

УДК 577.1

**СТАН ПРОЦЕСІВ ПОЛ І ФУНКЦІОНУВАННЯ СИСТЕМИ АНТИОКСИДАНТНОГО
ЗАХИСТУ У ЩУРІВ З КАРЦИНОМОЮ ГЕРЕНА ЗА УМОВ ЛОКАЛЬНОГО
РЕНТГЕНІВСЬКОГО ОПРОМІНЕННЯ І ЗАСТОСУВАННЯ АНТИОКСИДАНТІВ**

Раєцька Я.Б., Остапченко Л.І., Дробінська О.В.

*Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
біологічний факультет, e-mail: raetska@ua.ru*

Надійшла до редакції 04.02.2008

Стаття присвячена дослідженню особливостей процесів вільнорадикального окиснення ліпідів за умов зляксісного росту карциноми Герена і променевої терапії, а також вивченню дії антиоксидантних препаратів природного походження на ці процеси з метою корекції променевого впливу за допомогою лікувально-профілактичних засобів.

На підставі проведених досліджень встановлено, що опромінення призводить до змін значень пероксидного окиснення ліпідів за умов зляксісного росту. Показано, що введення лікувальних препаратів із властивостями антиоксидантів сприяє нормалізації процесів пероксидації та стану сигнальних систем у клітинах за рахунок підсилення ефективності застосованої радіотерапії. На цій підставі антиоксидантні препарати можуть бути запропоновані з метою профілактики та комплексного лікування зляксісних новоутворень.

Ключові слова: перекисне окиснення, антиоксидантна система, карцинома Герена, рентгенівське опромінення.

ВСТУП

Зляксісні пухлини розвиваються на фоні перебудови нейрогуморального й метаболічного статусу організму [2,12]. Характер і спрямованість зляксісного процесу в значній мірі визначаються станом реактивності організму. Процеси вільнорадикального окиснення ліпідів займають важливе місце при розвитку пухлини [2,6]. Проходження реакцій вільнорадикального окиснення в ліпідному субстраті сприяє утворенню різноманітних продуктів ПОЛ, які здатні гальмувати проліферативну активність клітин. Зниження концентрації вільних радикалів призводить до прискорення клітинного поділу. Значну роль у регуляції ПОЛ відіграють інгібітори вільнорадикальних реакцій — антиоксиданти. Високий рівень антиоксидантів у тканинах пухлини сприяє їх проліферативній активності. В умовах зляксісного росту пухлина інтенсивно накопичує біоантиоксиданти з крові, забезпечуючи тим самим умови для подальшої пухлинної прогресії і росту. При цьому ресурси фізіологічної антиоксидантної системи (ФАОС) виснажуються, протипухлинна реактивність організму знижується, що є передумовою подальшого пухлинного росту.

Вищевикладене дає підстави вважати, що показники ПОЛ і активності антиоксидантних систем (АО-систем) захисту дають важливу інформацію про перебіг зляксісного процесу й важкість стану організму-пухлиноносія [7,8].

Для лікування онкологічних захворювань поряд із хіміотерапією сьогодні широко застосовується радіотерапія, що базується на ефекті некротичної та апоптичної загибелі пухлинних клітин при дії іонізуючого випромінювання [10, 13]. Проте опромінювання може призводити до стимуляції процесів ліпопероксидації, в результаті чого уражаються не тільки здорові органи, а й знижується протипухлинна резистентність організму, що збільшує ризик утворення метастазів і виникнення рецидивів.

Застосування препаратів з антиоксидантною активністю здатне нормалізувати стан фізіологічної антиоксидантної системи і підвищити здатність організму протистояти пухлинному процесові [6,11], що було досліджено в наших попередніх роботах. Нашою лабораторією були проведенні експерименти по вивченні антистресового й протипроменевого ефекту препаратів ActiVin™ та Русnogenol™, отримані дані дозволяють віднести їх до вказаного вище типу біологічно-активних препаратів [16].

У зв'язку з викладеним вище, нами було заплановано вивчити вплив антиоксидантів природного походження (ActiVin, Pycnogenol) на біохімічні механізми, які є залученими до протипухлинних захисних реакцій організму. Оскільки ключову роль у таких процесах відіграє система антиоксидантного захисту, ми дослідили ефекти вищевказаних препаратів на показники ПОЛ.

