

КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИОКСИДАНТНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ ПРИ ДИСПЛАСТИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЯХ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ И РАКЕ ЖЕЛУДКА

Н.В. Бочкарева, Л.А. Коломиец, И.В. Кондакова, С.Л. Стуканов, М.В. Вусик

НИИ онкологии Томского научного центра СО РАМН

В современных исследованиях, посвященных вопросам химиопрофилактики рака желудка, отмечаются значительный превентивный эффект длительного применения антиоксидантов (АО): β -каротина, аскорбиновой кислоты, α -токоферола, ретиноидов – и роль сбалансированной диеты с высоким содержанием овощей и фруктов [12]. Анτικанцерогенный эффект АО может быть обусловлен их влиянием на уровень нитритов, нитратов и N-нитрозосоединений в желудочном соке [20], на общую антирадикальную активность сыворотки крови и уровень вторичной секреции витамина С в полость желудка [12], а также возможным влиянием АО слюны на эпителий желудка [13, 21]. При хронических заболеваниях желудка с предраковыми изменениями слизистой оболочки в виде дисплазии исходный антиоксидантный статус важен, поскольку при таких патологических состояниях нарушаются синтез, всасывание, экскреция АО, снижается стабильность аскорбиновой кислоты в гипоацидном желудочном соке [17].

Перекисное окисление липидов, свободнорадикальные повреждения белков, ДНК ведут к различным повреждениям структуры и функции клетки, нарушению ее регуляции гормонами, ростовыми факторами и цитокинами. Накопление свободнорадикальных повреждений ДНК вместе с нарушениями регуляторных взаимосвязей может вызвать злокачественную трансформацию клетки. Защита от свободных радикалов обеспечивается антиоксидантной системой. Степень свободнорадикальных повреждений внутриклеточных структур в клетках слизистой оболочки желудка контролируется, по-видимому, не только системой внутриклеточных АО, но и внеклеточными механизмами. Доступность таких биологических жидкостей, как слюна, сыворотка крови, желудочный сок, для биохимического исследования и присутствие в них основных антиоксидан-

тов делают привлекательным изучение антиоксидантных характеристик их у больных с различными морфологическими изменениями слизистой оболочки желудка [2, 13, 15, 21].

Рак желудка продолжает занимать одно из первых мест в структуре онкологической заболеваемости [1]. Частота малигнизации при наличии умеренной и тяжелой дисплазии в слизистой оболочке желудка составляет от 5 до 12% [3, 7, 10]. Остается актуальным выбор лабораторных показателей для формирования группы повышенного онкологического риска среди больных с хроническими заболеваниями желудка [16]. Большинство программ лечения диспластических изменений слизистой оболочки желудка включает применение АО [3, 12]. При раке желудка АО активно используются в предоперационный, послеоперационный период, а также на этапах реабилитации [3]. Однако до настоящего времени не уточнены объем лабораторных исследований по оценке антиоксидантного статуса и клинико-диагностическое значение определения этих показателей при диспластических изменениях слизистой оболочки и раке желудка.

Оценка показателей антиоксидантного статуса проведена у 58 больных хроническими заболеваниями желудка с дисплазией эпителия II–III степени и у 38 больных раком желудка со стадией заболевания $T_3N_{0-2}M_0$. Контрольную группу составили 42 здоровых человека. Исследовали сыворотку крови, нестимулированную слюну и желудочный сок. Желудочный сок получали при эзофагогастродуоденоскопии. Использовали хемилюминесцентный метод определения антирадикальной активности (АРА) в собственной модификации [11]. Применение 2,2'-азо-бис-изобутиронитрила, который растворяли в диметилсульфоксиде, позволило исследовать суммарную активность гидрофильных и липофильных АО. АРА выражали в единицах хемилюминесценции

(ед. ХЛ). Общая АРА частично деградированных гликопротеинов надэпителиального слизистого слоя желудка и АРА гликопротеинов полостной желудочной слизи оценена у 14 человек без патологии желудка и была пересчитана с учетом разведения нативной слизи. Пробы нативной надэпителиальной слизи и полостной желудочной слизи подвергали процедуре очистки и выделения структурных гликопротеинов по методу, предложенному Б.В. Питраном [6].

