УДК 616. 351+616-006. 66+577. 115+615. 849. 1

Голотюк В. В.

ОКИСНЮВАЛЬНА ТРАНСФОРМАЦІЯ МАКРОМОЛЕКУЛЯРНИХ СТРУКТУР ПІД ВПЛИВОМ ПРОМЕНЕВОЇ ТЕРАПІЇ У ХВОРИХ НА РАК ПРЯМОЇ КИШКИ

ДВНЗ «Івано-Франківський національний медичний університет»

(м. Івано-Франківськ)

Запропоноване дослідження є фрагментом комплексної науково-дослідної роботи курсу онкології Івано-Франківського національного медичного університету «Вивчення ефективності неоад'ювантної поліхіміотерапії та променевої терапії в комплексному лікуванні раку органів травлення, дихання, репродуктивної системи», № держ. реєстрації 0112U005125.

Вступ. Процеси окиснювальної трансформації макромолекул в організмі людини є фізіологічними [14]. В основному вони зумовлені впливом активних форм кисню та оксиду азоту, які постійно синтезуються в ході аеробного метаболізму, функціонування сигнальних шляхів та перебігу імунологічних реакцій. Їх продукти в певних концентраціях завжди реєструють в сироватці крові, проте за умов дії на організм патологічних факторів та стресових чинників відбувається лавиноподібна активація вільнорадикальних процесів, яку розцінюють як один з найбільш універсальних механізмів захисної реакції [4, 12, 14]. Натомість встановлено, що в умовах онкологічної патології, подальше збільшення їх концентрації за умов функціональної недостатності засобів антиоксидантного захисту перетворюється на пошкоджуючий фактор для життєвоважливих органів та організму в цілому, формуючи патофізіологічну основу для розвитку клінічних проявів захворювання [10, 14]. При цьому вторинні продукти вільнорадикальних реакцій, які виявляють в крові, є як фактором, що зумовлює певний ступінь ЕІ, так і тестом, який може охарактеризувати цей ступінь [7, 8, 12].

Під час променевої терапії (ПТ), яка на сьогоднішній день є провідним компонентом комбінованого лікування хворих на рак прямої кишки (РПК), нерідко виникають ускладнення внаслідок загострення хронічних захворювань, розвитку системних і місцевих променевих реакцій, наростання проявів інтоксикації, які, як припускають, можуть бути клінічними проявами розвитку у хворих декомпенсованого вільнорадикального стресу на системному рівні. У зв'язку з погіршенням загального стану 7-15% хворих, які отримують неоад'ювантні курси дистанційної гаматерапії, підлягають достроковому припиненню ПТ, не отримавши при цьому оптимальної терапевтичної дози радіації [9, 13]. Для вдосконалення методів лікування РПК, прогнозування його ефективності і попередження розвитку небажаних побічних ефектів актуальним є комплексне вивчення різних типів вільнорадикальних реакцій, які інтенсифікуються під час ПТ і супроводжуються окисною модифікацією макромолекулярних біоструктур, що формують біомембрани, ферментні системи і регулюють функціонування генетичного апарату [6, 7, 10, 12].

Метою дослідження було вивчити системні параметри окиснювальної модифікації білків і ліпідів у хворих з РПК на етапах неоад'ювантного курсу ПТ.

Об'єкт і методи дослідження. Для аналізу біохімічних показників були отримані проби крові від 43 хворих (20 чоловіків і 23 жінки, середній вік 57±8,5 років) з гістологічно верифікованим діагнозом аденокарциноми прямої кишки II-III стадії (T2-4N0-2M0) які перебували на лікуванні у відділенні пухлин шлунково-кишкового тракту Івано-Франківського обласного клінічного онкологічного диспансеру. На першому етапі лікування пацієнти отримували передопераційний курс дистанційної гама-терапії на ділянку пухлини до сумарної вогнищевої дози 39 Гр (разова вогнищева доза – 3 Гр, 13 сеансів упродовж 2,5 тижнів, 5 сеансів на тиждень) без застосування радіомодифікаторів. Критеріями виключення хворих при проведенні дослідження були: вік більше 80 років; первинно-множинний характер пухлинного ураження; загальний важкий стан хворих при поступленні, зумовлений наявністю супутніх соматичних захворювань в стадії декомпенсації; прийом вітамінів-антиоксидантів хворими за місяць до початку і під час проведення досліджень. В якості контролю був здійснений забір матеріалу в групі з 15-ти умовно здорових людей з аналогічною до хворих основної групи статево-віковою структурою. Дослідження виконували у відповідності до принципів проведення біомедичних досліджень за участю людей, викладеними в Гельсінській декларації Всесвітньої медичної асоціації. Пацієнти надали письмову інформовану згоду на участь у дослідженні.