Метою нашої роботи було оцінити стан системи ПОЛ у тканинах, пухлині й плазмі крові щурів із карциномою Герена після локального рентгенівського опромінення пухлини у терапевтичній дозі, і перорального введення антиоксидантів природного походження.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

В дослідях використовували білих лабораторних щурів-самців масою 130 ± 10 г, (розведення віварію УНДІОР), яких утримували на стандартному раціоні віварію. Тваринам трансплантували карциному Герена шляхом підшкірної ін'єкції у ділянку стегна задньої кінцівки 20%-ної суспензії пухлинних клітин на 0,9%-му розчині NaCl, отриманих від щура-донора [1,2].

Частині тварин щоденно, протягом 7-ми діб після прищеплення пухлини і до локального опромінення перорально вводили антиоксидантні препарати ActiVin™ („InterHealth Nutritionals Incorporated”, Concord, США) в дозі 25 мг/кг маси, Pycnogenol™ („Zepter”, Group, США) у дозі 25 мг/кг маси тварин [17]. Досліджувані препарати – антиоксиданти рослинного походження.

При дослідженні ПОЛ пухлину на 8-му добу після прищеплення піддавали локальному рентгенівському опроміненню в терапевтичних дозах на апараті РУМ-17 за таких умов: напруга – 180 кВ, сила струму – 10 мА, фільтри – 0,5 мм Cu +1,0 мм Al, потужність дози – 123 Р/хв, шкірно-фокусна відстань – 25 см. Тварин декапітували через 1, 3 та 7 діб після локального опромінення.

У плазмі крові та тканинах досліджували вміст продуктів перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) — так званих тіобарбітуроактивних продуктів (ТБК) [2], активність каталази (КФ 1.11.1.6) [18] і супероксиддисмутази (КФ 1.15.1.1) [4], досліджували вміст відновленого глутатіону [3].

Отримані результати статистично обробляли із застосуванням критерію Стьюдента. Зміни показників вважали достовірними при $p < 0,05$; при $p > 0,05$ зміни враховували як тенденцію [5].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Останнім часом лікування злоякісних новоутворень ґрунтується на індивідуальному

підході щодо вибору заходів. Радіотерапія залишається одним із головних методів лікування злоякісних новоутворень, поряд із хірургічним і хіміотерапевтичним лікуванням. Проте променева терапія призводить до стресового стану в організмі, який проявляється, зокрема, у пригніченні захисних протипухлинних реакцій. Тому доцільно застосовувати радіозахисні препарати, у тому числі антиоксидантів, що здатні стимулювати адаптаційні механізми, підвищуючи загальну радіорезистентність організму.

Було досліджено ключові компоненти ПОЛ та активність антиоксидантних ферментів у клітинах головного мозку, печінки, селезінки, тимусу, пухлини та у плазмі крові щурів у різні терміни після опромінення пухлини в дозі 25 Гр. Значне зростання інтенсивності ПОЛ у тканинах головного мозку, печінки, селезінки й крові щурів спостерігалось безпосередньо після локального опромінення пухлини (таблиця 1). Отже, на початковому етапі злоякісний процес викликає закономірне підвищення вмісту ТБК-активних продуктів ПОЛ при злоякісному рості. В останні терміни досліджень відбувалося значне зниження ТБК-активних продуктів у пухлині, органах і плазмі крові. Досить високий рівень ТБК-активних продуктів у пухлині, який був виявлений нами на 15 хв після локального рентгенівського опромінення, на 7-му добу знижувався у 3,7 рази. Зниження рівня ТБК-активних продуктів ПОЛ в органах і крові щурів може бути викликане зменшенням вмісту ліпідів та інших його субстратів, внаслідок їх утилізації пухлиною, що росте.

Було встановлено, що в пухлинній тканині опромінення викликає істотне підсилення ліпопероксидації, що є проявом деструктивної дії антиоксидантних ферментів та променевої терапії.

Активність СОД та каталази знижувалась особливо у віддалені терміни після дії радіації (таблиця 2).

