических жидкостей.** Слезную жидкость в



количестве 0,3-0,5 мл набирали микроканюлей из нижнего конъюнктивального свода глаза в сухую герметичную пробирку. Слезопroduкцию стимулировали механическим раздражением рецепторных окончаний тройничного нерва в слизистой оболочке глаза. Для получения сыворотки крови взятие крови осуществляли из локтевой вены по стандартной методике. Для исследования внутриглазной жидкости (ВГЖ) использовали влагу передней камеры глаза, которую у пациентов с меланомой брали из энуклеированных глаз, у пациентов контрольной группы – во время операции экстракции катаракты.

**Исследование содержания цистатинов С и SN.** Концентрацию цистатинов определяли методом иммуноферментного анализа с использованием коммерческих наборов. Для количественного определения **цистатина С** человека – Biovendor Human Cystatin C Elisa (Чехия). Контроли качества и исследуемые образцы были инкубированы в лунках микропланшета, предварительно покрытых поликлональными человеческими антителами против цистатина С. Была построена стандартная кривая путем противопоставления значений оптической плотности и концентраций стандартов цистатина С. Концентрации неизвестных образцов определялись с помощью этой стандартной кривой.

Исследование концентрации **цистатина SN** проводили путем иммуноферментного анализа, основанного на «сэндвич» методе, с использованием коммерческих наборов Human Cystatin SN (CST1) Elisa Kit Cusabio (Китай). Стандарты, контроли качества и исследуемые образцы были подготовлены; антитела для CST1 были нанесены на микропланшет. В каждую лунку вводили 100µl стандарта и исследуемого образца. Оптическая плотность полученного раствора измерялась при помощи иммуноферментного ридера при длине волны 450 нм с последующим расчетом концентрации цистатина SN с использованием калибровочной кривой. Результаты выражали в нанограммах на миллилитр.

Взятие материала и все исследования проводили в соответствии с Хельсинской декларацией Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 года и «Правилами клинической практики в РФ», утвержденными Приказом МЗ РФ №266 от 19.06.2003 года; у всех пациентов получено письменное информированное согласие для проведения исследования.

**Клинические методы исследования.** Всем пациентам, наряду с клиническим, проводили офтальмологическое исследование, фотографирование глазного дна, ультразвуковое исследование (УЗИ) в режиме В-сканирования, дуплексное сканирование глаза с доплерографией сосудов, по показаниям - УЗ-биомикроскопию, оптическую когерентную томографию сетчатки (ОКТ), флюоресцентную ангиографию глазного дна. Все пациенты с подозрением на опухолевый процесс обследованы онкологом для исключения опухоли другой локализации и наличия метастазов УМ.



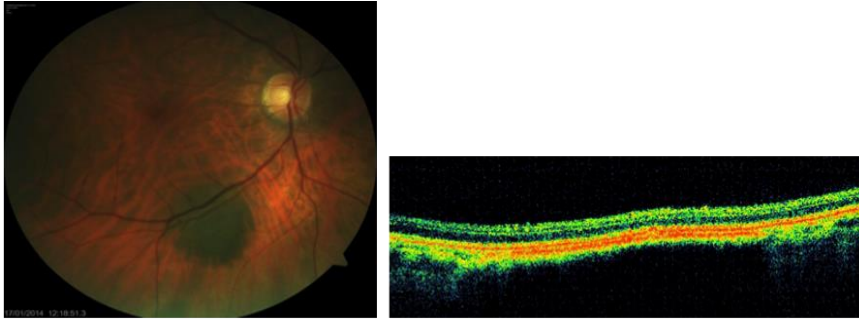


Рисунок 3. Больной Н., 45 лет. Офтальмоскопическая картина и ОКТ невуза хориоидеи.

В группе с дВМД (41 пациент), нередко симулирующей УМ, было 16 мужчин и 25 женщин в возрасте от 42 до 89 лет ( $68,0 \pm 1,8$  лет) с низкой остротой зрения от 0,005 до 0,4. Диагноз устанавливали на основании офтальмоскопической картины и ОКТ (рис. 3).

