

2. *De Simone M. et al.* // J. Endocrinol Invest. 2001. Vol. 24(6). P. 438–444.
3. *Schriock E.D. et al.* // J. Clin. Endocrinol Metab. 1988. Vol. 66(6). P. 1329–1331.
4. *Lavallee B. et al.* // Clin. Endocrinol (Oxf). 1997. Vol. 46(1). P. 93–100.
5. *Yamaguchi Y. et al.* // Clin. Endocrinol (Oxf). 1998. Vol. 49(3). P. 377–383.
6. *Sackett-Lundeen L. et al.* // Prog. Clin. Biol. Res. 1987. Vol. 227A. P. 467–482.
7. *Byrne J.J. et al.* // Diabetes Technol. Ther. 2001. Vol. 3(2). P. 211–219.
8. *Aoki K. et al.* // Diabetes. 1999. Vol. 48(8). P. 1579–1585.
9. *Dillon J.S. et al.* // Diabetes. 2000 Vol. 49(12). P. 2012–2020.
10. *Ishizuka T. et al.* // J. Physiol. 1999. Vol. 276(1 Pt 1). P. 196–204.
11. *Abadie J.M. et al.* // Lipids. 2000. Vol. 35(6). P. 613–620.
12. *Pham J. et al.* // Physiol. Behav. 2000. Vol. 70(5). P. 431–441.
13. *Nakashima N. et al.* // Metabolism. 1995. Vol. 44(4). P. 543–548.
14. *Pineiro V. et al.* // J. Endocrinol. 1999. Vol. 160(3). P. 425–432.

*Ставропольская государственная медицинская академия**20 апреля 2005 г.*

УДК 616–006.6

**АНАЛИЗ ПОКАЗАТЕЛЕЙ СОСТОЯНИЯ МЕМБРАН
И СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ В КРОВИ
БОЛЬНЫХ РАКОМ ЛЕГКОГО В ЗАВИСИМОСТИ
ОТ ЭФФЕКТИВНОСТИ РАЗЛИЧНЫХ МЕТОДОВ ПРОВЕДЕНИЯ
ПОСЛЕОПЕРАЦИОННОЙ ХИМИОТЕРАПИИ**

© 2005 г. *С.Г. Чилингаряни, И.А. Горошинская*

The study shows that the normalization of membrane structural indices and of free radical processes intensity correlates to the decrease of side toxic effects of chemotherapy.

В настоящее время приходится констатировать, что результаты лечения больных раком легкого все еще остаются неудовлетворительными; пятилетняя выживаемость всех заболевших находится в пределах 3–11 % [1, 2]. Основным методом лечения рака легкого остается оперативный, однако низкие отдаленные результаты после операции вызывают дискуссию о необходимости проведения комбинированного лечения [3, 4], одним из вариантов которого является адъювантная или послеоперационная химиотерапия. Новые программы химиотерапии, незначительно отличающиеся по эффективности, приводят в то же время к выраженным побочным токсическим проявлениям, что ухудшает результаты лечения. Одним из факторов повышения эффективности химиотерапии, в том числе и послеоперационной, может стать новый нетрадиционный способ введения цитостатиков, примером которого является метод аутогемохимиотерапии (АГХТ), разработанный в 1980 г. в РНИОИ профессором Ю.С. Сидоренко

(Способ лечения рака: авторское свидетельство № 940379 от 15.05.1980). Кроме классического применения АГХТ на цельной аутокрови, при раке легкого возможны и ее модификации: аутогемохимиотерапия с экстракорпоральным омагничиванием аутокрови [5] и фракционная аутогемохимиотерапия (ФАГХТ) – введение цитостатиков на отдельных фракциях аутокрови (эритроциты и плазма) для исключения токсического действия химиопрепаратов на лимфоциты [6].

Токсическое действие цитостатических препаратов во многом обусловлено их влиянием на метаболизм и мембранные структуры [7], а нарушение основных функций мембран непосредственно связано с состоянием свободнорадикальных процессов перекисного окисления липидов. В связи с этим в данной работе изучены структурные свойства мембран лимфоцитов и эритроцитов, а также интенсивность хемилюминесценции и активность церулоплазмينا как показатели состояния свободнорадикальных процессов в плазме крови больных раком легкого после проведения разных способов химиотерапии. Проведен анализ динамики исследованных параметров в зависимости от эффективности и токсических проявлений химиотерапии.