Інтенсивність процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) в сироватці крові вивчали за рівнем утворення малонового диальдегіду (МДА) згідно методики Е. Н. Коробейникової [5] та дієнових кон'югатів (ДК) за методикою В. Б. Гаврилова [1]. Окиснювальну модифікацію білків оцінювали за методом R. L. Levine в модифікації Е. Е. Дубініної [3, Таблиця

Показники ПОЛ сироватки крові у хворих на рак прямої кишки

Показники		Контроль (n=15)	До лікування	Сеанси гама-терапії		
				1	7-8	13
Токсичність 0-I ст. (n=32)	МДА (мкмоль/л)	3,12±0,27	4,21±0,4	5,35±0,34*	6,45±0,40°*	6,51±0,33°*
	ДК (ум. од.)	0,34±0,03	0,48±0,04*	0,65±0,04°*	0,86±0,03°*	0,91±0,07°*
Токсичність II ст. (n=11)	МДА (мкмоль/л)	3,12±0,27	4,25±0,33*	5,39±0,30*	6,85±0,42°*	7,72±0,29°*
	ДК (ум. од.)	0,34±0,03	0,46±0,03*	0,71±0,05°*	1,15±0,11°*	0,86±0,05°*

Примітка: *- достовірність різниці показника порівняно з контролем; ° достовірність різниці показників до- і під час променевої терапії.

4] після осадження нуклеїнових кислот 10%-м розчином стрептоміцину сульфату. Оптичну щільність альдегід-динітрофенілгідразонів і кетон-динітрофенілгідразонів реєстрували на спектрофотометрі при довжинах хвиль відповідно: 356, 430 нм та 370, 530 нм [3]. Статистичну обробку отриманих даних проводили із застосуванням методів варіаційної статистики з визначенням середніх величин (M), оцінкою вірогідності розходжень (m), оцінкою достовірності відмінності середніх значень із застосуванням t-критерію Стьюдента. За достовірну вважали різницю середніх значень при $p<0,05$.

Результати досліджень та їх обговорення. Згідно отриманих даних, активність процесів ПОЛ в сироватці крові у хворих на РПК була підвищеною порівняно з контрольною групою вже до початку лікувальних заходів, в тому числі у пацієнтів з пухлинами невеликих розмірів, протяжністю до 5 см без наявності метастазів ($T_2N_0M_0$). На момент госпіталізації рівні ДК і МДА перевищували нормальні показники на 34-39%. Вміст первинних і вторинних продуктів ПОЛ в крові позитивно корелював зі збільшенням тривалості анамнезу захворювання, стадією захворювання і розмірами пухлини незалежно від віку і статі хворих. Після першого сеансу дистанційної гама-терапії вміст МДА і ДК в крові суттєво збільшувався у всіх обстежених хворих, в середньому відповідно до 5,36±0,35 мкмоль/л і 0,67±0,05 ум. од, без достовірної різниці в підгрупах хворих з 0-I та II ступенями токсичності ПТ за шкалою ВООЗ. В подальшому, із збільшенням сумарної дози опромінення в підгрупі хворих з мінімальною токсичністю концентрація МДА і ДК в крові зростала упродовж перших 7-8 сеансів, після чого стабілізувалась без суттєвих коливань до кінця лікування. Динаміка зазначених маркерів у підгрупі хворих з токсичністю ПТ II ступеня була дещо іншою: рівень МДА поступово зростав упродовж усього курсу лікування, перевищуючи після 13 сеансу ПТ вихідний рівень в 1,8 разу, а вміст ДК, сягаючи максимуму 1,15±0,11 ум. од. через 7-8 сеансів, в подальшому знижувався до 0,86±0,05 ум. од. **(табл.).**