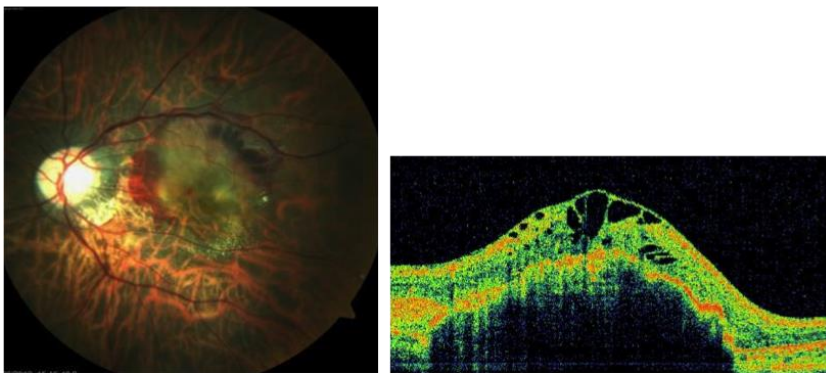


Рисунок 4. Больная Б., 70 лет. Офтальмоскопическая картина и ОКТ дисциформной ВМД.

Группу контроля составили 37 здоровых лиц (медицинский персонал клиники и студенты медуниверситета в возрасте от 20 до 49 лет; средний возраст  $31,0 \pm 4,1$  год, 20 мужчин и 17 женщин) и 7 пациентов (3 мужчин и 4 женщины) с возрастной неосложненной катарактой в возрасте от 57 до 80 лет ( $71,0 \pm 2,6$  год). Во время удаления катаракты взята ВГЖ для биохимических исследований.

### **Эндогенные ингибиторы протеаз цистатины С и SN в биологических жидкостях здоровых и условно здоровых лиц**

В результате исследования биологических жидкостей глаза (слеза и внутриглазная жидкость) и сыворотки крови у здоровых и условно здоровых (пациенты с катарактой) лиц установлено, что концентрация цистатина С в сыворотке крови, слезе и ВГЖ в сотни раз превышала значения концентрации цистатина SN (табл. 1).

Максимальная концентрация цистатинов С и SN была в сыворотке крови, промежуточная во ВГЖ и минимальная – в слезе.

При определении концентрации цистатинов С и SN в биологических жидкостях в зависимости от возраста отмечена тенденция к повышению содержания данных ингибиторов во всех исследуемых жидкостях в возрастной группе старше 60 лет, при этом гендерные различия

не выявлены.

Выявлена прямая корреляция между уровнем цистатина С у здоровых лиц в сыворотке крови и во ВГЖ ( $r=0,82$ ;  $p=0,023$ ). Концентрация цистатина SN в сыворотке крови была достоверно выше ( $p=0,0001$ ), чем в слезе и во ВГЖ ( $p=0,000$ ). Обнаружена обратная корреляционная взаимосвязь между концентрациями цистатинов С и SN в сыворотке крови ( $r=-0,78$ ;  $p=0,02$ ).

Таблица 1. Концентрация цистатинов С и SN в биологических жидкостях здоровых лиц в зависимости от возраста ( $M \pm m$ )

| Подгруппы в зависимости от возраста | Исследуемый ингибитор | Биологическая жидкость (нг/мл) |               |               |
|-------------------------------------|-----------------------|--------------------------------|---------------|---------------|
|                                     |                       | Сыворотка крови                | Слез          | ВГЖ           |
| Контрольная группа<br>n=44          | Цистатин С            | 809,99±146,76                  | 287,49±20,01  | 522,04±124,66 |
|                                     | Цистатин SN           | 3,12 ± 0,32                    | 0,70 ± 0,15   | 2,59 ± 0,61   |
| 1-я – до 40 лет<br>n=19             | Цистатин С            | 561,3 ± 10,0                   | 296,6 ± 11,1  | - / -         |
|                                     | Цистатин SN           | 2,24 ± 0,2                     | 0,49 ± 0,3    | - / -         |
| 2-я – 41-60 лет<br>n=15             | Цистатин С            | 539,2 ± 111                    | 255,8 ± 82,3  | 413,6 ± 28    |
|                                     | Цистатин SN           | 2,96 ± 0,7                     | 0,6 ± 0,35    | 2,7 ± 1,4     |
| 3-я - старше 60 лет<br>n=10         | Цистатин С            | 1340,5 ± 176,7                 | 381,6 ± 112,6 | 844,2 ± 112,6 |
|                                     | Цистатин SN           | 4,77 ± 0,1                     | 0,75 ± 0,14   | 2,18 ± 0,2    |

Полученные результаты о концентрации ингибиторов цистеиновых протеаз в слезе и ВГЖ вносят существенное дополнение в имеющиеся ранее представления об их содержании в биологических жидкостях человека (рис. 4).

