

ОСОБЛИВОСТІ ДИНАМІКИ МЕТАБОЛІТІВ ОКИСНИХ МОДИФІКАЦІЙ БІЛКІВ ПРИ ЛІКУВАННІ ХВОРИХ НА РАК ПРЯМОЇ КИШКИ

В. В. Голотюк, М. В. Петришин

*Івано-Франківський національний медичний університет;
76018, м. Івано-Франківськ, вул. Галицька, 2*

Метою дослідження є вивчення динаміки маркерів окислювальної модифікації білків (ОМБ) у хворих на рак прямої кишки (РПК) як індикаторів променевого пошкодження тканин. Обстежено 61 хворого на рак прямої кишки (РПК), яких відповідно до схеми неоад'ювантної терапії було розподілено на 3 групи. Хворим I групи проводили променеву терапію (ПТ), через 4-6 тижнів після якої робили радикальну операцію; хворим II групи під час ПТ здійснювали радіомодифікацію тегафуром; хворим III групи під час ПТ здійснювали полірадіомодифікацію тегафуром та препаратом L-аргініну. Аналіз маркерів ОМБ, у якості яких використали карбонільні похідні білків, показав, що у хворих на РПК рівень продуктів окисної модифікації білків достовірно підвищений у порівнянні зі здоровими донорами, при цьому характерним є відносно переважання альдегідних форм продуктів ОМБ. Встановлено вплив вікового фактору та розмірів пухлини на інтенсивність процесів ОМБ у хворих на РПК. Виявлено зміни показників ОМБ у різних груп хворих у динаміці лікування, які доводять важливість ОМБ, як одного з ранніх та інформативних індикаторів променевого пошкодження тканин, і вказують на доцільність подальшого вивчення особливостей формування продуктів окислювальної модифікації білків у клінічних дослідженнях хворих на РПК.

Ключові слова: окислювальна модифікація білків, рак прямої кишки, променева терапія, спектрофотометрія.

Постановка проблеми та аналіз останніх досліджень.

Рання оцінка променевого і хіміопроменевого пошкодження ракової тканини під час лікування може дозволити значно покращити та індивідуалізувати терапію у хворих на РПК. Продукти ОМБ потенційно можуть стати маркерами для аналізу лікування у таких хворих. Ріст пухлини супроводжується змінами показників окислювального стресу в раковій тканині. Активні форми кисню здатні викликати переокислення не лише ліпідних молекул біомембран та ядерного хроматину, а й окислювальну модифікацію білків [1, 5]. Складаючи близько 68% від сухої маси клітин і тканин, білки потенційно є однією з найбільших мішеней для оксидативного пошкодження [5]. Також доведено, що в стані окис-

лювального стресу активні форми кисню атакують, в першу чергу, білки [7]. Встановлено, що окислювальна модифікація молекул білків має пряме відношення до механізмів токсичної загибелі клітини, а самі продукти ОМБ, як і продукти ПОЛ, володіють цитопатичною дією [6]. Окрім того, показники ОМБ вважають одним із найбільш ранніх і стабільних (мають тривалий період розпаду) маркерів ураження різних тканин організму в умовах вільно-радикальної патології [2].

Мета дослідження – вивчити динаміку маркерів ОМБ у хворих на РПК як індикаторів променевого пошкодження тканин.

Матеріал і методи дослідження. Досліджено взірці крові 61 хворого (середній вік $61,8 \pm 1,1$ року) з діагнозом раку прямої кишки II-III стадій, які перебували на лікуванні в Івано-Франківському обласному клінічному онкологічному диспансері. В усіх пацієнтів була верифікована аденокарцинома різного ступеня диференціювання.

В залежності від виду доопераційної терапії проведено розподіл хворих на групи: I група – 18 пацієнтів, що отримали курс неоад'ювантної променевої терапії (НПТ) на ділянку пухлини без застосування радіомодифікаторів (20 сеансів фракціями по 2-2,5 Гр до сумарної дози 38-40 Гр) з наступним хірургічним лікуванням через 4-6 тижнів; 22 хворих II групи на фоні аналогічного курсу НПТ отримували хеморадіомодифікацію тегафуром з розрахунку 800 мг на добу за 2 прийоми per os (зранку та ввечері), хворим масою до 70 кг або 1200 мг за 3 прийоми, хворим масою більше 70 кг щодня упродовж курсу НПТ. 21-му пацієнтові III групи окрім тегафуру як компонент полірадіомодифікації під час неоад'ювантної хіміопроменевої терапії (НХПТ) доведено інфузійно за 1 год до сеансу опромінення вводили препарат L-аргініну в дозі 100 мл (4,2 г аргініну гідрохлориду).