Збільшення інтенсивності процесів ПОЛ у хворих з РПК на фоні ПТ є свідченням вільнорадикальної агресії на фоні неспроможності фізіологічних систем антиоксидантного захисту. Продукти тривалої активації ПОЛ пошкоджують мембрани органел, в яких вони формуються, зумовлюючи таким чином появу нових токсинів. Зростання інтенсивності ПОЛ згубно впливає на мікросомальну систему детоксикації, викликає пошкодження мембран гладкого ендоплазматичного ретикулуму і мітохондрій в соматичних клітинах, в результаті чого порушуються просторові співвідношення локалізованих там ферментних систем [4, 14]. Тенденція до зниження концентрації первинних продуктів ПОЛ (дієнових кон'югатів) на фоні збільшення рівня токсичності ПТ та погіршання клінічної картини захворювання свідчить про глибокі деструктивні процеси в біологічних мембранах. Вона може бути наслідком виснаження субстратів ПОЛ – поліненасичених жирних кислот, що входять до складу клітинних мембран, а також результатом розвитку деструктивних процесів в функціональних структурах енергетичного обміну.

В результаті вивчення маркерів окисної модифікації білків в сироватці крові встановлено, що вже через добу після першого сеансу ПТ у всіх хворих на РПК відмічалось посилення екстинції 2,4-динітрофенілгідразонів при всіх довжинах хвиль в 1,5-2,8 разу порівняно з показниками до лікування ($p<0,05$). Упродовж перших сеансів ПТ в крові хворих переважали альдегід-динітрофенілгідразони, які вважають маркерами фрагментації білків [2, 6]. Той факт, що в модифікованих групах білків виявлено переважання альдегідних форм над вмістом кетон-динітрофенілгідразонів свідчить про те, що на ранніх етапах ПТ явища окисного стресу на системному рівні не переходять в розвинену стадію і носять оборотний характер. Також слід зазначити, що високий рівень альдегідних форм характеризує інтенсифікацію процесу деструкції білків з утворенням низькомолекулярних фрагментів. Починаючи з 7-8 сеансу ПТ у пацієнтів з мінімальним рівнем токсичності терапії і з 5-6 сеансу – у хворих із токсичністю II ступеня рівень 2,4-динітрофенілгідразонів продовжував зростати аж до моменту завершення лікування, проте це відбувалося на фоні відносного переважання кетондинітрофенілгідразонів, які є маркерами агрегації білків на пізніх етапах окиснювальної деструкції білкових макромолекул [6].

Важливо, що клітини не мають достатньо ефективної системи засобів ферментативного захисту проти білкових пероксидів, оскільки з-поміж великого переліку ендогенних антиоксидантів лише тіолові групи і аскорбінова кислота мають здатність нейтралізувати ці сполуки [11]. Повільні елімінація і знешкодження продуктів оксидного пошкодження білків в результаті окиснювального стресу зумовлюють суттєве значення останніх у виникненні клітинної дисфункції [2, 6, 11, 12].

Висновки. Отримані нами дані свідчать, що ПТ хворих на РПК окрім безпосереднього антибластомного впливу на пухлинне вогнище супроводжується розвитком системного оксидативного стресу із вторинним ураженням макромолекулярних структур, які складають основу біологічних мембран, забезпечують функціонування генетичного апарату та ферментних систем. Однією з основних причин проявів токсичності ПТ у хворих з РПК є спотворення і блокування метаболічних процесів, які виникають внаслідок дії так званих «ракових токсинів» і бурхливого всмоктування в системний кровоплин продуктів розпаду пухлини під впливом застосованої антибластомної терапії. Останні, поряд з впливом іонізуючого випромінювання, яке має здатність безпосередньо здійснювати радіоліз молекул води в тканинах, провокують розвиток і прогресування самопідсилюючого оксидативного стресу. Характер і ступінь виявлених нами біохімічних порушень відповідають проявам токсичності ПТ, що свідчить про їх безпосередній внесок у формування клінічної симптоматики і необхідність в ряді випадків вибору патогенетично-обґрунтованих медикаментозних засобів для їх корекції.

Перспективи подальших досліджень. Останнім часом з'явились публікації, які свідчать, що окремі параметри вільнорадикального стресу, зокрема інформацію про динаміку маркерів окиснювальної трансформації ДНК можна використовувати з метою оцінки лікувального ефекту ПТ і прогнозування її ефективності. Дослідження в цьому напрямку є перспективними і ляжуть в основу наших подальших публікацій.