Исследование мембран с помощью флуоресцентных зондов позволяет получить важную информацию о структурном состоянии мембран. Параметры флуоресценции зонда, введенного в мембрану, зависят от физико-химических свойств его непосредственного микроокружения в мембранах: текучести, полярности среды, близости заряженных групп, наличия различных молекул-акцепторов, энергии электронного возбуждения, диффузии молекул-тушителей флуоресценции [8, 9]. Текучесть является комплексным показателем, отражающим как структуру, так и основные свойства липидной составляющей мембран и зон белок-липидных взаимодействий, ей принадлежит ключевая роль в регуляции всех процессов, протекающих в клеточных мембранах. Текучесть характеризует не только состояние мембран, но и их способность реагировать на изменения, происходящие в организме в ответ на развитие злокачественного процесса и воздействие химиопрепаратов [10, 11]. Оценка погруженности белков в липидный матрикс позволяет судить об ассоциации белков с мембранами, а также об олигомеризации мембранных белков, одной из причин которой может быть их окислительная модификация. Полярность липидного бислоя отражает состояние гидрофобной фазы мембраны, уровень в ней гидрофильных кластеров, образующихся гидроперекисями [9].

Перекись водорода – люминолзависимая хемилюминесценция плазмы крови является одним из наиболее адекватных методов изучения перекисного окисления липидов, позволяющего судить о содержании в системе супероксидного анион радикала ($O_2^{\cdot -}$) и гидроксильного радикала ($OH^{\cdot}$), с которыми связаны начальные звенья ПОЛ, а также об интенсивности взаимодействия активных форм кислорода со свободными радикалами липидов, т.е. о стадиях продолжения цепей свободнорадикальных реакций

[12]. Церулоплазмин, основной белковый антиоксидант плазмы крови, является полифункциональным ингибитором большого количества свободных радикалов, в том числе супероксидного и гидроксильного [13].

Структурно-функциональные характеристики мембран лимфоцитов и эритроцитов (текучесть, полярность микроокружения и погруженность белков в липидный матрикс) изучали по методу В.А. Владимирова, Г.Е. Добрецова на спектрофлюориметре Флюорат-02-панорама [8, 9]. Интенсивность хемилюминесценции оценивали в системе перекись водорода – люминол по методу В.А. Шестакова. Оксидазную активность церулоплазмينا определяли колориметрическим методом по окислению п-фенилендиамина (таблица).

Показатели состояния мембран и свободнорадикального окисления у больных раком легкого при разных видах химиотерапии

