

КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© Коллектив авторов, 1998
УДК 616.329.18.73:612.015.6(575-772)

*В. А. Драудин-Крыленко, Ю. В. Букин, А. А. Левчук,
М. Я. Курцман, Ю. П. Кувшинов, Б. К. Поддубный,
М. А. Шабанов*

АКТИВНОСТЬ ОРНИТИНДЕКАРБОКСИЛАЗЫ И ДИНАМИКА РЕГРЕССИИ РАННИХ ПРЕДОПУ- ХОЛЕВЫХ ИЗМЕНЕНИЙ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧ- КИ ЖЕЛУДКА У ЧЕЛОВЕКА ПРИ НАЗНАЧЕНИИ ВИТАМИНА Е И ЕГО ОТМЕНЕ

*НИИ канцерогенеза
и НИИ клинической онкологии*

Метаплазия тонкокишечного типа (ТКМ) является ранним предопухолевым изменением слизистой оболочки желудка человека, предшествующим формированию аденокарциномы желудка [10, 12]. По нашим данным, при ТКМ активность фермента орнитиндекарбоксилазы (ОДК) повышена по сравнению с нормой в среднем в 8 раз [6]. Индивидуальные отклонения активности ОДК от нормы достигают при ТКМ 10—12-кратных значений. Как известно, в норме ОДК, катализируя первую лимитирующую стадию процесса биосинтеза полиаминов, контролирует процесс клеточной пролиферации [3, 22]. Однако при суперэкспрессии ген ОДК проявляет свойства онкогена. Суперэкспрессия ОДК в культуре клеток, трансфицированных ДНК гена ОДК человека, вызывает трансформацию нормальных клеток, которые утрачивают контактное торможение и при перевивке животным образуют опухоли [15, 18]. Подавление суперэкспрессии ОДК необратимым ингибитором фермента α -диформетилорнитином (ДФМО) вызывает *in vitro* обратимое превращение трансформированных клеток в нормальные [16]. Суперэкспрессия ОДК *in vivo* играет специфическую роль на стадии промоции канцерогенеза; показано, что подавление в эксперименте на стадии промоции аномально высокой активности ОДК путем торможения фермента ДФМО предотвращает развитие опухолей [13, 23, 24]. Однако в клинических условиях длительное использование ДФМО в целях химиопрофилактики рака резко ограничено, поскольку время полужизни ОДК составляет не более 20 мин, и ингибитор для проявления его воздействия на фермент необходимо вводить в организм с очень короткими интервалами. В связи с этим в наших исследованиях мы изучили иные возможные подходы к регуляции аномаль-

CLINICAL INVESTIGATIONS

*V.A.Draudin-Krylenko, Yu.V.Bukin, A.A.Levchuk,
M.Ya.Kurtsman, Yu.P.Kuvshinov, B.K.Poddubny,
M.A.Shabanov*

CHANGES IN ORNITHINE DECARBOXYLASE ACTIVITY AND REGRESSION OF EARLY PRENEOPLASTIC GASTRIC MUCOSAL LESIONS IN MAN AFTER VITAMIN E ADMINISTRATION AND WITHDRAWAL

*Research Institute of Carcinogenesis, Research Institute
of Clinical Oncology*

Small intestinal metaplasia (SIM) is an early preneoplastic lesion of human gastric mucosa preceding development of gastric adenocarcinoma [10,12]. There is evidence of a 8-fold increase in activity of enzyme ornithine decarboxylase (ODC) in SIM as compared to normal [6]. Individual values of ODC activity in SIM may demonstrate a 10-12-fold difference from the normal level. As known, ODC normally controls cell proliferation by catalysis of the first limiting stage of polyamine biosynthesis [3,22]. However, superexpressed ODC gene demonstrates oncogenic features. ODC superexpression in cell culture transfected by human ODC gene induces transformation of normal cells which lose contact inhibition and produce tumors after transplantation to animals [15,18]. Inhibition of ODC superexpression by the enzyme irreversible inhibitor α -difluoromethylornithine (DFMO) leads to reversible conversion of the transformed cells into normal state *in vitro* [16]. ODC superexpression *in vivo* plays a specific role in carcinogenesis promotion stage; it is experimentally demonstrated that inhibition of abnormal ODC activity by DFMO at the promotion stage prevents tumor development [13,23,24]. However, clinical application of DFMO is limited since ODC half-life is not more than 20 min and the inhibitor should be administered at very small intervals. In view of the above-said we attempted other approaches to regulation of abnormally high ODC activity in preneoplastic gastric mucosal lesions, in particular by using natural antioxidants. We demonstrated in a previous study that long-term administration of β -carotene at a daily dose 20 mg resulted in a considerable inhibition of gastric mucosal ODC superexpression in SIM patients [5] and SIM gradual regression approximately in 50% of cases [7,8].

но высокой активности ОДК при предопухолевых состояниях слизистой оболочки желудка и использовали для этой цели природные антиоксиданты. Ранее мы нашли, что β -каротин в ежедневной дозе 20 мг вызывает при длительном назначении больным с ТКМ существенное подавление в слизистой оболочке желудка суперэкспрессии ОДК [5], что сопровождается постепенной регрессией ТКМ приблизительно в 50% случаев [7, 8]. Различные формы витамина Е в относительно низких дозах (dl- α -токоферилацетат в ежедневной дозе 50 МЕ и dl- α -токоферол в той же дозе) вызывали при назначении больным лишь незначительное снижение аномально высокой активности ОДК, однако высокие дозы природного витамина Е (400 МЕ в день) резко подавляли суперэкспрессию фермента [7, 8]. Ниже представлены результаты, полученные нами при изучении динамики снижения активности ОДК в слизистой оболочке желудка больных с ТКМ при назначении высоких доз витамина Е и его отмене. Динамика активности ОДК сопоставлена с динамикой регрессии ТКМ. Предварительные результаты этого исследования были кратко сообщены ранее [1, 9].