Окислювальну модифікацію білків оцінювали до початку і в динаміці лікування хворих за методом R.L. Levine в модифікації Е.Е. Дубініної [7] після осадження нуклеїнових кислот 10%-м розчином стрептоміцину сульфату. Оптичну щільність 2,4-динітрофенілгідразонів у сироватці крові (альдегід-динітрофенілгідразонів і кетон-динітрофенілгідразонів) реєстрували на спектрофотометрі при довжинах хвиль відповідно: 356, 430 нм та 370, 530 нм. Контролем слугували показники 15 практично здорових людей (7 чоловіків, 8 жінок віком 50-58 років).

Статистичний аналіз проводили з використанням прикладної програми Origin 7.0. Різницю між показниками вважали достовірною при $p < 0,05$.

Результати дослідження та їх обговорення. Встановлено, що рівень продуктів ОМБ у хворих на РПК до початку лікування достовірно вищий порівняно зі здоровими донорами. Характерним для хворих на РПК є відносне переважання первинних (альдегідних) форм продуктів ОМБ, які перевищували показник донорів у 1,4-1,5 рази порівняно з ке-

тон-динітрофенілгідрозонами, рівень яких перевищував контрольний в 1,1-1,3 рази (табл. 1).

Таблиця 1. Показники окислювальної модифікації білків у донорів і хворих на РПК

	Карбонільні похідні білків, (од.опт.щ. на 1 мл).			
	$\lambda=356$ нм	$\lambda=430$ нм	$\lambda=370$ нм	$\lambda=530$ нм
	M±m	M±m	M±m	M±m
Умовно-здорові донори (n=15)	0,80±0,09	0,41±0,02	0,79±0,07	0,13±0,02
Хворі на РПК (n=61)	1,17±0,05 P=0,001	0,53±0,03 P=0,006	1,09±0,05 P=0,001	0,15±0,01 P=0,346

Примітка: P – достовірність різниці показників у порівнянні з донорами

Гендерних відмінностей стосовно рівня відповідних маркерів у хворих на РПК не було виявлено (табл. 2). Не зареєстровано також взаємозв'язку між інтенсивністю процесів ОМБ та формою росту, ступенем диференціювання, глибиною інвазії РПК, станом регіонарних лімфовузлів і явищами стенозування прямої кишки. Натомість, встановлено вплив вікового фактору на інтенсивність процесів ОМБ у хворих на РПК. Це проявлялося підвищенням концентрації карбонільних похідних у крові пацієнтів у віковій групі старших 60-ти років. Виявлено залежність рівня маркерів ОМБ від розмірів пухлини. Зокрема, при великих новоутвореннях довжиною більше 5 см статистично-значимо в 1,3-1,4 рази зростала екстинція нейтральних кетон- і альдегід-динітрофенілгідрозонів у порівнянні з пухлинами менших розмірів.

Вже через добу після першого сеансу ПТ у хворих I групи інтенсифікувалось утворення карбонільних похідних в 1,3-2,4 рази порівняно з показниками до лікування (рис. 1). Упродовж перших сеансів ПТ, включно до 7-8 дня лікування, у крові пацієнтів динаміка росту більшою мірою стосувалась альдегід-динітрофенілгідрозонів, які вважають маркерами фрагментації білків [2]. Це свідчить, що на ранніх етапах НПТ процес оксидного стресу на системному рівні не переходить у розвинену стадію і є зворотнім, а також може вказувати на інтенсифікацію процесу деструкції білків з утворенням низькомолекулярних фрагментів та олігопептидів. У подальшому (до моменту завершення НПТ) екстинція 2,4-динітрофенілгідрозонів продовжувала зростати, проте це відбувалося, в основному, за рахунок кетон-динітрофенілгідрозонів, які є маркерами агрегації білків на пізніх етапах окислювальної деструкції білкових макромолекул. Після 4-6 тижневої перерви на етапі перед оперативним втручанням абсолютні рівні маркерів ОМБ знижувались. При цьому екстинція кислих кетон- і альдегід-динітрофенілгідрозонів (відповід-

но при $\lambda=356$ і 370 нм) достовірно не відрізнялась від вихідного рівня показників до лікування, а рівень нейтральних карбонільних похідних ($\lambda=356$ і 370 нм) на цьому етапі залишався достовірно підвищеним.