Неферментативное звено антиоксидантной системы оценивали по уровню α -токоферола, ретинола [9] и мочевой кислоты. Для определения уровня мочевой кислоты использовали диагностические наборы фирмы “Согмау” (Польша). Ферментативное звено оценивали по активности глутатионпероксидазы и супероксиддисмутазы (СОД) [5, 19]. Активность СОД в сыворотке крови определяли после предварительного осаждения двух ингибиторов фермента, церулоплазмينا и разрушения Мп-СОД [2]. Рассчитывали коэффициент СОД/глутатионпероксидаза, характеризующий баланс в ферментативном звене антиоксидантной системы. Во взаимосвязи с показате-

вень опухолевых маркеров СА 72-4 и РЭА. Использовались наборы реактивов для иммуноферментного анализа СА 72-4 ИФА COBAS CORE “Roche” (Швейцария) и для радиоиммунного анализа – РИА-РЭА-1²⁵-М (Беларусь). Статистическая обработка выполнена с использованием пакета стандартных программ приложения Excel 7.0. При нормальном распределении признака статистическая обработка проводилась по t-критерию Стьюдента, при распределении, отклоняющемся от нормального, – с помощью непараметрического критерия Вилкоксона – Манна – Уитни, при анализе корреляционных зависимостей учитывались сильные и средние корреляционные связи $r \geq 0,5$.

Антиоксидантные характеристики сыворотки крови у больных с диспластическими изменениями слизистой оболочки желудка и раком желудка представлены в табл. 1. Анализ полученных данных выявил значительное снижение общей АРА сыворотки крови как у больных с диспластическими изменениями в слизистой оболочке желудка, так и у больных раком желудка. Изменение уровня отдельных АО сыворотки крови характе-

Т а б л и ц а 1

Антиоксиданты сыворотки крови при диспластических и опухолевых процессах в слизистой оболочке желудка

Показатели	Группа		
	Контроль	Дисплазия II–III степени	Рак желудка, T ₃ N ₀₋₂ M ₀
АРА, ед.ХЛ	778,4±84,0	490,1±50,0*	438,2±49,1*
Мочевая кислота, мкМ/л	184,1±25,3	205,1±39,1	217,2±33,4
Ретинол, мкМ/мл	2,66±0,29	1,83±0,13*	0,88±0,17*
α -токоферол, мкМ/л	22,2±2,0	8,9±0,8*	7,4±0,9*
СОД, мкМ формазана/мл сыворотки/мин	35,8±1,8	27,8±2,8*	27,2±3,0*
Глутатионпероксидаза, мкМ НАДФН/мл сыворотки/мин	81,7±13,3	76,8±8,1	74,1±2,3
СОД/глутатионпероксидаза	0,438±0,022	0,496±0,096	0,289±0,025*

Примечание. Звездочкой отмечена достоверность различий по сравнению с контролем, $p < 0,05$; НАДФН – никотинамид аденин динуклеотид фосфат восстановленный.

лями антиоксидантной системы в сыворотке крови больных с диспластическими изменениями слизистой оболочки желудка, больных раком желудка и в контрольной группе определяли уро-

изуется снижением концентрации α -токоферола – главного жирорастворимого АО сыворотки крови – на 60% при хронических заболеваниях желудка с дисплазией и на 67% при раке желудка

и дефицитом другого жирорастворимого АО – ретинола – соответственно на 31 и 67% с одновременным незначительным повышением уровня мочевой кислоты в указанных группах. Оценка функционирования ферментативного звена антиоксидантной системы выявила снижение активности СОД при диспластических и опухолевых процессах в слизистой оболочке желудка. Снижение активности СОД в сыворотке крови у больных с диспластическими изменениями слизистой оболочки желудка составило 22%, а у больных раком желудка – 24%. Изменение активности глутатионпероксидазы сыворотки крови как у больных с диспластическими, так и с опухолевыми процессами в желудке обнаружено не было. Выявленное снижение коэффициента СОД/глутатионпероксидаза на 34% у больных раком желудка демонстрирует функциональную недостаточность ферментативного звена антиоксидантной системы, где избыточное образование активных форм кислорода и активация ими перекисного окисления липидов не компенсируются ни повышением активности СОД, ни глутатионпероксидазы.

Представляется важным изучение уровня общей АРА и отдельных АО в таких биологических жидкостях, как слюна, желудочный сок и желудочная слизь. Уровень общей АРА в различных биологических жидкостях у практически здоровых лиц представлен в табл. 2. Предложенный метод определения общей АРА позволяет регистрировать суммарную активность неферментатив-

таких структурах вполне корректен [4, 11]. У практически здоровых лиц АРА желудочного сока была в 2 раза выше АРА сыворотки крови и в 3,4 раза АРА слюны. Высокий уровень АРА выявлен в частично деградированных гликопротеинах полостной желудочной слизи и гликопротеинах надэпителиального слизистого слоя желудка. Анализ абсолютных значений АРА в желудочном соке, гликопротеинах полостной желудочной слизи и гликопротеинах надэпителиального слизистого слоя желудка позволяет предполагать значительный вклад компонентов желудочной слизи в общую АРА желудочного сока, что согласуется с данными о степени деградации надэпителиального слизистого слоя желудка [4].