Материалы и методы. В исследование было включено 36 больных с хроническим атрофическим гастритом (ХАГ), сопровождающимся ТКМ; у 5 больных ТКМ сочеталась с секторальной метаплазией толстокишечного типа. У 25 из 36 больных наличия в слизистой желудка *H. pylori* обнаружено не было, а 11 больных, инфицированных *H. pylori*, были успешно излечены от инфекции с использованием стандартной химиотерапии (де нол + метронидазол + тетрациклин) [21]. Больные с ТКМ были отобраны из 155 пациентов с заболеваниями желудочно-кишечного тракта, которые обследовались в ОНЦ РАМН или в кабинете гастроскопии в медсанчасти № 5 Тулы. Все больные, включенные в интервенционное исследование, были осведомлены о целях работы и дали согласие на участие в исследовании.

При начальном обследовании 155 пациентам проводили гастроскопию, гистологический анализ 2 биоптатов, взятых из антрального отдела желудка, определяли возможную инфицированность *H. pylori* в 1 или 2 биоптатах 1-минутным уреазным экспресс-методом [2]. Наличие ТКМ было обнаружено у 51 больного. Трое больных с ТКМ были исключены из исследования из-за наличия других хронических заболеваний, лечения гормональными препаратами и алкоголизма. Из 23 больных, у которых была выявлена инфицированность *H. pylori*, 11 больных были успешно излечены от этой инфекции, что было подтверждено 1-минутным уреазным тестом и гистологическим анализом биоптатов, полученных через 3 нед после окончания лечения.

На схеме представлен план интервенционного исследования. 36 больных с ТКМ были разделены на 2 рандомизированные группы по 18 больных в каждой. Больные 1-й группы (средний возраст $54,2 \pm 8,6$ года; 11 мужчин в возрасте 35–72 лет и 7 женщин в возрасте 40–68 лет) получали ежедневно 1 капсулу (400 МЕ) натурального витамина Е (All Natural Pure E, «Vital Life Products», «Klaire Laboratories International», Сан-Маркос, США), содержащего 70% d- α -токоферола и около 30% смеси d- β -, d- γ - и d- δ -токоферолов, выделенных из соевого масла. Больные 2-й (контрольной) группы (средний возраст $56,3 \pm 7,9$ года; 13 мужчин в возрасте 45–70 лет и 5 женщин в возрасте 36–69 лет) получали ежедневно в качестве плацебо 1 капсулу с очищенным соевым маслом.

Двое больных из 1-й группы отказались от повторных обследований через 6 и 12 мес, ссылаясь на хорошее самочувствие, а двое больных из этой же группы прекратили прием витамина Е из-за усилившегося рефлюкса желчи, что, по-видимому, было следствием повышенной перистальтики кишечника под влиянием высоких доз витамина. Только 14 больных 1-й группы и 16 больных 2-й группы были полностью обследованы в течение годового курса лечения.

Капсулы, содержащие витамин Е или плацебо, выдавали больным в зашифрованном виде. Ни врачи, ни больные осведомлены о характере препарата не были. Образцы плазмы крови и биопсийный материал, предназначенный для гистологического исследования, также были

Various vitamin E formulations at rather low dosage (dl- α -tocopheryl acetate at a daily dose 50 IU and dl- α -tocopherol at the same dose) caused but a slight decrease in the abnormally high ODC, while high doses of natural vitamin E (400 IU daily) markedly inhibited superexpression of the enzyme [7,8]. Below are presented our findings in a study of gastric mucosal changes in ODC activity in SIM patients after high-dose vitamin E therapy and after its discontinuation. Rates of changes in ODC activity were compared with rates of SIM regression. Interim results of this study were reported elsewhere [1,8,9].

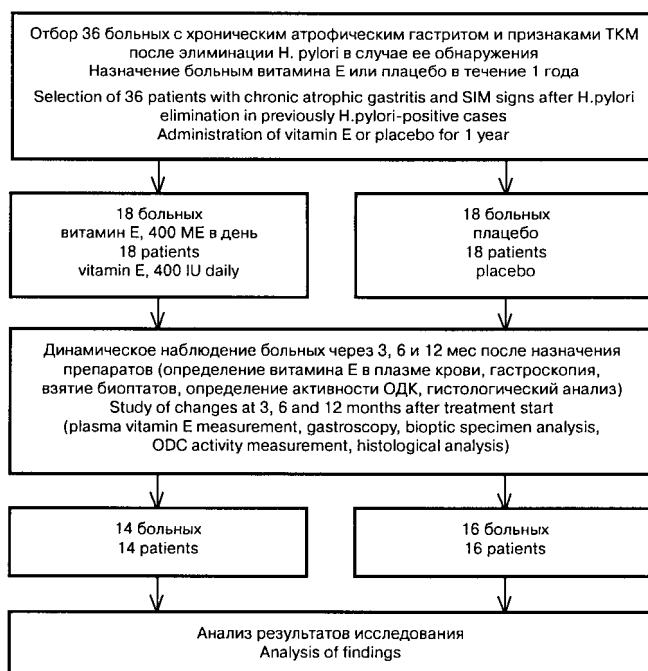
Materials and Methods. The study was performed in 36 patients with chronic atrophic gastritis (CAG) accompanied by SIM; in 5 cases the SIM was associated with colonic sectoral metaplasia. 25 of the 36 patients were *H. pylori*-negative, and 11 patients with *H. pylori* infection were successfully cured by means of standard chemotherapy (de nol + metronidazole + tetracycline [21]). The patients with SIM were selected from 155 patients with gastrointestinal pathology during survey at CRC RAMS or at a gastroscopy unit of health center No.5 (Tula). All patients entered in the intervention study were informed of the study goals and gave consent to participate in it.