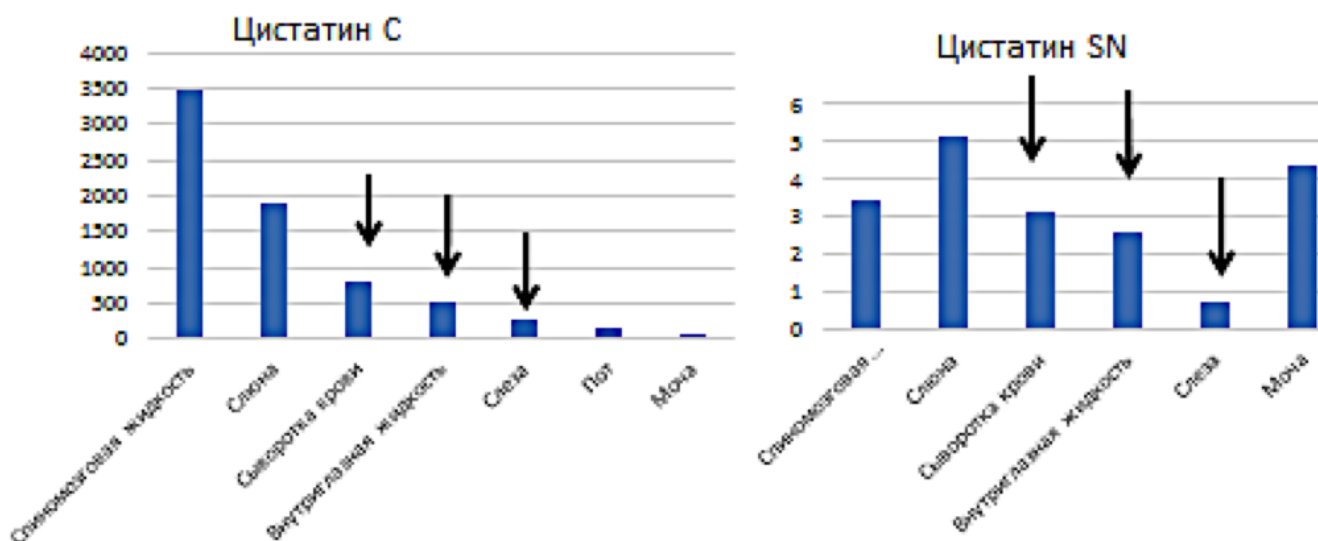


Рис. 5. Содержание цистатинов С и SN в различных биологических жидкостях у здоровых лиц (нг/мл). Стрелками отмечены собственные результаты.

#### Эндогенные ингибиторы протеаз цистатины С и SN в биологических жидкостях у пациентов с УМ, невусом и дВМД

Сравнение содержания **цистатина С** в различных биологических жидкостях (сыворотка крови, слеза и ВГЖ) у пациентов с УМ и у лиц контрольной группы проводили с помощью критерия Манна-Уитни. Концентрация **цистатина С** в слезе пораженного глаза у больных УМ составила  $441,70 \pm 14,51$  нг/мл, что с очень высоким уровнем достоверности ( $p=0,0000\dots$ ) превышало показатель среднего значения условно здоровых лиц контрольной группы -  $287,49 \pm 20,01$  нг/мл.

Выполнена проверка гипотезы о симметричном повышении содержания цистатина С в слезе пораженного и неповрежденного глаза при УМ независимо от размера опухоли. При попарном сравнении образцов с помощью парного критерия Вилкоксона установлено отсутствие достоверных различий по содержанию цистатина С в образцах слезы обоих глаз одного и того же пациента с УМ ( $p=0,3037$ ), что свидетельствует о системном характере патологического процесса в условиях роста злокачественной опухоли.

С помощью ANOVA рангового критерия Краскелла-Уоллиса выполнен анализ содержания цистатина С в слезе пациентов с УМ в зависимости от ее размера. Концентрация цистатина С в два раза превышала нормативные значения, но не зависела от размера опухоли,  $p=0,1219$  (рис. 6). Таким образом, опухолевый процесс характеризуется значимым повышением цистатина С в слезе на всех стадиях патологического процесса.