Література

1. Гаврилов В. Б. Измерение диеновых конъюгатов в плазме крови по УФ-поглощению гептановых и изопропанольных экстрактов / В. Б. Гаврилов, А. Р. Гаврилова, Н. Ф. Хмара // Лабораторное дело. – 1988. – №2. – С. 60-63.
2. Губский Ю. И. Токсикологические последствия окислительной модификации белков при различных патологических состояниях / Ю. И. Губский, И. Ф. Беленичев, Е. Л. Левицкий [и др.] // Сучасні проблеми токсикології. – 2005. – Т. 8, №3. – С. 20-27.
3. Дубинина Е. Е. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека. Метод её определения / Е. Е. Дубинина, С. О. Бурмистров, Д. А. Ходов, И. Г. Поротов // Вопросы мед. химии. – 1995. – Т. 41, №1. – С. 24-26.
4. Дубинина Е. Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток / Е. Е. Дубинина. – СПб.: Медицинская пресса, 2006. – 400 с.
5. Коробейникова Э. Н. Модификация определения продуктов перекисного окисления липидов в реакции с тиобарбитуровой кислотой / Э. Н. Коробейникова // Лабораторное дело. – 1988. – №7. – С. 8-9.
6. Cai Z. Protein Oxidative Modifications: Beneficial Roles in Disease and Health / Z. Cai, L. -J. Yan // J. Biochem. Pharmacol. Res. – 2013. – Vol. 1, №1. – P. 15-26.
7. Davies M. J. Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences / M. J. Davies // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2003. – Vol. 305, №3. – P. 761-770.
8. Dean R. T. Free radical damage to proteins: the influence of the relative localization of radical generation, antioxidants, and target proteins / R. T. Dean, J. V. Hunt, A. J. Grant [et al.] // Free Rad. Biol. Med. – 1991. – Vol. 11, №12. – P. 161-165.
9. Hohenberger W. Neoadjuvant radiochemotherapy for rectal cancer / W. Hohenberger, G. Lahmer, R. Fietkau [et al.] // Chirurg. – 2009. – Vol. 80, №4. – P. 294-302.
10. Leufkens A. M. Biomarkers of oxidative stress and risk of developing colorectal cancer: a cohort-nested case-control study in the European prospective investigation into cancer and nutrition / A. M. Leufkens, F. J. van Duijnhoven, S. H. Woudt [et al.] // Am. J. Epidemiol. – 2012. – Vol. 175, №7. – P. 653–663.
11. Morgan P. E. Protective mechanisms against peptide and protein peroxides generated by singlet oxygen / P. E. Morgan, R. T. Dean, M. J. Davies // Free Radic Biol Med. – 2004. – Vol. 36, №4. – P. 484-496.
12. Rahmanto A. S. Cellular effects of peptide and protein hydroperoxides // A. S. Rahmanto, P. E. Morgan, C. L. Hawkins [et al.] // Free Radic. Biol. Med. – 2010. – Vol. 48, №8. – P. 1071-1078.
13. Rцdel C. Treatment of rectal cancer / C. Rцdel, H. P. Bruch, R. Hofheinz [et al.] // Onkologie. – 2010. – Vol. 33, Suppl. 4. – P. 19-23.
14. Valko M. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease / M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncola [et al.] // The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. – 2007. – Vol. 39. – P. 44–84.

УДК 616. 351+616-006. 66+577. 115+615. 849. 1

ОКИСНЮВАЛЬНА ТРАНСФОРМАЦІЯ МАКРОМОЛЕКУЛЯРНИХ СТРУКТУР ПІД ВПЛИВОМ ПРОМЕНЕВОЇ ТЕРАПІЇ У ХВОРИХ НА РАК ПРЯМОЇ КИШКИ

Голотюк В. В.

Резюме. Аналіз маркерів вільнорадикального стресу в крові 43 хворих на рак прямої кишки II-III стадій показав їх суттєве збільшення в динаміці неоад'ювантного курсу променевої терапії (ПТ). Рівні малонового діальдегіду і дієнових кон'югатів були найбільшими в підгрупі хворих з II ступенем токсичності ПТ, перевищуючи вихідний показник відповідно в 1,8 та 2,5 разу. Концентрація альдегід-динітрофенілгідразонів, які є показником фрагментації білків, переважала під час перших сеансів ПТ, в подальшому спостерігали відносне переважання кетонових форм – маркерів агрегації білків. Показники окисної модифікації макромолекул в цілому корелювали з важкістю проявів захворювання і ускладнень ПТ, що вказує на їх діагностичну цінність і безпосередній внесок у формування клінічної симптоматики раку прямої кишки.

Ключові слова: рак прямої кишки, неоад'ювантна променева терапія, окиснювальний стрес, перекисне окиснення ліпідів, окиснювальна модифікація білків.