At baseline 155 patients underwent gastroscopy, *H. pylori* infection test in 1 or 2 biptic specimens by 1-min urease express assay [2] and histological study of 2 biptic specimens from antral segment of the stomach. SIM was discovered in 51 cases. Three patients with SIM were excluded from the study due to other chronic pathology, hormonal therapy and alcoholism. Of 23 *H. pylori*-positive patients 11 were successfully cured of the infection as confirmed by 1-min urease test and histological study of biptic specimens at three weeks after treatment completion.

The scheme presents intervention study design. The 36 patients with SIM were randomized into 2 groups, 18 patients each. Patients from group 1 (mean age 54.2 ± 8.6 years; 11 males aged 35–72 years and 7 females aged 40–68 years) received daily 1 capsule (400 IU) of natural vitamin E (All Natural Pure E, Vital Life Products, Klaire Laboratories International, San-Marcos, USA) containing 70% of d- α -tocopherol and about 30% of mixture of d- β -, d- γ - and d- δ -tocopherols extracted

Схема

Scheme

План интервенционного исследования витамина Е
Design of vitamin E intervention study

зашифрованы. Расшифровку результатов анализов и их обработку производили после завершения годового курса лечения. Таким образом, по своему характеру выполненная работа являлась интервенционным исследованием, которое было проведено двойным слепым методом и включало группу больных, получавших плацебо в качестве контроля.

Гастроскопию проводили с использованием электронной эндоскопической системы «Evis-100» («Olympus», Япония). При гастроскопических обследованиях перед назначением витамина Е или плацебо и через 6 и 12 мес после начала приема препаратов из слизистой оболочки антрального отдела желудка на расстоянии 2–4 см от пилоруса брали 6–7 биоптатов: 2 или 3 биоптата для определения активности ОДК и 4 биоптата (по одному из области малой, большой кривизны антральной части желудка и его боковых стенок) — для гистологического анализа. После взятия биоптатов при проведении заключительного гастроскопического обследования слизистую оболочку желудка окрашивали метиленовым синим по стандартному методу с предварительным удалением слизи с помощью фермента проназы и раствора NaHCO_3 [17]. Указанная процедура позволяла визуально выявлять участки слизистой оболочки с ТКМ и сравнить полученные результаты с данными гистологического исследования.

Стандартная процедура определения активности ОДК микрорадиоизотопным методом с использованием L-[1- ^{14}C]-орнитина (удельная радиоактивность 52,7 мКи/ммоль, «Du Pont, NEN Products», США) детально изложена ранее [6]. Активность фермента выражали в единицах, принимая за 1 единицу образование 1 пмоль $^{14}\text{CO}_2$ за 1 ч в расчете на 1 мг белка, который определяли по методу Лоури.

Для определения витамина Е кровь у больных брали из вены натощак с 9 до 10 ч утра. Содержание суммарного витамина Е определяли в плазме крови. Образцы плазмы (2 мл), стабилизированные путем добавления 0,1 мл 0,1% раствора β -бутокситолуола в ДМСО, сохраняли перед проведением анализа при -20°C не более чем в течение 1–2 нед. Уровень содержания витамина Е в плазме крови определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии [19] на хроматографе HP-1090M («Hewlett-Packard», США) с использованием колонок Hypersil C18 и УФ-детектора.

Для гистологического анализа образцы ткани фиксировали в нейтральном 10% формалине, заливали в парафин и приготавливали срезы толщиной 5 мкм. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином по стандартной методике. Диагноз ХАГ подтверждался при наличии типичного истонченного слоя слизистой оболочки с весьма малым количеством железистых клеток. Наличие ТКМ диагностировали по присутствию клеток Панета и несекретирующих столбчатых клеток метапластического эпителия, имеющих кайму из микроворсинок, напоминающих по виду кишечный эпителий. Присутствие среди бокаловидных клеток призматических клеток, сходных с колоноцитами, оценивали как признак толстокишечной метаплазии, которая наблюдалась в единичных случаях наряду с ТКМ. Исчезновение во множественных биоптатах клеток, типичных для ТКМ, расценивали как регрессию ранних предопухолевых изменений.

Статистический анализ полученных данных проводили, используя двусторонний t-тест для определения различий между средними величинами ($\bar{x}$) в сравниваемых группах. В таблицах и тексте приведены средние величины и их стандартные отклонения ($\pm S_x$). Критерий Пирсона (χ^2) с поправкой Йейтса был использован для анализа статистической достоверности частоты регрессии предопухолевых изменений при длительном назначении витамина Е. Статистический анализ проводили с использованием компьютерной программы Statgraphics.

Результаты и обсуждение. Динамика содержания витамина Е в плазме крови больных ХАГ с наличием ТКМ при назначении витамина Е или плацебо представлена на рис. 1. Относительно низкое исходное содержание витамина Е в плазме крови (около 6,5 мкг/мл) резко возросло при ежедневном приеме 400 МЕ витамина Е в течение 3, 6 и 12 мес, достигая соответственно в среднем $11,3 \pm 2,1$, $17,0 \pm 1,8$ и $21,2 \pm 2,3$ мкг/мл. В группе больных, получавших плацебо, положительной динамики содержания витамина Е в плазме крови не наблюдалось.