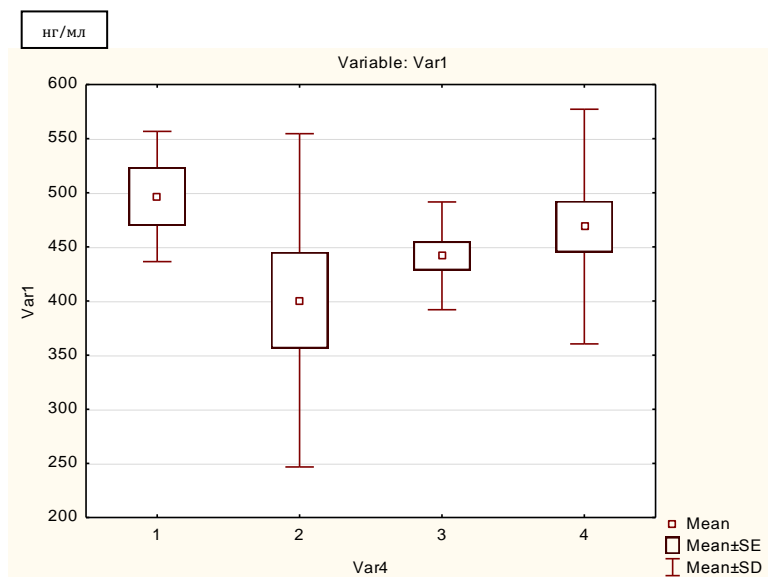


Рис. 6. Средняя концентрация цистатина С в слезе пациентов с УМ в зависимости от размера опухоли: 1- малая, 2- средняя, 3- большая, 4 – очень большая.

В клинической практике УМ малых размеров часто приходится дифференцировать с невусом хориоидеи – доброкачественной опухолью. Среднее содержание цистатина С в слезе пораженного глаза пациентов с малой УМ составило  $467,6 \pm 43,4$  нг/мл, в слезе пораженного глаза пациентов с невусом -  $408,83 \pm 48,06$  нг/мл ( $p = 1$ ). При этом группа пациентов с малой УМ по содержанию цистатина С в слезе отличалась от контрольной группы с высокой степенью достоверности ( $p=0,0054$ ). Кроме того, концентрация цистатина С в слезе пораженного глаза пациентов с невусом достоверно превышала соответствующий показатель контрольной группы ( $p=0,00011$ ).

Характер различий содержания цистатина С в слезе у пациентов с УМ, невусом и условно здоровых лиц контрольной группы был дополнительно тестирован с помощью однофакторной ANOVA с Tukey-тестом. Концентрация цистатина С в слезе пациентов контрольной группы было с очень высоким уровнем достоверности меньше аналогичного показателя у пациентов с УМ ( $p=0,000114$ ) и у пациентов с невусом ( $p=0,000117$ ).

Таким образом, УМ независимо от размера опухоли характеризуется статистически значимым повышенным содержанием цистатина С как в слезе пораженного глаза по сравнению с контрольной группой, так и в слезе здорового глаза в группе пациентов с невусом.

При определении содержания цистатина С в слезе пораженного глаза у пациентов с **дисциформной возрастной макулодистрофией** (псевдотуморозная форма) его концентрация составила  $435,6 \pm 21,9$  нг/мл, в слезе непораженного глаза  $449,3 \pm 35,2$  нг/мл. Отсутствие достоверных различий в содержании данного ингибитора протеаз в слезе обоих глаз одного пациента может свидетельствовать о системности дистрофического процесса, затрагивающего хориоидею и сетчатку.

При сравнении данных, полученных в результате исследования слезы непораженного

глаза пациентов с дВМД, выявлено достоверное различие с контролем ( $p=0,006$ ). Однако при сравнении концентрации цистатина С в слезе пораженного глаза пациентов с УМ и дВМД различий не выявлено..

На рисунке 7 представлено сравнение 4-х групп УМ разного размера(1-4), невуса (5) и контроля (6) по содержанию цистатина С в слезе (при УМ – больной глаз).

В отличие от сыворотки крови и слезы, определение содержания цистатинов С и SN во **внутриглазной жидкости** у 17 пациентов с УМ (энуклеированный материал) и в контрольной группе (у 7 пациентов с неосложненной катарактой) с помощью критерия Манна-Уитни не выявило достоверных различий содержания цистатина С между УМ -  $552,50\pm 54,23$  нг/мл и контрольной группой -  $522,04\pm 124,66$  нг/мл ( $p=0,058$ ). Однако по цистатину SN выявлены высоко достоверные ( $p=0,0000$ ) различия:  $1,43\pm 0,12$  нг/мл при УМ и  $2,59\pm 0,61$  нг/мл в контрольной группе.