Отримані дані свідчать про те, що механізми антиоксидантного захисту спрямовані на знешкодження продуктів перекисного окиснення в умовах пухлинного процесу. Можна припустити, що зростання активності ферментів антиоксидантної системи, яке співпадає з періодом підвищеної інтенсивності ПОЛ, відбувається завдяки вмиканню адаптивно-компенсаторних механізмів захисту та підтримання фізіологічного гомеостазу щурів.

Дослідження вмісту відновленого глутатіону в тканинах органів і сироватці крові щурів з карциномою Герена показало, що розвиток пухлини супроводжується зниженням його рівня у порівнянні з інтактними тваринами. Як видно з таблиці 3 тенденція зниження вмісту відновленого глутатіону у щурів з карциномою Герена порушується,

Таблиця 1

Вміст ТБК-активних продуктів (нмоль/мг білка) у селезінці та пухлині щурів із карциномою Герена після локального рентгенівського опромінення пухлини і перорального введення антиоксидантів ($M \pm m$; $n=6$)

№ п/п	Групи тварин, умови досліджу	Термін досліджень після локального рентгенівського опромінення			
		15 хв	1 доба	3 доби	7 діб
Селезінка					
1	Інтактні щури	77,9±1,3			
2	КГ (контроль)	576,0±7,4*	286,5±4,2*	267,3±2,8*	213,3±2*
3	КГ + ЛРО	318,9±5,6*	273,7±3,9	231,8±4,3	142,6±2*
4	КГ + Ас + ЛРО	207,8±4,8*	146,9±2,9*	113,1±2,2*	57,71±1,3*
5	КГ + Рс + ЛРО	237,1±3,4*	257,7±4,2*	261,8±3,4*	79,14±1,18
Пухлина					
1	КГ (контроль)	169,2±3,4	148,4±2,3	69,0±1,1	46,1±3,3
2	КГ + ЛРО	200,5±3,5	329,5±4,1	101,84±1,9	216,2±3,4
3	КГ + Ас + ЛРО	176,4±3,25	139,6±2,74	87,94±1,07	229,07±4,5
4	КГ + Рс + ЛРО	154,97±3,6	213,7±2,52	69,24±1,45	209,82±2,5

Примітки (тут і далі): * - вірогідні зміни порівняно з інтактними тваринами ($p < 0,05$); КГ - карцинома Герена; ЛРО - локальне рентгенівське опромінення; Ас — ActiVin; Рс — Русnogenol

Таблиця 2

Активність супероксиддисмути (ум. од./мг білка) та каталази (нмоль/хв·мг білка) в селезінці та пухлині щурів з карциномою Герена після локального рентгенівського опромінення пухлини і перорального введення антиоксидантів ($M \pm m$; $n=6$)

№ п/п	Групи тварин, умови досліджу	Термін досліджень після локального рентгенівського опромінення			
		15 хв	1 доба	3 доби	7 діб
Активність супероксиддисмути					
Селезінка					
1	Інтактні щури	1,20±0,01			
2	КГ (контроль)	0,55±0,2*	0,62±0,02*	0,9±0,02*	0,54±0,1*
3	КГ + ЛРО	0,47±0,1*	0,51±0,01*	0,89±0,1*	0,38±0,1*
4	КГ + Ас + ЛРО	0,24±0,01*	0,86±0,06*	0,52±0,04*	1,54±0,1*
5	КГ + Рс + ЛРО	0,54±0,03	0,64±0,05	1,25±0,01*	1,21±0,03
Пухлина					
1	КГ (контроль)	0,48±0,1	0,51±0,02	1,4±0,04	0,83±0,1
2	КГ + ЛРО	1,01±0,2	0,94±0,05	1,1±0,02	0,80±0,1
3	КГ + Ас + ЛРО	0,92±0,04	0,73±0,02	0,8±0,07	1,20±0,03
4	КГ + Рс + ЛРО	0,53±0,02	2,12±0,09	0,57±0,02	0,64±0,02
Активність каталази					
Селезінка					
1	Інтактні щури	174,27±2,81			
2	КГ (контроль)	77,1±1*	154,5±2,5*	83,1±2,4*	35,01±1*
3	КГ + ЛРО	94,2±0,9*	124,6±3,7*	64,1±1,1*	43,34±1*
4	КГ + Ас + ЛРО	110,4±4,8*	207,9±3,8*	122,1±1,1*	170,8±1*
5	КГ + Рс + ЛРО	113,1±2,2*	187,9±2,9*	160,1±2,1*	176,1±2*
Пухлина					
1	КГ (контроль)	141,3±2,7	188,64±3,8	76,6±2,4	53,2±2,1
2	КГ + ЛРО	121,77±1,9	151,31±3,8	70,9±1,7	35,1±2,1
3	КГ + Ас + ЛРО	134,7±3,65	131,1±3,13	86,49±2,14	64,85±0,9
4	КГ + Рс + ЛРО	178,9±3,04	193,3±4,06	63,96±2,15	45,23±1,9