При приеме витамина Е на фоне 2–3-кратного повышения содержания витамина Е в плазме крови исходная аномально высокая активность ОДК в слизистой обо-

from soybean oil. Patients from group 2 (control) (mean age 56.3±7.9 years; 13 males aged 45-70 years and 5 females aged 36-69 years) received daily 1 capsule of placebo containing purified soybean oil.

Two patients refused of re-examination at 6 and 12 months due to subjectively good condition, another two patients from the same group discontinued administration of vitamin E because of increasing bile reflux, which was seemingly due to increased intestinal motility under the effect of high-dose vitamin treatment. Only 14 patients from group 1 and 16 patients from group 2 underwent full examination during 1 year treatment course.

Capsules with vitamin E or placebo were encoded. Neither physicians nor patients were aware of the drugs. Blood plasma samples and histological curvatures of antral stomach and from two lateral walls of stomach) to make histological analysis. Gastric mucosa from the biptic specimens was stained with methylene blue by standard technique involving mucus removal using enzyme pronase and NaHCO_3 solution [17]. This procedure allowed visual detection of SIM lesions and comparison of these findings with histological study results.

The standard procedure of ODC measurement by microradioisotope methodology using L-[1- ^{14}C]-ornithine (specific radioactivity 52.7 mCi/mmol, Du Pont, NEN Products, USA) was described in detail previously [6]. Enzyme activity was expressed in units, one unit being defined as production of 1 pmol $^{14}\text{CO}_2$ for 1 hour per mg protein as measured by Lowry's method.

To measure vitamin E content venous blood sampling was performed at 9-10 a.m. in fasting patients. Total vitamin E was determined in blood plasma. Plasma specimens (2 ml) were stabilized by addition of 0.1 ml 0.1% β -butoxytoluene solution in DMSO and stored till analysis at -20°C not more than 1-2 weeks. Plasma vitamin E content was measured by high performance liquid chromatography (HPLC) [19] using a HP-1090M chromatograph (Hewlett-Packard, USA) equipped with Hypersil C18 columns and an UV detector.

Tissue specimens for histological analysis were fixed in neutral 10% formalin and embedded in paraffin to make 5 mcm sections. The sections were stained with hematoxylin and eosin by standard technique. CAG diagnosis was made on discovery of a typical thin mucosal layer with a small amount of glandular cells. The diagnosis of SIM was made by the presence of Paneth cells and non-secreting ciliated columnar metaplastic epitheliocytes resembling intestinal epithelium cells. The presence of colonocyte-like prismatic cells among goblet cells was considered a sign of colonic metaplasia which was encountered in rare cases together with SIM. Disappearance of SIM-typical cells was considered a sign of early preneoplastic lesion regression.

Statistical analysis of differences between mean values ($\bar{x}$) was performed by two-tail t-test. Mean values and their standard deviations ($\pm S_x$) are presented in the tables and text. Pearson test (χ^2) with Yates modification was used to analyze statistical significance of preneoplastic lesion regression frequency after long-term vitamin E therapy. The statistical analysis was performed using the Stat-Graphic computer program.

Results and Discussion. Changes in plasma vitamin E content in CAG patients with SIM after vitamin E or placebo treatment is presented in fig. 1. The relatively low baseline plasma vitamin E content (about 6.5 mcg/ml) increased rapidly as a result of daily administration of vitamin E at 400 IU for 3, 6 and 12 months reaching respectively 11.3 ± 2.1 , 17.0 ± 1.8 and 21.2 ± 2.3 mcg/ml on the average. There were no positive changes in plasma vitamin E content in the placebo group.

In the vitamin E group the abnormally high baseline ODC activity in gastric antral mucosa of SIM patients was progressively reducing by 44, 53 and 65% at 3, 6 and 12 months, respectively, in parallel with a 2-3-fold

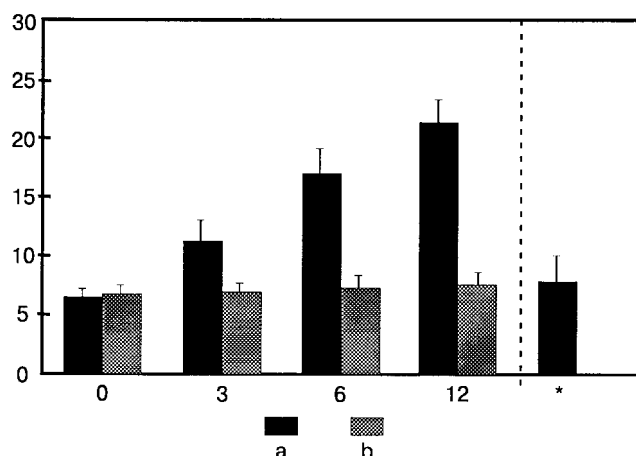


Рис. 1. Динамика содержания витамина Е в плазме крови больных с ТКМ в процессе лечения витамином Е и после его отмены.

a — содержание витамина Е в плазме крови больных, получавших витамин Е; *b* — то же в плазме крови больных, получавших плацебо.

По горизонтали — продолжительность курса терапии, мес; по вертикали — содержание витамина Е в плазме крови, мкг/мл. Звездочка — через 10–11 мес после отмены витамина Е.