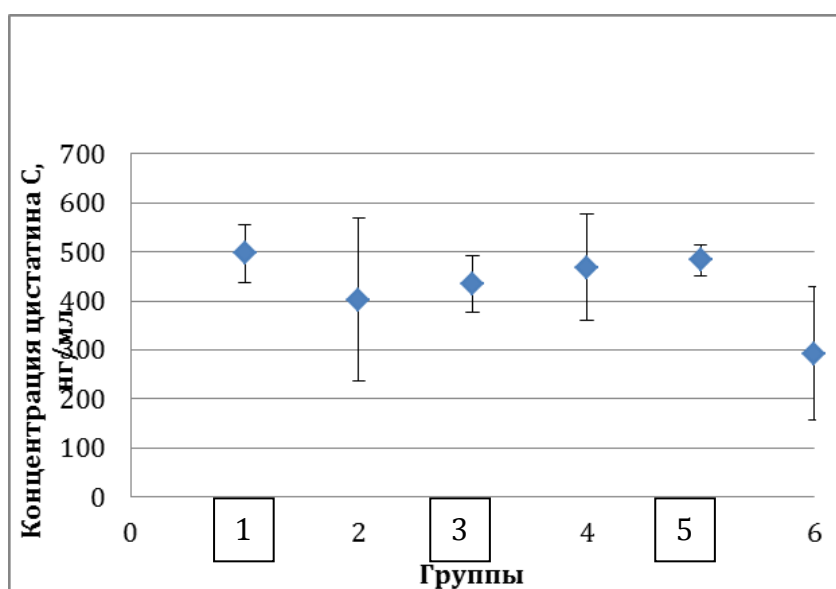


Рисунок 7. Сравнение концентрации цистатина С в слезе в группах с меланомой разного размера, невусом хориоидеи и контролем.(1-меланома малого размера,2-среднего,3-большого,4-очень большого размера, 5-невус, 6- контроль).

Контроль статистически достоверно отличается от групп меланомы размеров 1, 3 и 4 и от невуса: с группой 1  $p=0,0041$ , с группой 3  $p=0,0008$ , с группой 4  $p=0,0001$ , с невусом  $p=0,0001$ . Различия с группой меланомы размером 2 недостоверны,  $p=0,0553$

**Результаты исследования содержания цистатинов С и SN в сыворотке крови** у пациентов с УМ, дВМД и в контрольной группе представлены в табл. 2.

Содержание **цистатина С в сыворотке крови** у больных УМ достоверно превышало показатель контрольной группы ( $p=0,0395$ ). Концентрация цистатина С в сыворотке крови пациентов с дВМД также была достоверно выше, чем в контроле ( $p=0,009$ ), и превышала показатель сыворотки крови больных УМ

Таблица 2. Концентрация цистатинов С и SN в сыворотке крови при УМ, дВМД и в контрольной группе (M±m).

| Группы                  | Цистатин С (нг/мл) | Цистатин SN (нг/мл) |
|-------------------------|--------------------|---------------------|
| Увеальная меланома n=57 | 1023,5 ± 78,9*     | 1,45 ± 0,3*         |
| Дисциформная ВМД n=41   | 1696,0 ± 268,9*    | 1,39 ± 0,43*        |
| Контрольная группа n=44 | 809,99 ± 146,8     | 3,12 ± 0,32         |

Примечание \* - достоверность отличий по сравнению с контрольной группой ( $p < 0,05$ ).

. Содержания **цистатина SN в сыворотке крови** у пациентов с УМ был достоверно ниже уровня контрольной группы ( $p=0,0038$ ); при дВМД также достоверно меньше по сравнению с контрольной группой ( $p=0,027$ ).

В целом, содержание ингибиторов цистеиновых протеаз в сыворотке крови характеризовалось увеличением значений цистатина С и уменьшением - цистатина SN при УМ и дВМД по сравнению с контрольной группой.

#### **Изучение взаимодействия цистатинов С и SN в биологических жидкостях пациентов с УМ, невусом и дВМД**

Для выявления закономерностей количественного отношения исследуемых цистатинов был использован коэффициент их реципрокного соотношения в сыворотке крови и слезе, полученный при попарном делении показателя цистатина С на значение показателя цистатина SN для каждого клинического наблюдения в группах пациентов с УМ, дВМД и контрольной группой. Полученные коэффициенты сравнивались как две независимые выборки с помощью критерия Манна-Уитни (рис. 7).