Антиоксидантные характеристики слюны и желудочного сока у больных с диспластическими изменениями слизистой оболочки желудка и раком желудка представлены в табл. 3. Анализ антиоксидантных характеристик слюны и желудочного сока выявил, что у больных хроническими заболеваниями желудка с дисплазией эпителия II–III степени АРА слюны снижена на 28%, а АРА желудочного сока – на 71%. В то же время существенных изменений активности СОД ни в слюне, ни в желудочном соке, а также уровня мочевой кислоты в слюне отмечено не было. У больных раком желудка выявлены два типа функционирования антиоксидантной системы. Первый тип характеризовался нормальной активностью СОД в слюне и желудочном соке, повышенным уровнем мочевой кислоты в слюне, сни-

Т а б л и ц а 2

Антирадикальная активность в биологических жидкостях в группе практически здоровых лиц

Биологическая жидкость	АРА, ед.ХЛ
Слюна	443,0±32,1
Сыворотка крови	778,4±84,0
Желудочный сок	1536,0±267,2
Гликопротеины полостной желудочной слизи	5570,7±404,7
Гликопротеины надэпителиального слизистого слоя желудка	18960,0±1900,1

ных липофильных и гидрофильных АО. Поскольку гликопротеины надэпителиального слизистого слоя желудка и гликопротеины полостной желудочной слизи являются гидрофобными структурами, предложенный метод определения АРА в

жении на 40% АРА желудочного сока и на 21% АРА слюны. При втором типе функционирования АРА желудочного сока была снижена на 80%, СОД активности в желудочном соке – на 50%, АРА слюны – на 81%, уровень мочевой кислоты в

слюне – на 45%. Снижение уровня АРА сыворотки составило 44% в обеих группах.

Таким образом, при первом типе функционирования доминируют нарушения, касающиеся системного антиоксидантного статуса, т.е. антиоксидантных характеристик сыворотки крови, а при втором типе функционирования преобладают нарушения локального антиоксидантного статуса, т.е. антиоксидантных характеристик слюны и желудочного сока. У больных раком желудка с первым типом функционирования антиоксидантной системы значительное снижение уровня АО сыворотки крови коррелировало с высокой частотой послеоперационных осложнений гнойно-воспалительного характера.

Во взаимосвязи с показателями антиоксидантного статуса анализировалась частота нагноений операционной раны и абсцессов брюшной полости. Из 38 обследованных больных раком желудка с третьей стадией заболевания у 29 выявлен первый тип функционирования, в том числе у 12 больных снижение уровня общей АРА сыворотки крови не превышало 50%, а частота

Анализ интегральных антиоксидантных характеристик – АРА сыворотки крови, АРА слюны, АРА желудочного сока – в группе больных с морфологической перестройкой слизистой оболочки желудка в виде дисплазии II–III степени показал, что по изученным параметрам данная группа была неоднородна. Выявлены больные с показателями антиоксидантного статуса, близкими к нормальным, и больные с низкими показателями. Низкие показатели общей АРА являются факторами, способствующими активации свободнорадикальных процессов в организме. В частности, низкие показатели АРА слюны и АРА желудочного сока способствуют активации образования N-нитрозосоединений в полости рта и желудка. Низкий уровень АРА слюны может усиливать свободнорадикальную инактивацию важнейших протеинов слюны и факторов неспецифического местного иммунитета – лизоцима и секреторного иммуноглобулина А [6, 12, 13, 18]. Для выявления взаимосвязи низкой общей АРА в биологических жидкостях и степени онкологического риска у всех больных с умеренной и выраженной дис-

Т а б л и ц а 3

Антиоксидантные характеристики слюны и желудочного сока при диспластических и опухолевых процессах в слизистой оболочке желудка

Показатели	Группа			
	Контроль	Дисплазия II–III степени	Рак желудка, T ₃ N ₀₋₂ M ₀	
			I стадии	II стадии
АРА слюны, ед.ХЛ	443,0±32,1	313,1±36,3*	348,1±63,2	83,1±32,0***
СОД слюны, мкМ формазана/мл слюны/мин	16,0±1,4	14,6±1,5	14,0±2,1	14,0±2,1
Мочевая кислота слюны, мкМ/л	72,3±9,9	75,0±10,0	108,8±8,0*	40,0±7,9***
АРА желудочного сока, ед.ХЛ	1536,0±267,2	428,1±110,5*	820,0±93,2*	303,1±32,0***
СОД желудочного сока, мкМ формазана/мл сока/мин	26,0±2,5	25,0±4,0	24,6±1,5	13,2±1,5***

* Достоверность различий по сравнению с контролем, p<0,05.