Fig. 1. Changes in plasma vitamin E in SIM patients during and after vitamin E therapy.

a, plasma vitamin E content in patients receiving vitamin E; *b*, the same in placebo patients. Numbers on the x axis show months of therapy; numbers on the y axis show plasma vitamin E, mcg/ml. * indicates the level at 10–11 months after vitamin E discontinuation.

Рис. 2. Типичная гистологическая картина слизистой оболочки желудка больного ХАГ с признаками ТКМ до (а) и после (b) успешного лечения витамином Е.

Fig. 2. Typical histological pattern of a CAG patient's mucosa with SIM signs before (a) and after (b) successful vitamin E therapy.



a



b

a — резко выражена атрофия железистых элементов и видны типичные признаки ТКМ: присутствуют многочисленные бокаловидные клетки, указанные тонкими стрелками, и характерные столбчатые клетки с каймой из микроворсинок (жирные стрелки); клетки Панета, характерные для ТКМ, были выявлены при окраске аналогичных срезов алциановым синим; *b* — клеточные элементы, характерные для ТКМ, отсутствуют; атрофия железистых элементов выражена значительно слабее. Окраска гематоксилином и эозином; ув. 250.

a, marked glandular element atrophy and typical SIM signs: multiple goblet cells (thin arrows) and characteristic ciliated columnar cells (bold arrows); Paneth cells characteristic of SIM were discovered after staining with alcian blue; *b*, SIM-characteristic cell elements are absent; less marked glandular cell atrophy. Hematoxylin and eosin staining; multiplied x 250.

Таблица 1

Table 1

Влияние длительного назначения витамина Е (400 МЕ в день) на активность ОДК в антральном отделе слизистой оболочки желудка больных ХАГ с признаками ТКМ

Effect of long-term therapy with vitamin E (400 IU daily) on ODC activity in gastric antral mucosa of CAG patients with SIM signs

Длительность приема препаратов, мес	Витамин Е		Плацебо (контроль)	
	активность ОДК, ед.			
	$\bar{\chi} \pm S_{\bar{\chi}}$	в процентах к исходной активности	$\bar{\chi} \pm S_{\bar{\chi}}$	в процентах к исходной активности***
0	62,6±6,1	100	60,1±5,4	100
3	35,0±5,2	56*	61,3±7,0	102
6	29,3±6,4	47*	58,9±4,9	98
12	21,8±4,7	35*	63,3±6,1	105
Через 10—11 мес после отмены витамина Е у 10 больных с регрессией ТКМ At 10-12 months after vitamin E discontinuation in 10 patients with SIM regression	40,3±12,6	64**		
Months of drug administration	$\bar{\chi}+S_{\bar{\chi}}$	% of baseline	$\bar{\chi}+S_{\bar{\chi}}$	% of baseline
	ODC activity, units			
	Vitamin E		Placebo (control)	

* Снижение по сравнению с исходной величиной достоверно ($p < 0,01$). ** Снижение по сравнению с исходной величиной достоверно ($p < 0,05$) по сравнению с величиной, полученной после лечения витамином Е в течение 12 мес, наблюдается достоверное повышение активности ($p < 0,05$). *** Изменение активности в период исследования недостоверно ($p > 0,05$).

* Decrease in relation to baseline is statistically significant ($p < 0.01$). ** Decrease in relation to baseline is statistically significant ($p < 0.05$); there is a significant rise in the activity as compared to the level after 12-month treatment with vitamin E ($p < 0.05$). *** Changes in the activity during study are not statistically significant ($p > 0.05$).

лочке антрального отдела желудка больных с ТКМ прогрессивно снижалась через 3, 6 и 12 мес в среднем на 44, 53 и 65% соответственно (табл. 1). При приеме плацебо в течение года высокий уровень активности ОДК в слизистой оболочке антрального отдела желудка больных с ТКМ оставался практически без изменений.

Типичные изменения гистологической структуры, выявленные при анализе биоптатов слизистой оболочки желудка у многих больных, длительно получавших витамин Е, представлены на рис. 2, а, b. Характерные признаки ТКМ (наличие клеток Панета, бокаловидных клеток и клеток с каймой из микроворсинок, см. рис. 2, а) под влиянием витамина Е у значительного числа больных исчезали (см. рис. 2, b), что свидетельствовало о регрессии ТКМ. Динамика регрессии ТКМ и снижение частоты биоптатов с признаками ТКМ при назначении больным витамина Е представлена в табл. 2. Через 6 мес после начала приема витамина Е у 8 (57%) из 14 больных с ТКМ ни в одном из 3—4 биоптатов, взятых у каждого из этих больных, признаков ТКМ при гистологическом анализе обнаружено не было. Через 12 мес после начала приема витамина Е положительный эффект нарастал: у 10 (71%) из 14 больных признаков ТКМ в биоптатах не

increase in plasma vitamin E concentration (table 1). In the placebo group the high baseline ODC level of SIM patients' remained practically unchanged.

Typical histological changes in gastric mucosa of many patients receiving long-term vitamin E therapy are demonstrated in figs. 2, a and b. Characteristic SIM signs (Paneth cells, goblet cells and non-secreting ciliated columnar cells, see fig. 2, a) disappeared in a considerable number of cases under the effect of vitamin E which was evidence of SIM regression. Rates of SIM regression and decrease in frequency of bioptic specimens with SIM signs in the vitamin E patients are presented in table 2. At 6 months from vitamin E therapy start 8 (57%) of 14 patients with SIM presented with no evidence of SIM as determined by 3-4 bioptic specimens from each of the patients. At 12 months after the treatment start the positive effect was increasing as demonstrated by no evidence of SIM in bioptic specimens of 10 (71%) of the 14 patients. Analysis of the total number of specimens taken at baseline and during treatment with vitamin E also discovered progressive reduction in SIM-positive samples from 84 to 18%. No reduction in SIM-positive sample fraction or SIM regression was observed in the placebo group (see table 2).