Таблиця 2. Показники окислювальної модифікації білків у залежності від клініко-патологічних характеристик хворих на РПК

Фактор	Карбонільні похідні білків, (од.опт.щ. на 1 мл).			
	$\lambda=356$ нм	$\lambda=430$ нм	$\lambda=370$ нм	$\lambda=530$ нм
	M \pm m	M \pm m	M \pm m	M \pm m
Стать: Чоловіки (n=31) Жінки (n=30)	1,21 \pm 0,07 1,12 \pm 0,07 P=0,931	0,53 \pm 0,05 0,52 \pm 0,05 P=0,826	1,12 \pm 0,07 1,06 \pm 0,07 P=0,942	0,15 \pm 0,02 0,15 \pm 0,01 P=0,634
Вікова група: ≤ 60 р (n=26) >60 р(n=35)	0,98 \pm 0,05 1,27 \pm 0,06 P=0,002	0,42 \pm 0,01 0,59 \pm 0,04 P=0,001	0,90 \pm 0,03 1,19 \pm 0,06 P=0,0003	0,13 \pm 0,02 0,16 \pm 0,01 P=0,127
Форма росту: екзофітна (n=27) Змішана і ендофітна (n=34)	1,07 \pm 0,07 1,23 \pm 0,07 P=0,127	0,51 \pm 0,05 0,54 \pm 0,04 P=0,673	1,02 \pm 0,07 1,14 \pm 0,07 P=0,221	0,16 \pm 0,02 0,15 \pm 0,01 P=0,621
Ступінь диференціювання: G ₁₋₂ (n=41) G ₃ (n=20)	1,14 \pm 0,05 1,30 \pm 0,19 P=0,412	0,52 \pm 0,04 0,54 \pm 0,08 P=0,828	1,07 \pm 0,05 1,20 \pm 0,16 P=0,454	0,15 \pm 0,01 0,16 \pm 0,04 P=0,696
Глибина інвазії: T ₁₋₂ (n=26) T ₃₋₄ (n=35)	1,15 \pm 0,10 1,18 \pm 0,06 P=0,831	0,49 \pm 0,05 0,55 \pm 0,04 P=0,338	1,06 \pm 0,09 1,11 \pm 0,06 P=0,629	0,14 \pm 0,02 0,16 \pm 0,01 P=0,309
Довжина пухлини: ≤ 5 см(n=28) >5 см(n=33)	0,99 \pm 0,04 1,30 \pm 0,07 P=0,001	0,42 \pm 0,01 0,60 \pm 0,05 P=0,0013	0,91 \pm 0,03 1,22 \pm 0,07 P=0,0002	0,13 \pm 0,02 0,17 \pm 0,01 P=0,103
Стан регіонарних лімфовузлів: N ₀ (n=37) N ₁₋₂ (n=24)	1,19 \pm 0,06 1,12 \pm 0,10 P=0,571	0,52 \pm 0,04 0,55 \pm 0,07 P=0,694	1,10 \pm 0,06 1,06 \pm 0,10 P=0,731	0,15 \pm 0,01 0,17 \pm 0,02 P=0,379
Стенозування кишки: є (n=32) немає (n=29)	1,15 \pm 0,09 1,18 \pm 0,06 P=0,799	0,48 \pm 0,03 0,57 \pm 0,05 P=0,160	1,05 \pm 0,08 1,12 \pm 0,07 P=0,491	0,15 \pm 0,02 0,15 \pm 0,01 P=0,921

Примітка: P – достовірність різниці середніх показників парних факторів

У хворих II групи спостерігали подібну динаміку росту в крові продуктів окисного ушкодження білкових молекул, проте абсолютні значення показників ОМБ у відповідні терміни НПТ були недостовірно вищими в 1,1-1,3 рази, ніж у попередній групі (рис. 2). На відміну від I групи хворих, після курсу ХПТ на етапі перед оперативним втручанням, концентрація карбонільних похідних у крові при всіх хвилях достовірно перевищувала вихідний рівень до початку лікування. На нашу думку, це є свідченням накопичення в новоутворах модифікованих форм білків на фоні деструктивних змін і виснаження резервно-адаптаційних можливостей пухлинних клітин у зоні опромінення з поступовим «вимиванням» їх в системний кровоплин.