** Достоверность различий по сравнению с I подгруппой больных раком желудка, p<0,05.

осложнений гнойно-воспалительного характера составила 8,33%. У 17 больных раком желудка с первым типом функционирования антиоксидантной системы снижение уровня общей АРА сыворотки крови составило более 50%, а частота анализируемых осложнений была выше в 2,8 раза.

плазией слизистой оболочки желудка определяли опухолевые маркеры – СА 72–4 и РЭА. Комбинация маркеров была выбрана на основании данных литературы об использовании СА 72–4 в сочетании с РЭА для диагностики, мониторинга и прогнозирования течения рака желудка [14].

Анализ полученных данных выявил, что уровень СА 72–4 в контрольной группе составил $1,40 \pm 0,22$ ед./мл, у больных с диспластическими изменениями слизистой оболочки желудка – $8,41 \pm 3,13$ ед./мл ($p < 0,05$), в группе больных раком желудка – $17,90 \pm 7,78$ ед./мл ($p < 0,05$). Уровень РЭА в контрольной группе составил $5,00 \pm 3,01$ нг/мл, в группе больных хроническими заболеваниями желудка с дисплазией эпителия II–III степени и (или) кишечной метаплазией – $12,12 \pm 3,94$ нг/мл ($p > 0,05$), в группе больных раком желудка – $18,52 \pm 6,80$ нг/мл ($p < 0,05$). Проведенный корреляционный анализ выявил взаимосвязь между АРА желудочного сока и уровнем СА 72–4 ($r = -0,80$; $p < 0,05$), в то же время какой-либо взаимосвязи уровня опухолевых маркеров с АРА сыворотки крови и АРА слюны отмечено не было. У практически здоровых лиц низкие уровни СА 72–4 и РЭА сочетались с высокой АРА желудочного сока. У большинства больных с диспластическими изменениями слизистой оболочки желудка выявлялись низкие значения опухолевых маркеров, АРА желудочного сока также была снижена. Только у 17% больных хроническими заболеваниями желудка с дисплазией эпителия II–III степени выявлены высокие уровни РЭА и СА 72–4 в сочетании со значительно сниженной АРА желудочного сока. По своим антиоксидантным характеристикам биологических жидкостей и уровню опухолевых маркеров эти больные максимально приближены к больным раком желудка с таковыми показателями.

Таким образом, по состоянию антиоксидантного статуса группа больных с диспластическими изменениями слизистой оболочки желудка была неоднородна. Группу повышенного онкологического риска составили 17% больных с низкими показателями АРА сыворотки крови, АРА слюны и АРА желудочного сока и высокими уровнями СА 72–4 и РЭА.

Результаты анализа изменений уровня интегральных антиоксидантных характеристик, отдельных АО и активности антиоксидантных ферментов в биологических жидкостях у практически здоровых лиц, больных хроническими заболеваниями желудка с дисплазией эпителия II–III степени и у больных раком желудка, а также данные корреляционного анализа позволили обосновать комплекс лабораторных показателей для оценки антиоксидантного статуса у пациентов указанных

групп. Для практически здоровых лиц этот комплекс включал определение АРА сыворотки крови; для больных с диспластическими изменениями слизистой оболочки желудка – АРА сыворотки крови, АРА слюны, АРА желудочного сока, ретинола и α -токоферола; для больных раком желудка – АРА сыворотки крови, α -токоферола, ретинола, расчет коэффициента СОД/глутатионпероксидаза. С помощью предложенного комплекса лабораторных показателей для оценки антиоксидантного статуса стало возможным контролировать состояние антиоксидантной системы. Определение уровня общей АРА сыворотки крови, АРА слюны, АРА желудочного сока в комплексе с оценкой уровня опухолевых маркеров СА 72–4 и РЭА может использоваться для уточнения степени онкологического риска среди больных хроническими заболеваниями желудка с умеренной и тяжелой дисплазией эпителия с формированием группы высокого риска. Определение уровня АРА в сыворотке крови и слюне, как наиболее доступных биологических жидкостей, позволяет проводить динамическую оценку показателей антиоксидантного статуса у больных хроническими заболеваниями желудка с умеренной и тяжелой дисплазией. У больных раком желудка оценка уровня АРА сыворотки крови, α -токоферола, ретинола, значения коэффициента СОД/глутатионпероксидаза способствует выявлению группы больных с высокой вероятностью развития послеоперационных осложнений гнойно-воспалительного характера.