Таблиця 3

Вміст відновленого глутатіону (мкмоль/г тканини) в органах щурів із карциномою Герена після локального рентгенівського опромінення пухлини і перорального введення антиоксидантів (M ± m; n=6)

№ п/п	Групи тварин, умови досліду	Термін досліджень після локального рентгенівського опромінення			
		15 хв	1 доба	3 доби	7 діб
Головний мозок					
1	КГ	95,14±4,99*			
2	КГ + ЛРО	90,73±4,24*	121,78±4,29*	80,76±1,94*	54,07±1,81*
3	КГ + Ас	105,23±9,75*	144,35±3,17*	108,84±5,36*	87,25±3,44*
4	КГ+ Ас + ЛРО	96,13±9,18*	139,76±3,38*	100,25±2,94*	86,39±3,24*
5	КГ + Рс	100,84±5,74*	136,96±4,41*	101,75±4,74*	77,53±3,76*
Пухлина					
1	КГ	273,93±17,71*	314,72±18,53*	287,37±10,13*	213,28±11,32*
2	КГ + ЛРО	238,06±9,38*	224,62±15,13*	266,54±13,53*	239,07±13,48*
3	КГ + Ас	298,31±13,22*	321,82±18,02*	298,56±15,77*	227,58±12,57*
4	КГ+ Ас + ЛРО	256,35±15,49*	244,27±18,91*	308,24±14,96*	243,64±11,28*

що проявляється тимчасовим зростанням на 9-ту добу після прищеплення пухлини. При цьому рівень вмісту відновленого глутатіону достовірно не відрізняється від контролю. Зростання вмісту відновленого глутатіону на 9-ту добу після прищеплення пухлини співпадає з загальною картиною підвищення показників окислювально-відновного гомеостазу, таких як процеси ПОЛ і активність антиоксидантних ферментів (СОД, каталаза), що пояснюється впливом захисних і компенсаторних реакцій організму. Це доводить, що у відповідь на канцерогенний вплив пухлини на певному етапі спрацьовують загальні для всього організму захисні механізми підтримання біохімічного гомеостазу. У цьому процесі можуть бути задіяні всі резерви організму, і тому від цього короточасного спалаху метаболічної активності залежить рівень і напрямок розвитку патологічних зрушень в організмі при злоякісному рості пухлини.

Між пухлиною і організмом-хазяїном відбуваються складні взаємостосунки, що призводять до зниження захисних реакцій організму, у тому числі до зниження вмісту відновленого глутатіону. Активні канцерогени пухлини досить легко вступають у біохімічні реакції з сульфгідрильними групами, порушуючи процеси біохімічного обміну і антиоксидантного захисту організму.

Опромінення, як додатковий канцерогенний фактор, ініціює вільнорадикальні процеси, і тим самим створює додаткові умови для окислення сульфгідрильних груп. Тому після локального рентгенівського опромінення пухлини у тканинах головного мозку, печінки, селезінки, пухлини і сироватці крові спостерігається зниження вмісту відновленого глутатіону. Зменшення його вмісту у тканинах, що не межують з пухлиною, викликане

надходженням канцерогенів через систему кровообігу [14,15].

Отже, радіотерапія на певному етапі динаміки розвитку пухлин приводить до нормалізації біохімічних показників клітинного метаболізму. Кількісні зміни вмісту циклічних нуклеотидів, а також активності ферментів їх синтезу й гідролізу й тих, що каталізують завершені етапи проходження сигналів, засвідчують участь регуляторних систем у формуванні адаптаційних реакцій на пошкоджуючий вплив злоякісного росту та радіації.