Таблица 2

Table 2

Динамика регрессии ТКМ и частота обнаружения ТКМ во множественных биоптатах у больных ХАГ при приеме в течение 1 года витамина Е в дозе 400 МЕ в день и после его отмены (регрессию ТКМ устанавливали по отсутствию ее признаков во множественных биоптатах, взятых у больного)

Rates of SIM regression and frequency of SIM detection in several bioptic specimens from patients with CAG during treatment with vitamin E at 400 IU daily and after treatment discontinuation (SIM regression was determined by the absence of its signs in several bioptic specimens)

Продолжи- тельность приема пре- паратов, мес	Регрессия ТКМ				Частота биоптатов с ТКМ			
	витамин Е		плацебо (контроль)		витамин Е		плацебо (контроль)	
	число регрессий к общему числу больных	%	число регрессий к общему числу больных	%	число биоптатов с ТКМ к общему их числу у 14 больных		достовер- ность различий от исходной величины	число биоптатов с ТКМ к общему их числу у 16 больных
0	0/14	0	0/16	0	42/50 (84%)		47/57 (82%)	
6	8/14	57*	0/16	0	21/48 (44%)	$\chi^2=15,6;$ $p < 0,01$	50/59 (85%)	$\chi^2=0,07;$ $p > 0,05$
12	10/14	71**	0/16	0	8/44 (18%)	$\chi^2=38,1;$ $p < 0,01$	45/52 (87%)	$\chi^2=0,11;$ $p > 0,05$
Через 10—11 мес после отмены витамина Е At 10-12 months after vitamin E discontinuation	7/14	50***			22/46 (48)****	$\chi^2=12,5;$ $p < 0,01$		
Months of treatment duration	No. of regressions/ total No. of cases	%	No. of regressions/ total No. of cases	%	No. of SIM- positive/total No. of specimens in 14 patients	significance of differences as compared to baseline	No. of SIM- positive/total No. of specimens in 16 patients	significance of differences as compared to baseline
	Vitamin E		Placebo (control)		Vitamin E		Placebo (control)	
	SIM regression				Frequency of SIM-positive bioptic specimens			

Примечание. Одна звездочка — при 95% доверительном интервале положительный эффект в пределах 31—83%, две — в пределах 47—95%, три — в пределах 27—73%, четыре — достоверное повышение по сравнению с величиной, полученной после лечения витамином Е в течение 12 мес ($\chi^2=7,6$, $p < 0,01$).

Note. *, therapeutic effect within 31-83% at a 95% confidence interval; **, therapeutic effect within 47-95% at a 95% confidence interval; ***, therapeutic effect within 27-73% at a 95% confidence interval; ****, significant increase as compared to the level after a 12-month vitamin E therapy ($\chi^2=7.6$; $p < 0.01$).

обнаруживалось. Анализ общего числа биоптатов, взятых у больных до назначения витамина Е и в процессе лечения витамином Е, также выявил прогрессивное снижение количества биоптатов с ТКМ, доля которых снизилась с 84 до 18%. При приеме больными плацебо снижения частоты биоптатов с ТКМ и регрессии ТКМ не наблюдалось (см. табл. 2).

Хотя гистологический анализ множественных биоптатов позволил констатировать регрессию ТКМ у значительного числа больных, леченных витамином Е, метод прижизненной окраски слизистой оболочки желудка выявил у некоторых из этих больных наличие незначительных остаточных вкраплений окрашенных участков слизистой оболочки на месте обширных окрашенных пятен ТКМ, наблюдавшихся до назначения витамина Е.

Although SIM regression was histologically verified in a considerable number of vitamin E-treated patients, intravital staining of gastric mucosa detected small residual stains in the place of baseline large SIM areas in some of the patients. Thus, SIM regression in a number of cases was apparent but not complete.

Follow-up findings deserve special consideration. At three months after discontinuation of vitamin E therapy some patients with SIM regression presented with a considerable rise in gastric mucosal ODC activity. These patients were more thoroughly examined at 10-11 months after vitamin E therapy discontinuation. The ODC activity in these patients demonstrated a rise up to 40.3+12.6 units in parallel with decreasing plasma vitamin E levels up to low baseline values (7.4+1.7 mcg/ml on the average, see

Таким образом, регрессия ТКМ у ряда больных была ярко выраженной, но неполной.

Через 3 мес после отмены витамина Е у отдельных больных, у которых отмечалась регрессия ТКМ, наблюдалось заметное повышение активности ОДК в слизистой оболочке желудка. Более детально эти больные были обследованы через 10—11 мес после отмены витамина Е. На фоне снижения содержания витамина Е в плазме крови до исходных низких величин (в среднем до $7,4 \pm 1,7$ мкг/мл; см. рис. 1) активность ОДК у этих больных повысилась в среднем до $40,3 \pm 12,6$ ед. У 3 из 10 больных, у которых ранее наблюдалась почти полная регрессия ТКМ; через 10—11 мес после отмены витамина Е прижизненная окраска слизистой желудка выявила вновь появление значительных по размеру пятен ТКМ. При этом число биоптатов, в которых при последнем обследовании 14 больных гистологически было выявлено наличие ТКМ, возросло с 18 до 48%.