Группа	Мембраны лимфоцитов				Мембраны эритроцитов				ЦП	ХЛ
	Б/л контакт	Липидный бислой	Полярность	Погруженность	Б/л контакт	Липидный бислой	Полярность	Погруженность		
Доноры n = 18	0,488±0,021	0,696±0,015	0,930±0,012	0,211±0,01	0,578±0,025	0,356±0,021	1,443±0,013	0,215±0,009	0,790±0,059	3310±219
СПХТ n = 8										
До лечения	0,539±0,048 p>0,1	0,703±0,047 p>0,1	0,951±0,015 p>0,1	0,203±0,022 p>0,1	0,657±0,04 p>0,1	0,404±0,026 p>0,1	1,480±0,055 p>0,1	0,133±0,014 p<0,001	1,350±0,221 p<0,05	2379±302 p<0,05
После лечения	0,564±0,08 p>0,1 p ₁ >0,1	0,709±0,067 p>0,1 p ₁ >0,1	0,932±0,02 p>0,1 p ₁ >0,1	0,224±0,034 p>0,1 p ₁ >0,1	0,830±0,041 p<0,001 p ₁ <0,01	0,462±0,029 p<0,01 p ₁ тире<0,05	1,473±0,026 p>0,1 p ₁ >0,1	0,190±0,015 p>0,1 p ₁ <0,02	1,55±0,219 p<0,01 p ₁ >0,1	7038±977 p<0,01 p ₁ <0,001
АГХТ n = 7										
До лечения	0,559±0,053 p>0,1	0,601±0,046 0,05<p<0,1	0,982±0,023 0,05<p<0,1	0,233±0,006 0,05<p<0,1	0,466±0,021 p<0,01	0,460±0,039 p<0,05	1,452±0,026 p>0,1	0,257±0,026 p>0,1	1,459±0,135 p<0,001	2118±243 p<0,01
После лечения	0,397±0,028 p<0,02 p ₁ <0,02	0,590±0,057 0,05<p<0,1 p ₁ >0,1	0,906±0,013 p>0,1 p ₁ <0,02	0,257±0,009 p<0,01 p ₁ <0,05	0,487±0,058 p>0,1 p ₁ >0,1	0,367±0,035 p>0,1 p ₁ тире=0,05	1,363±0,035 p<0,05 p ₁ тире<0,05	0,191±0,015 p>0,1 p ₁ <0,05	1,414±0,167 p<0,01 p ₁ >0,1	2948±737 p>0,1 p ₁ >0,1
АГХТ + омагничивания крови n = 21										
До лечения	0,459±0,016 p>0,1	0,694±0,027 p>0,1	0,917±0,021 p>0,1	0,263±0,025 0,05<p<0,1	0,579±0,026 p>0,1	0,346±0,018 p>0,1	1,517±0,02 p<0,01	0,230±0,033 p>0,1	1,991±0,256 p<0,001	2825±273 p>0,1
После лечения	0,450±0,022 p>0,1 p ₁ >0,1	0,671±0,02 p>0,1 p ₁ >0,1	0,949±0,015 p>0,1 p ₁ >0,1	0,306±0,043 p<0,05 p ₁ >0,1	0,548±0,03 p>0,1 p ₁ >0,1	0,318±0,013 p>0,1 p ₁ >0,1	1,420±0,023 p>0,1 p ₁ <0,01	0,203±0,023 p>0,1 p ₁ >0,1	1,670±0,077 p<0,001 0,05<p<0,1	2844±413 p>0,1 p ₁ >0,1
ФАГХТ n = 9										
До лечения	0,534±0,055 p>0,1	0,67±0,07 p>0,1	0,946±0,027 p>0,1	0,262±0,022 p<0,05	0,545±0,042 p>0,1	0,477±0,01 p<0,001	1,472±0,04 p>0,1	0,248±0,033 p>0,1	1,79±0,177 p<0,001	2559±473 p>0,1
После лечения	0,585±0,083 p>0,1 p ₁ >0,1	0,784±0,064 p>0,1 0,05<p<0,1	0,928±0,016 p>0,1 p ₁ >0,1	0,233±0,023 p>0,1 p ₁ >0,1	0,588±0,081 p>0,1 p ₁ >0,1	0,37±0,034 p>0,1 0,05<p<0,1	1,436±0,03 p>0,1 p ₁ >0,1	0,23±0,034 p>0,1 p ₁ >0,1	1,317±0,131 p<0,001 p ₁ <0,05	3225±606 p>0,1 p ₁ >0,1

Примечание. p – достоверность отличий по сравнению с группой доноров; p₁ – по сравнению с фоном до лечения.

Биохимические показатели определяли у 45 больных (16 были с I стадией, 17 – со II, 12 – с III стадией процесса) до начала послеоперационного химиотерапевтического лечения – фон и через 7–10 дней после завершения этого этапа лечения. 8 больным была проведена стандартная хи-

миотерапия (СХТ), 7 – АГХТ, 21 – АГХТ с омагничиванием крови и 9 больным – фракционная АГХТ. Результаты, полученные при обследовании больных, сравнивали с соответствующими показателями у группы лиц без онкопатологии. С этой целью параллельно с больными обследованы 18 человек в возрасте 30–70 лет, составивших группу доноров. Токсические осложнения и отдаленные результаты изучены у 57 больных с проведением послеоперационной СХТ, у 48 – с послеоперационной АГХТ, у 50 – АГХТ с экстракорпоральным омагничиванием крови и у 52 больных – с проведением послеоперационной ФАГХТ.

Как видно из таблицы, после СХТ показатели структурного состояния мембран не изменялись в лимфоцитах, а в эритроцитах наблюдалось достоверное увеличение текучести и погруженности белков в липидный матрикс. Текучесть мембран эритроцитов в зоне белок-липидных контактов увеличилась на 26,3 % по сравнению с фоновыми значениями перед началом химиотерапии и на 43,6 % превысила норму. В липидном бислое увеличение текучести составило 14,4 % по сравнению с фоном и 29,8 % по сравнению с донорами. Погруженность белков в липидный матрикс мембран эритроцитов превысила фоновые значения на 42,9 %. Имело место трехкратное увеличение изначально незначительно сниженной (на 28,1 %) интенсивности хемилюминесценции, значения которой после курса СХТ превысили уровень доноров на 112,6 %. Увеличение интенсивности хемилюминесценции, свидетельствующее об усилении свободнорадикальных процессов, не компенсировалось незначительным повышением активности церулоплазмينا, которая после курса химиотерапии превышала норму на 96,2 %, в то время как до начала курса – на 70,9 %.