Відомо, що променева терапія призводить до порушення структури мембранних ліпідів, що виявляється у дисбалансі ПОЛ [2,12]. Оскільки радіація є пошкоджуючим фактором для організму, доцільно застосувати радіозахисні препарати із властивостями антиоксидантів, які були б здатні підвищувати загальну радіорезистентність організму та стимулювати адаптаційні механізми.

У зв'язку з викладеним вище нами було вивчено вплив антиоксидантів природного походження (ActiVin, Русногенол) на біохімічні механізми, що залучені до протипухлинних захисних реакцій організму.

Застосування препаратів ActiVin та Русногенол знижувало патологічно високий рівень ТБК-активних продуктів за умов опромінення у клітинах досліджуваних органів. Антиоксидантні препарати ActiVin та Русногенол пригнічували радіоіндуковане зростання рівня ТБК-продуктів у пухлині та здорових органах щурів, як показано в таблиці 1, тому було доцільним вивчити їх вплив на активність СОД та каталази – ферментів антиоксидантної системи за умов опромінення.

Введення піддослідним тваринам антиоксидантів викликало підвищення активності обох ферментів, що спостерігалось у тканинах головного мозку, печінки, селезінки, пухлини й крові через 1 добу після опромінення. Отже, досліджувані препарати покращували стан як здорових органів, що проявлялося у підвищенні активності антиоксидантних ферментів (таблиця 2).

Пероральне введення антиоксидантів на початкових етапах росту пухлини призводить до незначного підвищення вмісту відновленого глутатіону у тканинах органів, пухлині і сироватці крові у щурів з пухлиною і локальним її опроміненням (таблиця 3). Рівень активних сульфгідрильних сполук в цілому, і відновленого глутатіону зокрема, у тканинах організму і пухлині свідчить про їх здатність протистояти патологічним процесам і опроміненню.

ВИСНОВКИ

Отримані результати дозволили зробити висновок про те, що біологічно-активні речовини, які представляють собою препарати рослинного походження характеризуються антистресовою та протипроменевою дією.

Установлено, що введення антиоксидантів нормалізує процеси ПОЛ та підсилює ефективність радіотерапії пухлин шляхом корекції інших досліджуваних нами значень. Основою для такого висновку є те, що опромінення у терапевтичних дозах приводило до часткової нормалізації системи ПОЛ. Таким чином, біологічно-активні речовини можуть бути запропоновані з метою профілактики та комплексного лікування злоякісних новоутворень.