Результаты проведенной работы свидетельствуют, что длительное назначение больным ХАГ с признаками ТКМ относительно высоких доз природного витамина Е (400 МЕ в день) вызывает резкое подавление суперэкспрессии протоонкогена ОДК в слизистой оболочке желудка, что сопровождается регрессией предопухолевых изменений у значительного числа больных. Ранее мы нашли, что β -каротин в ежедневной дозе 20 мг вызывает при пероральном приеме в течение 1 года регрессию ТКМ приблизительно у 50% больных. Эффект, полученный при назначении больным в течение года витамина Е (400 МЕ в день), превосходит действие β -каротина: регрессия ТКМ наблюдается в 71% случаев, а статистически достоверный терапевтический эффект в отличие от такового при приеме β -каротина наблюдается уже на 6-й месяц после назначения препарата. Следует отметить, что у 3 из 10 больных, у которых наблюдался выраженный терапевтический эффект витамина Е, была отмечена регрессия не только ТКМ, но и регрессия сочетающихся с ТКМ элементов метаплазии толстокишечного типа.

Лечебное действие витамина Е при ТКМ связано, по-видимому, с подавлением суперэкспрессии протоонкогена ОДК, обладающего высоким онкогенным потенциалом и являющегося транскрипционной мишенью онкогенов *c-myc* и *v-src* [15, 16]. Конститутивная суперэкспрессия протоонкогена ОДК является специфическим и необходимым фактором промоции канцерогенеза [3, 4, 15, 19, 20], а блокирование в эксперименте аномально высокой активности ОДК специфическим ингибитором фермента (ДФМО) подавляет процесс промоции и образование опухолей. Резкое, в ряде случаев 10—12-кратное, повышение активности ОДК при ХАГ и особенно при наличии ТКМ можно рассматривать в качестве чувствительного биохимического маркера, указывающего на наличие процесса промоции канцерогенеза в слизистой оболочке желудка, а подавление суперэкспрессии ОДК при приеме витамина Е — как проявление его антипромоторного действия, ведущего к регрессии ТКМ. С этой точки зрения показательно, что у некоторых больных с практически полной регрессией ТКМ после отмены ви-

fig.1). At 10-11 months after discontinuation of vitamin E treatment 3 of the 10 patients with marked SIM regression presented with large enough SIM stains as detected by intravital gastric mucosa staining. The fraction of SIM-positive bioptic specimens as determined by the last examination of 14 patients increased from 18 to 48%.

Our findings suggest that long-term treatment with high-dose vitamin E (400 IU daily) of CAG patients with SIM signs results in rapid inhibition of protooncogene ODC superexpression in gastric mucosa accompanied by regression of preneoplastic lesions in a considerable number of patients. We demonstrated previously that β -carotene at daily dosage 20 mg per os for 1 year led to SIM regression in about 50% of cases. The effect of one year therapy with vitamin E (400 IU daily) was greater as compared to β -carotene: SIM regression was observed in 71% of cases and (unlike β -carotene) statistically significant amelioration was noticeable already after 6 months of treatment. Of note that 3 of the 10 patients with a marked therapeutic effect of vitamin E demonstrated regression of both SIM and SIM-associated colonic metaplastic lesions.

Vitamin E therapeutic effect in SIM may be related to inhibition of superexpression of protooncogene ODC which has a high oncogenic potential and is a transcription target of *c-myc* and *v-src* oncogenes [15,16]. The ODC constitutive superexpression is a specific and necessary factor of carcinogenesis promotion stage [3,4,15,19,20], while the experimental block of abnormally high ODC activity with a specific inhibitor (ДФМО) blocks the promotion and tumor development. The marked up to 10-12-fold rise in ODC activity in CAG patients especially in the presence of SIM may be considered a sensitive biochemical marker of gastric mucosal carcinogenesis promotion, while the inhibition of ODC superexpression as a result of vitamin E therapy may be a manifestation of its antipromotor activity leading to SIM regression. This observation is confirmed by a significant increase in ODC activity with appearance of large SIM areas in gastric mucosa after discontinuation of vitamin E therapy in some patients previously presenting with next to complete SIM regression.

Molecular mechanism of ODC superexpression inhibition by vitamin E is not yet clear. However, the supposition may be made that this mechanism involves antioxidant activity of natural vitamin E. Recent results demonstrate that free radical processes and generation of N-nitroso compounds play an important etiological role at early stages of gastroduodenal carcinogenesis [10,11,14]. We therefore believe that the anti-SIM therapeutic effect of β -carotene demonstrated previously [7] and the effect of vitamin E shown in this paper are related to their ability "to put out" local oxidation stress in gastric mucosa and to block production of carcinogenic N-nitrosocompounds and various free radicals.

It should be noted that both β -carotene and vitamin E induced SIM regression in a part of patients only. To achieve a fuller therapeutic effect the antioxidants should probably be used at higher dosage or for a longer time. In further study we plan to analyze therapeutic effect

тамина Е наблюдалось заметное повышение активности ОДК, сопровождающееся появлением в слизистой оболочке желудка значительных по площади пятен ТКМ.

Молекулярный механизм подавления суперэкспрессии ОДК витамином Е нами не изучен. Однако есть основания полагать, что указанный эффект связан с антиоксидантными свойствами природного витамина Е. Результаты последних исследований свидетельствуют, что свободнорадикальные процессы и образование N-нитрозосоединений играют важную этиологическую роль на ранних стадиях гастроканцерогенеза [10, 11, 14]. В связи с этим мы полагаем, что лечебное действие в отношении ТКМ β -каротина, показанное в предыдущей работе [7], и витамина Е в данном исследовании связано с их способностью «гасить» при гастроканцерогенезе локальный оксидативный стресс в слизистой оболочке желудка и блокировать образование канцерогенных N-нитрозосоединений и свободных радикалов различного типа.