После АГХТ наблюдались разнонаправленные изменения показателей текучести. В лимфоцитах текучесть в зоне белок-липидных контактов снизилась на 29 % по сравнению с фоном и на 18,6 % по сравнению с донорами, в липидном бислое оставалась на сниженном уровне (на 15,2 % ниже нормы). В эритроцитах изначально сниженная на 19,4 % текучесть мембран в зоне белок-липидных контактов несколько увеличилась и достоверно не отличалась от уровня доноров, а изначально увеличенная на 29,2 % текучесть липидного бислоя достоверно снизилась и также не отличалась от нормы. Имели место и разнонаправленные изменения погруженности: в лимфоцитах она достоверно увеличилась и превосходила норму на 21,8 %, а в эритроцитах снизилась на 25,7 % и не отличалась от уровня доноров. Полярность мембран достоверно снизилась как в лимфоцитах на 7,7 %, где не отличалась от нормы, так и в эритроцитах на 6,1 % по сравнению с фоном и на 5,5 % по сравнению с уровнем доноров. При данном способе химиотерапии наблюдалась нормализация изначально сниженной на 36 % интенсивности хемилюминесценции при отсутствии достоверных изменений в активности церулоплазмينا, которая превышала норму на 84,7 % до и на 79 % после курса АГХТ.

После АГХТ с омагничиванием крови из всех структурных показателей мембран достоверные изменения по сравнению с фоном до лечения выявлены лишь для полярности мембран эритроцитов, которая будучи изначально увеличенной на 5,1 % после лечения снизилась на 6,4 % до уровня доноров. После окончания курса все показатели состояния мембран не отличались от нормы, за исключением погруженности белков в липидный матрикс лимфоцитов, изначально проявлявшей тенденцию к увеличению и после лечения превысившей уровень доноров на 45 %. Интенсивность хемилюминесценции у большинства обследованных больных оставалась в норме. Активность церулоплазмينا, изначально увеличенная которой в данной группе достигало 152 %, проявила тенденцию к снижению и после курса превышала норму на 111,4 %.

После ФАГХТ все структурные показатели мембран не отличались от уровня доноров, при этом имела место нормализация изначально увеличенных погруженности белков в липидный матрикс лимфоцитов (на 24,2 %) и текучести мембран в липидном бислое эритроцитов (на 34 %). Интенсивность хемилюминесценции полностью соответствовала уровню доноров. Изначально увеличенная на 126,6 % активность церулоплазмينا после проведения курса достоверно снизилась на 26,4 % и превышала норму лишь на 66,7 %.

Учитывая важную функциональную роль церулоплазмينا, следует прийти к заключению, что умеренно увеличенный уровень этого антиоксиданта у онкологических больных может играть положительную роль, в связи с его ролью в иммунологических реакциях, ионном обмене, способностью повышать стабильность клеточных мембран и тормозить ПОЛ, оказывать антистрессорное действие, стимулировать гемопоэз и уменьшать пероксидный гемолиз эритроцитов [14]. Резкое увеличение уровня церулоплазмينا (на 100–150 % выше нормы) приводит к негативным последствиям, которые могут реализоваться через глубокие нарушения метаболизма меди и железа. Это, по-видимому, способствует развитию выраженной анемии онкологических больных, а также, возможно, формированию стойкого дисбаланса между повышенной окислительной устойчивостью опухоли и снижением защитного потенциала тканей опухоленосителя к свободнорадикальным поражениям, являющимся патологической основой некоторых вторичных болезней опухоленосителя [15]. Известно также, что церулоплазмин способен проявлять СОД-подобную активность, но в отличие от истинной СОД способствует при избыточной активности наработке H_2O_2 и синглетного кислорода [12].

Исследование биохимических показателей у значительного количества больных, лечение которых осуществлялось с применением АГХТ с омагничиванием крови, позволило провести в этой группе анализ их зависимости от состояния больных. Удалось показать, что наиболее чувствительный показатель – интенсивность хемилюминесценции существенно менялся в зависимости от клинической картины. В то время как у боль-

шинства больных интенсивность хемилюминесценции не претерпевала значительных отличий от уровня, характерного для доноров, что согласовалось с зафиксированным у них уменьшением процесса, у двух больных с лейкопенией наблюдалось более чем трехкратное снижение интенсивности хемилюминесценции (867 и 943 имп. за 6 с), а у одного больного с нарастанием злокачественного процесса – увеличение показателя в 3,6 раза по сравнению с нормой (11874 имп. за 6 с).