УДК 616. 351+616-006. 66+577. 115+615. 849. 1

ОКИСЛИТЕЛЬНАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СТРУКТУР ПОД ВЛИЯНИЕМ ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ БОЛЬНЫХ РАКОМ ПРЯМОЙ КИШКИ

Голотюк В. В.

Резюме. Анализ маркеров свободнорадикального стресса в крови 43 больных раком прямой кишки II-III стадий показал их существенное увеличение в динамике неоадъювантного курса лучевой терапии (ЛТ). Уровни малонового диальдегида и диеновых конъюгатов были наиболее высокими в подгруппе больных с II степенью токсичности ЛТ, превышая исходный показатель соответственно в 1,8 и 2,5 раза. Концентрация альдегид-динитрофенилгидразонов, которые являются показателем фрагментации белков, преобладала во время первых сеансов ЛТ, в дальнейшем наблюдали относительное преобладание кетоновых форм – маркеров агрегации белков. Показатели окислительной модификации макромолекул в целом коррелировали с тяжестью проявлений заболевания и осложнений ЛТ, что указывает на их диагностическую ценность и непосредственный вклад в формирование клинической симптоматики рака прямой кишки.

Ключевые слова: рак прямой кишки, неоадъювантная лучевая терапия, окислительный стресс, перекисное окисление липидов, окислительная модификация белков.

UDC 616. 351+616-006. 66+577. 115+615. 849. 1

Oxidative Transformation of Macromolecular Structures during the Radiotherapy for Rectal Cancer

Golotyuk V. V.

Abstract. The aim of the study was to examine the system parameters of proteins and lipids oxidative modifications in patients with rectal cancer during the course of neoadjuvant radiotherapy.

Blood serum samples for biochemical parameters analysis the were obtained from 43 patients (20 men and 23 women, mean age 57±8,5 years) with histologically verified diagnosis of rectum adenocarcinoma II-III stage (T2-4N0-2M0). All patients were treated at the department of the gastrointestinal tract tumors in Ivano-Frankivsk Regional Clinical Oncology Center.

During the first phase of treatment, patients underwent preoperative course of distant gamma-therapy for the tumor to a total focal dose of 39 Gy (single focal dose – 3 Gy, 13 sessions over 2. 5 weeks, 5 sessions per week) without the using of radiomodification.

According to our data, the activity of lipid peroxidation processes in the serum of patients with rectal cancer before the beginning of radiotherapy was increased compared with the control group of healthy people, including in patients with small size tumors (length of less than 5 centimeters) and without the presence of metastasis (T2N0M0). At the time of hospitalization malondialdehyde and diene conjugates levels exceeded normal levels at 34-39%.

Content of primary and secondary products of lipid peroxidation in blood positively correlated with the duration of disease history, disease stage and tumor size, regardless of age and sex of patients. After the first session of gamma-therapy malondialdehyde and diene conjugates levels increased significantly in all patients, with an average under 5.36±0.35 mmol/l and 0.67±0.05 c. u., with no significant difference between the subgroups of patients with 0, I-st and the II-nd degree of radiotherapy according to WHO scale.

Analysis of free radical stress markers in the serum showed a significant increase of their concentration during the neoadjuvant radiotherapy course. The levels of malondialdehyde and diene conjugates were highest in the subgroup of patients with II degree of radiotherapy toxicity, exceeding benchmarks respectively 1. 8 and 2. 5 times. The concentration of aldehyde-dynitrofenilhydrazones, which are the markers of the proteins fragmentation prevailed during the first radiotherapy sessions and relative predominance of ketone forms – markers of protein aggregation was observed later. The level of macromolecules oxidative damage indicators in general correlated with the severity of disease manifestations and radiotherapy complications, indicating their diagnostic value and direct contribution to the formation of rectal cancer clinical symptoms.

Our data suggest that besides direct effects on tumor site radiotherapy causes the development of systemic oxidative stress with secondary lesions of macromolecular structures that form the basis of biological membranes, genetic apparatus and enzyme systems. The nature and extent of biochemical violations which we have identified correspond to radiotherapy toxicity level, indicating their direct contribution to the formation of clinical symptoms and the necessity of their correction with the usage of pathogenesis-based drugs in some cases.

Keywords: rectal cancer, neoadjuvant radiotherapy, oxidative stress, lipid peroxidation, protein oxidative modifications.

Рецензент – проф. Баштан В. П.

Стаття надійшла 10. 06. 2014 р.