Важно подчеркнуть, что β -каротин и витамин Е вызвали регрессию ТКМ лишь у части больных. Возможно, что для более полного проявления лечебного эффекта эти антиоксиданты должны использоваться в более высоких дозах или более продолжительное время. В дальнейших исследованиях планируется оценить зависимость лечебного эффекта от дозы антиоксидантов, длительности их назначения и их содержания в ткани слизистой оболочки желудка при предопухолевых состояниях, а также разработать режим поддерживающей терапии относительно низкими дозами антиоксидантов, поскольку прекращение интенсивной терапии может вести к возобновлению патологического процесса.

Лечебное действие β -каротина и витамина Е в отношении ТКМ, выявленное в наших работах, позволяет предположить, что эти пищевые факторы могут играть важную роль в химиопрофилактике рака желудка, особенно в нашей стране, где из-за ограниченного потребления свежих овощей и фруктов организм недостаточно обеспечен природными антиоксидантами. Однако потенциальное химиопрофилактическое действие β -каротина и витамина Е в отношении рака желудка требует длительных широкомасштабных исследований.

Приносим благодарность фармацевтической фирме «Klaire Laboratories International» (Сан-Маркос, Калифорния, США) за предоставление капсулированного препарата природного витамина Е и плацебо.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Драудин-Крыленко В. А., Букин Ю. В., Курцман М. Я. и др. // Съезд онкологов стран СНГ, 1-й: Тезисы докладов. — М., 1996. — С. 29.
2. Arvind A. S., Cook P. S., Tabaochali S., Farthing M. J. G. // *Lancet*. — 1988. — N 8585. — P. 704.
3. Auvinen M., Paasinen A., Andersson L. A., Holtta E. // *Nature*. — 1992. — Vol. 360. — P. 355—358.
4. Auvinen M., Laine A., Paasinen-Sohns A. et al. // *Cancer Res.* — 1997. — Vol. 57. — P. 3016—3025.
5. Bukin Yu. V., Zaridze D. G., Draudin-Krylenko V. A. et al. // *Eur. J. Cancer Prev.* — 1993. — Vol. 2. — P. 61—68.
6. Bukin Yu. V., Draudin-Krylenko V. A., Orlov E. N. et al. // *Cancer Epidemiol., Biomarkers and Prev.* — 1995. — Vol. 4. — P. 865—870.
7. Bukin Yu. V., Poddubniy B. K., Kuvshinov Yu. P. et al. // *Dig. Endoscopy*. — 1996. — Vol. 8. — P. 184—191.
8. Bukin Yu. V., Draudin-Krylenko V. A., Kuvshinov Yu. P. et al. // *Cancer Epidemiol., Biomarkers and Prev.* — 1997. — Vol. 6. — P. 543—546.
9. Bukin Yu. V., Draudin-Krylenko V. A. // *World Congress on Clinical Nutrition «Anti-oxiants an Disease», 6-th: Abstracts.* — Banff, Alberta, Canada, 1997. — P. 30.
10. Correa P. // *Cancer Res.* — 1992. — Vol. 52. — P. 6735—6740.
11. Correa P. // *Am. J. Surg. Pathol.* — 1995. — Vol. 19, Suppl. 1. — P. S37—S43.
12. Hill M. J. // *Eur. J. Cancer Prev.* — 1994. — Vol. 3, Suppl. 3. — P. 25—29.
13. Janne J., Alhonen-Hongisto L. // *Ornithine Decarboxylase: Biology, Enzymology and Molecular Genetics* / Ed. S. Hayashi. — Oxford, 1989. — P. 7—15.
14. Mannick E. E., Bravo L. E., Zarama G. et al. // *Cancer Res.* — 1996. — Vol. 56. — P. 3238—3243.
15. Marton L. J., Pegg A. E. // *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* — 1995. — Vol. 35. — P. 55—91.
16. Megosh L., Gilmour S., Rosson D. et al. // *Cancer Res.* — 1995. — Vol. 55. — P. 4205—4209.
17. Misumi A., Murakami A., Harada K., Donahue P. // *Probl. Gen. Surg.* — 1990. — Vol. 7. — P. 75—89.
18. Moshier J. C., Donescu J., Skunca M., Luk G. D. // *Cancer Res.* — 1993. — Vol. 53. — P. 2618—2622.
19. Nierenberg D. W., Lester D. C. // *J. Chromatog. Biomed. Appl.* — 1985. — Vol. 345. — P. 275—279.
20. O'Brien T. G., Megosh L. C., Gilliard G., Soler A. P. // *Cancer Res.* — 1997. — Vol. 57. — P. 2630—2637.
21. Patchett S., Beattie A., Kean C., O'Morain C. // *Rev. Esp. Enf. Digest.* — 1990. — Vol. 78, Suppl. 1. — P. 123—124.
22. Pegg A. E. // *Cancer Res.* — 1988. — Vol. 48. — P. 759—774.
23. Pegg A. E., Shantz L. M., Coleman C. S. // *J. Cell Biochem.* — 1995. — Vol. 22, Suppl. 1. — P. 132—138.
24. Shantz L. M., Coleman C. S., Pegg A. E. // *Cancer Res.* — 1996. — Vol. 56. — P. 5136—5140.

Поступила 23.12.97 / Submitted 23.12.97