Література

1. *Западнюк И.П., Западнюк Б.В., Захария Е.А. и др.* Лабораторные животные: разведение, содержание, использование в эксперименте - К.: Вища шк.- 1983. - 383 с.
2. *Барабой В.А., Орел В.Э., Карнаух И.М.* Перекисное окисление и радиация. К.: Наук. думка.- 1991.- 256 с.
3. *Прохорова М.И.* Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен). Л.: Изд-во Ленингр. ун-та.-1982. -181 с.
4. *Чевари М., Чаба И., Сеней И.* // Лаб. Дело - 1985.- №11. -С. 678-684.
5. *Иванов Ю.И., Погорелюк О.М.* Статистическая обработка результатов медико-биологических исследований на микрокалькуляторах за программами. М.: Медицина. - 1990.- 224 с.
6. *Rowell NP and Williams CJ* // Radical radiotherapy for stage I/II non-small cell lung cancer in patients not sufficiently fit for or declining surgery (medically inoperable): a systematic review // Thorax.- 2001.- V.56.- P. 628–638
7. *Timmerman RD et al.* Stereotactic body radiation therapy in multiple organ sites // J Clin Oncol.- 2007.- V.25.- P. 947–952
8. *Timmerman R et al.* //Excessive toxicity when treating central tumors in a phase II study of stereotactic body radiation therapy for medically inoperable early-stage lung cancer./ J Clin Oncol. – 2006.- V.24.-P. 4833–4839
9. *Fay M et al.* Dose-volume histogram analysis as predictor of radiation pneumonitis in primary lung cancer patients treated with radiotherapy // Int J Radiat Oncol Biol Phys. – 2005.-V.61.- P. 1355–1363
10. *Onishi H et al.* Stereotactic hypofractionated high-dose irradiation for stage I nonsmall cell lung carcinoma: clinical outcomes in 245 subjects in a Japanese multiinstitutional study // Cancer. – 2004.- V.101.- P. 1623–1631
11. *Nyman J et al.* Stereotactic hypofractionated radiotherapy for stage I non-small cell lung cancer—mature results for medically inoperable patients // Lung Cancer. –2006.- V.51.- P. 97–103
12. *Van Den Brenk HA et al.* //Radiosensitivity of the human oxygenated cervical spinal cord based on analysis of 357 cases receiving 4 MeV X rays in hyperbaric oxygen // Br J Radiol. – 1968.- V.41.- P. 205–214
13. *Stoll B and Andrews J* Radiation-induced peripheral neuropathy //Br Med J. – 1966.- V.1.- P. 834–837
14. *Haffty BG et al.* Carcinoma of the larynx treated with hypofractionated radiation and hyperbaric oxygen: long-term tumor control and complications./ Int J Radiat Oncol Biol Phys. - 1999. - V. 45. - P.13–20.
15. Non-Small Cell Lung Cancer Collaborative Group Chemotherapy in non-small cell lung cancer: a meta-analysis using updated data on individual patients from 52 randomised clinical trials // Br Med. J. - 1995- V.311. - P. 899–909.
16. *Raetska Ya.B., Belokon U.N., Baraboy V.A., Ostapchenko L.I.* Correction of oxidant-antioxidant homeostasis in rats with Geren carcinoma in radiotherapy // Фізика живого. – 2003. - Vol. 11, №1.- С. 89-94.
17. *Золотарева Н.Н., Романенко Е.В., Соколов В.Е. и др.* Регуляция активности ферментов // Доклады Академии наук. – 1998. – Т.361, №2 – С. 272-274.
18. *Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Т., Токарев В.Е.* // Лаб. дело.- 1988.- № 1.- С. 16-19.

СОСТОЯНИЕ ПРОЦЕССОВ ПОЛ И ФУНКЦИОНАЛЬНОСТЬ СИСТЕМЫ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ У КРЫС С КАРЦИНОМОЮ ГЕРЕНА ПРИ УСЛОВИЯХ ЛОКАЛЬНОГО РЕНТГЕНОВСКОГО ОБЛУЧЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИИ АНТИОКСИДАНТОВ

Раевская Я. Б., Остапченко Л.И., Дробинская Л. В.

Статья посвящена исследованиям особенностям процессов свободнорадикального окисления липидов в условиях злокачественного роста карциномы Герена и лучевой терапии, а также изучению действия препаратов природного происхождения на эти процессы с целью коррекции лучевых повреждений с помощью лечебно-профилактических средств. На основании проведенных исследований было установлено, что облучение приводит к изменениям показателей пероксидного окисления липидов при злокачественном росте. Было показано, что введение лечебных препаратов с антиоксидантными свойствами нормализует процессы пероксидации усиливая эффективность радиотерапии. На этом основании антиоксидантные препараты могут быть предложены для профилактики и комплексного лечения злокачественных новообразований.

Ключевые слова: карцинома Герена, свободно-радикальное окисление, антиоксиданты.

PEROXIDATION PROCESSES AND ANTIOXIDANT PROTECTION SYSTEM IN RAT WITH GEREN CARCINOMA UNDER LOCAL X-RAY IRRADIATION AND ANTIOXIDANT APPLICATION

RaetskaYa. B., Ostapchenko L.I., Drobinska O.V.

The peroxidation processes and its correction by natural antioxidative preparations treatment were studied in rat tissues under cancerous growth conditions. Influence of therapeutic doses of x-rays on cell methabolic processes in tumor and organs was established. The irradiation weakened there peroxidation processes and activated antioxidative enzymes. Positive effect of complex therapy including irradiatich and natural antioxidatsve preparations these biochemical indexes has been established. It was established that administration of antioxidants normalizes the lipid peroxidation processes and enhances the radiotherapy effectiveness. Antioxidant preparations are proposed for prophylactic and complex treatment of malignant process.

Key words: Geren carcinoma, radiotherapy, free-radical lipid oxidation processes, antioxidant preparations.