При попарном сравнении коэффициентов **в сыворотке крови** при УМ независимо от размера опухоли и контрольной группы коэффициент соотношения содержания цистатинов С и SN в среднем в 3 и более раза выше в группе с УМ ( $630,28 \pm 143,55$ ), чем в контрольной группе ( $183,62 \pm 28,24$ ) ( $p=0,0012$ ). При сравнении коэффициентов **слезы** этих же пациентов также выявлены статистически достоверные различия ( $p=0,0055$ ): при УМ в 2 раза больше, чем в контроле -  $1159,78 \pm 269,09$  и  $459,66 \pm 74,06$  нг/мл соответственно. Полученные результаты демонстрируют синхронность и однонаправленность изменения концентрации цистатинов С и SN в сыворотке крови и слезе у пациентов с УМ.

Было проведено сравнение характера реципрокных отношений цистатинов С и SN у пациентов с дВМД как инволютивной патологией, имеющей аналогичную УМ клиническую картину, а также в контрольной группе. Сравнение коэффициентов соотношения цистатинов **в сыворотке крови** выявило статистически достоверные различия ( $p=0,0066$ ) между дВМД ( $2056,0 \pm 599,11$ ) и контрольной группой ( $183,62 \pm 28,24$ ). Аналогичный характер реципрокных



отношений цистатинов С и SN выявлен в слезе: при дВМД  $1601,8 \pm 434,07$  и в контрольной группе  $459,66 \pm 74,06$ ; ( $p=0,0035$ ).

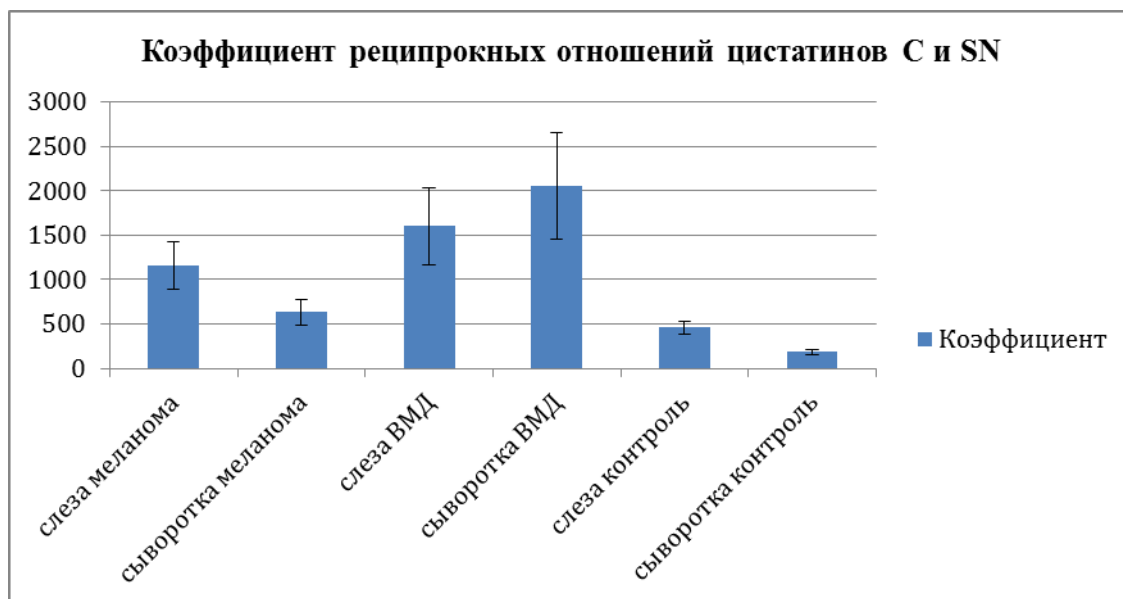


Рис. 8. Средние показатели коэффициентов реципрокного соотношения цистатинов С и SN сыворотке крови и слезе попарно для каждого пациента при УМ, дВМД и в контрольной группе. Критерий Манна-Уитни.

Таким образом, статистический анализ реципрокных отношений цистатинов С и SN в сыворотке крови и слезе свидетельствует о достоверной значимости этого параметра для установления различий между контрольной группой, т.е. лицами без патологии хориоидеи, и пациентами с пролиферативными процессами.

Сравнение реципрокных отношений цистатинов в группах пациентов с УМ и дВМД с помощью критерия Манна-Уитни не выявило достоверных отличий. В то же время, отмечена тенденция более высокого коэффициента соотношения цистатинов С и SN в сыворотке крови пациентов с дВМД -  $2056,0 \pm 599,11$  против  $630,28 \pm 143,55$  при УМ,  $p=0,0587$ . При сравнении коэффициентов слезы этих же пациентов статистически достоверные различия также не выявлены:  $1601,80 \pm 434,07$  при дВМД и  $1159,78 \pm 269,09$  при УМ независимо от размера опухоли ( $p=0,4465$ ).