При проведении химиотерапии большое значение имеет побочное токсическое действие противоопухолевых препаратов, которое часто является лимитирующим фактором при проведении лечения. Гематологическая токсичность была представлена главным образом лейкопенией, частота которой была достоверно ниже при проведении химиотерапии на естественных средах крови по сравнению с СХТ (44,2 % и 85,8 % соответственно). Самый низкий показатель отмечен при проведении АГХТ с омагничиванием крови – 34,8 %. Негематологическая токсичность на нашем материале была представлена в основном тошнотой/рвотой и из поздних осложнений алопечией. В группе классической АГХТ на цельной крови число осложнений, сопровождающихся тошнотой и рвотой, было ниже, чем в группе СХТ (46,2 % и 63,3 %). При проведении АГХТ с омагничиванием крови отмечена та же закономерность (39,3 %), а при ФАГХТ наблюдался самый низкий процент возникновения тошноты и рвоты (29,3 %), который был даже ниже, чем в группе классической АГХТ. В группах, где применялась послеоперационная АГХТ, наблюдалась постепенная тенденция к снижению числа алопечий по сравнению с СХТ по мере нормализации структурных показателей мембран, достигая самого низкого процента при ФАГХТ (63,3; 56,4; 52,8; 41,3 % соответственно). Такая же закономерность наблюдается при анализе 3-летней выживаемости в этих группах больных. Так, при проведении послеоперационной СХТ более 3-х лет прожили 51,0 % больных; в группе классической АГХТ – 63,5; при проведении АГХТ с омагничиванием крови – 70,4, а при ФАГХТ наблюдалась самая высокая 3-летняя выживаемость – 75,3 %.

Таким образом, более полная нормализация структурных показателей мембран и интенсивности свободнорадикальных процессов соответствовала меньшей выраженности побочных явлений химиотерапии.

Применение при проведении послеоперационной химиотерапии больным раком легкого метода аутогемохимиотерапии и его модификаций (АГХТ с экстракорпоральным омагничиванием аутокрови и фракционной АГХТ) позволяет не только уменьшить число рецидивов и метастазов, улучшить отдаленные результаты лечения, но и снизить частоту побочных реакций химиотерапии, тем самым улучшая качество жизни больных.

Литература

1. Чиссов В.И. и др. // Вопросы онкологии. 1995. Т. 41. № 2. С. 11–18.
2. Бисенков Л.Н., Шалаев С.А. // Вопросы онкологии. 2002. Т. 48. № 1. С. 102–105.

3. *Лактионов К.К.* // Российская онкологическая конференция. 2000. № 1. С. 20–24.
4. *Давыдов М.И. и др.* // IV Ежегодная Рос. онкол. конф. М., 2002. С. 80–82.
5. *Салатов Р.Н., Чилингаряц С.Г. и др.* // Отечественная онкология – основные пути развития. М., 2001. С. 169–178.
6. *Чилингаряц С.Г. и др.* // Лечение рецидивов и метастазов злокачественных опухолей и другие вопросы онкологии. М., 2003. С. 311–316.
7. *Степовая Е.А. и др.* // Рос. онкол. журн. 2004. № 3. С. 19–24.
8. *Владимиров Ю.А., Добрецов Г.Е.* Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. М., 1980.
9. *Добрецов Г.Е.* Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов. М., 1989.
10. *Дятловицкая Э.В.* // Биохимия. 1995. Т. 60. № 6. С. 843–850.
11. *Shinitzky M.* // Biochim. Biophys. Acta. 1984. Vol. 738. P. 251–161.
12. *Владимиров Ю.А., Азизова О.А., Деев А.И. и др.* Свободные радикалы в живых системах // Биофизика (Итоги Нит ВИНТИ АН СССР). М., 1991. Т. 29.
13. *Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньщикова Е.Б.* Окислительный стресс: Биохимический и патофизиологический аспекты // МАИК “Наука/Интерпериодика”, 2001.
14. *Мжельская Т.И.* // Бюл. экспер. биол и мед. 2000. Т. 130. № 8. С. 124–133.
15. *Шварцбург П.М.* Окислительный стресс во взаимодействиях опухоли и организм: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Пушино, 1997.