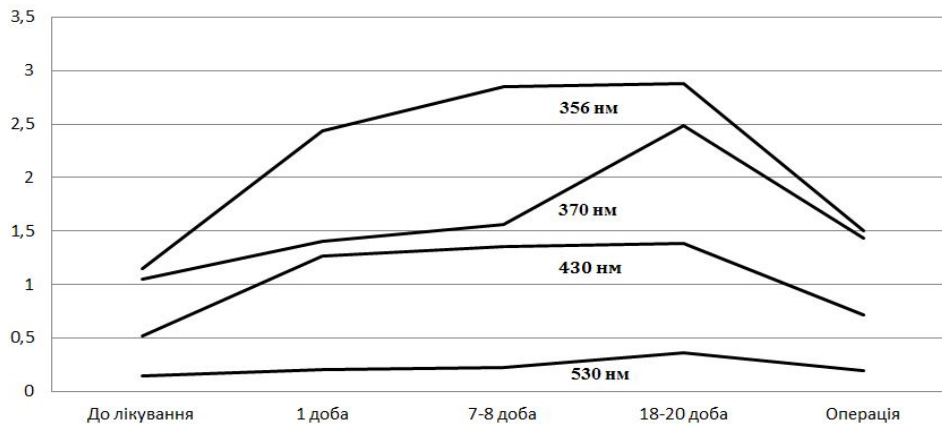


Рис. 1. Динаміка показників окислювальної модифікації білків у хворих на РПК I групи на різні терміни лікування (од.опт.щ./мл)

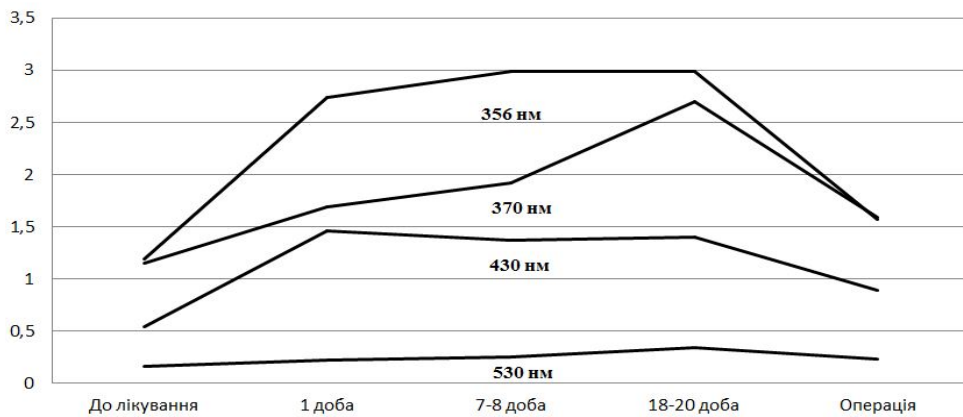


Рис.2. Динаміка показників окислювальної модифікації білків у хворих на РПК III групи на різні терміни лікування (од.опт.щ./мл)

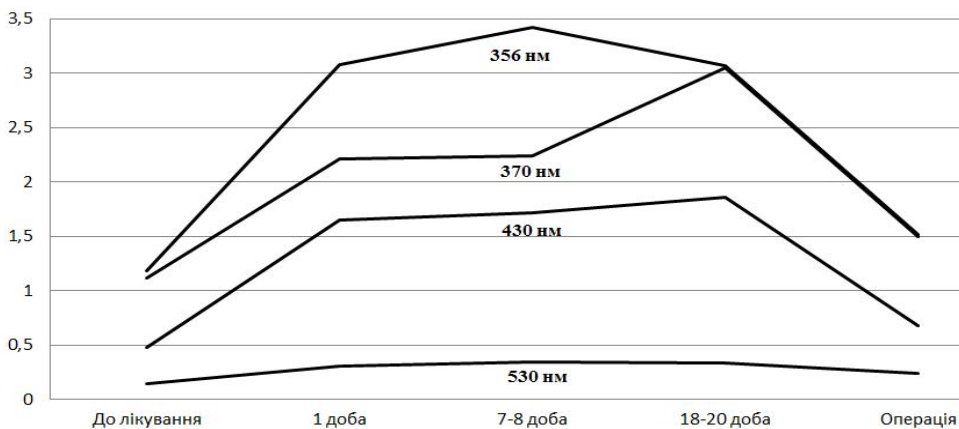


Рис. 3. Динаміка показників окислювальної модифікації білків у хворих на РПК III групи на різні терміни лікування (од.опт.щ./мл)