Тем не менее, полученные значения коэффициента соотношения цистатинов С и SN могут отражать асинхронный характер изменения концентрации каждого из цистатинов в патогенезе каждого патологического процесса, и ведущая диагностическая значимость принадлежит не соотношению цистатинов, а их непосредственным абсолютным показателям.

**Результаты ультразвукового исследования 114 пациентов с симптомом «плюс-ткани» в глазу при УМ и псевдотуморозных образованиях.** У 57 пациентов с УМ имелись следующие ультразвуковые признаки. Характерная форма – грибовидная 11 (20%) глаз,

чечевицеобразная или округлая, куполообразная - 41 (72%) глаз и неправильная форма в виде двух «горбов» - 5 (8%) глаз. Во всех случаях четкий ровный контур, средняя или низкая эхоплотность; в 41 (72%) глазу - акустический симптом «экскавации хориоидеи». Диагностирована вторичная отслойка сетчатки: при очень большой УМ на 19 глазах наблюдали в 100% случаев, при УМ большого размера - на 21 глазу (97,3%), при УМ среднего размера - 8 глаз (64,7%); при малой УМ отслойку сетчатки не наблюдали.

**Определение особенностей кровообращения в увеальной меланоме** при дуплексном сканировании с цветовым доплеровским картированием у пациентов с большой УМ позволило выявить наличие кровотока в опухоли на 41 глазу (100%), при средних размерах на 12 глазах (93%). У пациентов с малым размером УМ минимальный размер опухоли, при котором был выявлен кровоток, составил 2,4 мм и был выявлен на 2 глазах (50%).

Среди показателей гемодинамики **в новообразованных сосудах опухоли** диагностическую значимость имели максимальная систолическая скорость и индекс резистентности в артерии, которые увеличивались в динамике роста опухоли; начиная от размера 8 мм, показатели гемодинамики уменьшались. Максимальная скорость кровотока в вене достоверно не отличалась в группах с разным размером меланомы.

Изучены коррелятивные связи между параметрами кровотока в сосудах пораженного глаза и концентрацией цистатина С в биологических жидкостях с использованием рангового коэффициента корреляции Спирмена. Достоверной корреляции между ультразвуковыми показателями кровотока в УМ и уровнем цистатина С не выявлено.

В целом, результаты исследования могут служить в качестве вспомогательных диагностических маркеров увеальной меланомы.

### **Выводы**

1. Содержание ингибиторов протеаз цистатина С и SN в биологических жидкостях у здоровых лиц был максимальным в сыворотке крови, меньшим – во внутриглазной жидкости и минимальным - в слезе. При этом концентрация цистатина С у здоровых лиц в сыворотке крови, внутриглазной жидкости и слезе превышала более чем в 100 раз соответствующие значения цистатина SN с тенденцией повышения уровня содержания цистатинов С и SN во всех исследуемых жидкостях у лиц старше 60 лет.

2. Изменения концентрации цистатинов С и SN в биологических жидкостях при доброкачественных опухолях с симптомом «плюс-ткань» (невус хориоидеи и дисциформная возрастная макулодистрофия) достоверно отличались от контрольной группы при отсутствии статистически достоверного отличия от увеальной меланомы.

3. При увеальной меланоме в биологических жидкостях глаза и сыворотке крови пациентов обнаружены реципрокные соотношения между эндогенными ингибиторами цистеиновых протеаз: повышение концентрации цистатина С и снижение концентрации цистатина SN. Коэффициент реципрокного соотношения цистатинов С и SN в сыворотке крови и слезе достоверно выше у пациентов с увеальной меланомой по сравнению со здоровыми лицами.

4. Наиболее значимыми ультразвуковыми дифференциально-диагностическими маркерами увеальной меланомы являются экскавация хориоидеи, низкая эхоплотность, куполообразная форма и высокоскоростной кровоток в новообразовании. Достоверной корреляции между ультразвуковыми показателями кровотока и уровнем цистатина С в трех биологических жидкостях не выявлено.

5. Увеальная меланома от малых до очень больших размеров сопровождается достоверным повышением содержания цистатина С в сыворотке крови и слезе и уменьшением содержания цистатина SN в сыворотке крови по сравнению с контрольной группой при отсутствии статистически достоверных отличий от аналогичных показателей у пациентов с невусом хориоидеи и дисциформной возрастной макулодистрофией, что свидетельствует о вовлечении эндогенных ингибиторов цистеиновых протеаз цистатина С и SN в патологические процессы, сопровождающиеся пролиферацией.