ЛИТЕРАТУРА

1. Двойрин В.В., Аксель Е.М., Трапезников Н.Н. Заболеваемость и смертность от злокачественных новообразований населения России и некоторых других стран СНГ в 1993 году. М.: ОНЦ РАМН, 1994. 126 с.
2. Дубинина Е.Е. Некоторые особенности функционирования ферментативной антиоксидантной защиты плазмы крови человека // Биохимия. 1993. Т. 58, вып. 2. С. 268–273.
3. Зырянов Б.Н., Коломиец Л.А., Тузинов С.А. Рак желудка: профилактика, ранняя диагностика, комбинированное лечение, реабилитация. Томск: Изд-во Том. ун-та, 1998. 528 с.
4. Кривова Н.А. Механизмы образования и деградации надэпителиального слизистого слоя: Дис. ... д-ра. биол. наук. Томск, 1994. 254 с.
5. Ланкин В.З., Гуревич С.М. Ингибирование перекисления липидов и детоксикация липоперекисей защитными ферментативными системами // ДАН. 1976. Т. 226, № 3. С. 705–709.
6. Питран Б.В. Усвоение органических и неорганических соединений в организме животных. Рига, 1990. С. 219–241.

7. Серов В.В., Золоторевский И.Б., Берестов А.В. Ранний рак желудка: морфология, гистология, морфогенез // Арх. патологии. 1990. № 5. С. 70–74.
8. Удут В.В., Наумов С.А., Карнов А.Б. и др. Лизоцим слюны в скрининге на рак желудка // Вопр. онкологии. 1992. Т. 38. № 2. С. 177–181.
9. Черняускене Р.Ч., Варшкявичене З.З., Грибаускас П.С. Одновременное флюорометрическое определение концентрации витаминов Е и А в сыворотке крови // Лаб. дело. 1984. № 6. С. 362–365.
10. Чиссов В.И., Белоус Т.А., Франк Г.А. Хроническая язва и рак желудка // Рос. онкол. журн. 1997. № 1. С. 7–10.
11. Bochkareva N.V., Kondakova I.V., Kolomijets L.A. et al. Extracellular antioxidants in gastric precancerous conditions and gastric cancer // Journal of Balcan Union of Oncology. 1998. Vol. 3, № 1. P. 61–65.
12. Buiatti E., Munoz M. Chemoprevention in Cancer Control. IARS Sci. Publ. / Eds. E. Buiatti, M. Hakama, V. Beral, J. Faivre, D.M. Parkin. Lyon: IARC Press, 1996. P. 35–39.
13. Chapple I.L., Mason G.I., Matthews J.B. et al. Enhanced chemiluminescent assay for measuring the total antioxidant capacity of serum, saliva and crevicular fluid // Ann. Clin. Biochem. 1997. № 34. P. 412–421.
14. Fernandez-Fernandez L., Tejero E., Tieso A. et al. Receiver operating characteristic curve analysis of the tumor markers CEA, CA 19–9 and CA 72–4 in gastric cancer // Int. Surg. 1996. № 81 (4). P. 400–402.
15. Halliwell B., Gutteridge J.M., Grootveld M. The antioxidants of human extracellular fluids // Arch. Biochem. and Biophys. 1990. Vol 280 (1). P. 1–8.
16. Harkonen M., Sande N., Sipponen P. et al. Screening on early gastric cancer // Scand. J. of Clin. and Lab. Invest. 1998. Vol. 58, № 228. P. 106.
17. Levin G., Popov I. The antioxidant system of the organism. Theoretical basis and practical consequences // Med. Hypotheses. 1994. № 42. P. 269–275.
18. Lissi E., Clavero N., Faure M. Effect of additives on the inactivation of lysozyme mediated by free radicals produced in the thermolysis of 2,2-azo-bis-(2-amidinopropane) // Free Radic. Res. Comm. 1991. Vol. 14, № 5–6. P. 373–384.
19. Oberley L.W., Spitz D.R. Handbook of Methods for Oxygen Radical Research / Ed. R.A. Greenwaid. FL: CRC Press, Boca Raton, 1986. P. 217–220.
20. Reed P.I., Johnston B.J., Walters C.L., Hill M.J. Relevance to Human Cancer of N-nitroso Compounds, Tobacco, Smoke and Mycotoxins. IARC Sci. Publ. / Eds. I.K.O'Neill. Lyon, 1991. № 105. P. 139–142.
21. Terao J., Nagao A. Antioxidative effect of human saliva on lipid peroxidation // Agr. Biol. Chem. 1991. № 55. P. 869–872.