У хворих на РПК III дослідної групи упродовж курсу НХПТ виявлено найвищий, порівняно з іншими групами, рівень маркерів ОМБ, які достовірно перевищували відповідні показники до лікування (рис. 3). Відносне зростання екстинції карбонільних похідних у хворих III групи під час лікування можна трактувати як наслідок інтенсифікації окисних модифікацій білкових структур пухлини під впливом опромінення. Водночас слід врахувати, що L-аргінін, який вводили хворим у якості компонента полірадіомодифікації, поряд з проліном, лізином та треоніном є одним з основних донаторів амінокислотних залишків, з яких утворюються карбонільові похідні в ході карбонільювання аргініну. Така реакція супроводжується формуванням аддуктів Міхаеля і втратою аргініном одного чи більше атомів азоту [4]. Після 4-5 тижневої перерви рівень альдегід- та кетон-динітрофенілгідрозонів у крові хворих III групи знижувався, проте достовірно перевищував показник до лікування.

Таким чином, ОМБ є одним з ранніх та інформативних індикаторів променевого пошкодження тканин, що обґрунтовує вивчення динаміки формування продуктів окислювальної модифікації білків у клінічних дослідженнях хворих на РПК.

Висновки.

1. У хворих на РПК рівень продуктів ОМБ підвищується з відносним переважанням їх первинних (альдегідних) форм.

2. Виявлено залежність показників інтенсивності ОМБ від віку хворих на РПК та розмірів пухлин.

3. Встановлено особливості динаміки альдегід- та кетон-динітрофенілгідрозонів у крові хворих на РПК в динаміці їх неoad'ювантного лікування, які дозволяють виділити їх як один із ранніх та інформативних індикаторів променевого та хіміопреневого пошкодження тканин новоутвору.

Література

1. 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.
2. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека. Метод её определения / Е.Е. Дубинина, С.О. Бурмистров, Д.А. Ходов, И.Г. Поротов // Вопросы мед. химии. – Т. 41, № 1. – 1995. – С. 24-26.
3. Муравлева Л.Е. Окислительная модификация белков: проблемы и перспективы исследования // Фундаментальные исследования. – 2010. – № 1. – С. 74-78.
4. Davies M.J. Singleoxygen-mediated damage to proteins and its consequences / M.J. Davies // BiochemBiophysResCommun. – 2003. – Vol. 305, N. 3. – P. 761-70.

5. ZhiyouCaia Protein Oxidative Modifications: Beneficial Roles in Disease and Health / Zhiyou Caia and Liang-Jun Yanb// J Biochem Pharmacol Res. 2013 March; 1(1): 15-26.
6. 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, N. 8. – P. 1071-1078.
7. 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.

*Стаття надійшла до редакційної колегії 21.12.2016 р.
Рекомендовано до друку д.м.н., професором Поповичем Ю.І.,
д.м.н., професором Волошиним О.І. (м. Чернівці)*

FEATURES OF PROTEIN OXIDATIVE MODIFICATION METABOLITES DYNAMICS IN THE RECTAL CANCER TREATMENT

V. V. Golotyuk, M. V. Petryshyn

*Ivano-Frankivsk National Medical University
76018, Ivano-Frankivsk, Galitska str.,2*

The aim of research was to examine the dynamics of protein oxidative modification markers in patients with rectal cancer as indicators of radiation tissue damage. The study involved 61 patients with rectal cancer, which were divided into 3 groups according to the scheme of neoadjuvant therapy. Patients of group I received radiotherapy and radical surgery was conducted in a 4-6 weeks after, patients of group II – got radiomodification by Tegarafur, and patients of the group III – polyradiomodification using Tegarafur and L-arginine during radiotherapy. Analysing protein carbonyl derivatives levels that were used as markers of protein oxidative modification (POM), it was found that the products of POM in a patients with rectal cancer are significantly increased in comparison with the conditionally healthy donors, herewith the relative prevalence of primary (aldehyde) forms of the POM is representative. It was studied that there is no connection of marker's levels with patient's sex and clinical features of tumor, excluding its size. Also influence of age factor on the intensity of POM was founded. The study showed changes of POM indices in a groups of patients in the different periods of treatment. This proves the importance of the POM as one of the earliest and informative indicators of radiation tissue damage and feasibility of study of POM products formation in clinical trials of patients with rectal cancer.

Key words: *protein oxidative modification, rectal cancer, radiation therapy, spectrophotometry.*