#### **Практические рекомендации**

1. При обследовании пациентов с подозрением на УМ необходимым является проведение УЗИ с оценкой таких параметров как форма и поверхность образования, его эхоплотность, наличие или отсутствие симптома «экскавации хориоидеи», выявление васкуляризации образования с помощью дуплексного сканирования с ЦДК, при котором оценивается кровоток не только во внутриопухолевых сосудах, но так же и в магистральных артериях и венах пораженного опухолью и интактного глаза.

2. Изменение содержания с нарушением баланса цистатинов С и SN в сыворотке крови и слезе может быть вспомогательным маркером при промотировании увеальной меланомы малого размера с целью своевременной постановки и подтверждения диагноза.

#### **Список работ, опубликованных по теме диссертации**

1. Диковская, М.А, Дулидова, В.В., Короленко, Т.А., Черных, В.В. Цистатин С в слезной жидкости пациентов с меланомой хориоидеи / М.А.Диковская // Федоровские чтения – 2012: материалы X-й Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. – М. – 2012. - С. 155-156.

2. Диковская, М.А., Черных, В.В., Короленко, Т.А. Цистатины в слезной жидкости пациентов с внутриглазными образованиями / М.А.Диковская // Тезисы VII Сибирского съезда физиологов. Красноярск.- 2012. – С. 18.
3. Диковская, М.А., Кулешова, О.Н., Лукша, Е.Б., Короленко, Т.А. Поиск дополнительных маркеров для дифференциальной диагностики внутриглазных опухолей и заболеваний, их симулирующих / М.А.Диковская // Вестник Оренбургского государственного университета.- № 4 (153).- 2013.- С. 66-70. (из списка ВАК).
4. Диковская, М.А., Трунов, А.Н., Короленко, Т.А. Эндогенные ингибиторы цистеиновых протеаз цистатин С и цистатин SN у пациентов с внутриглазной меланомой / М.А.Диковская // Сборник тезисов всероссийской конференции «Протеолитические ферменты: структура, функции, эволюция». Петрозаводск.- 2014. – С. 42.
5. Короленко, Т.А., Гашенко, Е.А., Лебедева, В.А., Диковская М.А. Проформы цистеиновых протеаз и эндогенные ингибиторы – цистатины – как возможные биомаркеры опухолей человека / Т.А.Короленко // Сборник тезисов всероссийской конференции: «Протеолитические ферменты: структура, функции, эволюция». Петрозаводск.- 2014.- С. 51.
6. Диковская, М.А., Трунов, А.Н., Кулешова, О.Н., Локтев, К.В., Черных, В.В., Афтанас, Л.И., Короленко, Т.А. Исследование цистатина С и цистатина SN в биологических жидкостях как возможных маркеров внутриглазных новообразований / М.А.Диковская // Бюллетень СО РАМН. - 2014-Т. 34, № 3.- С. 13-17. (из списка ВАК).
7. Korolenko T., Dikovskaya M., Trunov A. Cystatin C and Lactoferrin Concentrations in Biological Fluids as Possible Prognostic Factors in Eye Tumor Development / T. Korolenko // 15th International Congress on Circumpolar Health. - Fairbanks, AK, USA. - 2012. – P. 26.
8. Dikovskaya M, Trunov A, Chernykh V, Korolenko T. Cystatin C and lactoferrin concentrations in biological fluids as possible prognostic factors in eye tumor development / M Dikovskaya // Int. J. Circumpolar Health. -2013. – 72.- P.284-289.
9. Dikovskaya M, Korolenko T, Trunov A. Endogenous inhibitors of cysteine proteases cystatin C and cystatin SN in biological fluids of patients with intraocular melanoma as possible biomarkers and therapy targets / M Dikovskaya // European Journal of Cancer Supplements, Volume 13, Issue 1, November 2015, Pages 13-14.

### Список используемых сокращений

ВГЖ – внутриглазная жидкость

ВМД – возрастная макулодистрофия

дВМД – дисциформная макулодистрофия

ГА – глазничная артерия

ЦАС – центральная артерия сетчатки

ИФА – иммуноферментный анализ

ОКТ – оптическая когерентная томография

УЗИ- ультразвуковое исследование

УМ – увеальная меланома

ФАГД – флюоресцентная ангиография глазного дна

ЦДК - цветное доплеровское картирование

Соискатель

Диковская М.А.

Выходные данные согласно действующему ГОСТу