

А.П. Бурлака  
Є.П. Сидорик  
В.М. Півнюк  
І.І. Ганусевич  
Ю.М. Лещенко  
Ю.В. Горпенко  
В.М. Базась  
М.М. Носко

Інститут  
Київська міська онкологічна  
лікарня, Київ, Україна

**Ключові слова:** церулоплазмін, супероксидні радикал-аніони, оксид азоту, рак шлунка, рак кишечника.

## АКТИВНІСТЬ НАДФН-ОКСИДАЗИ ТА NO-СИНТАЗИ НЕЙТРОФІЛЬНИХ ГРАНУЛОЦИТІВ ХВОРИХ НА РАК ШЛУНКА АБО РАК КИШЕЧНИКУ ПРИ КУРСОВОМУ ЗАСТОСУВАННІ ЦЕРУЛОПЛАЗМІНУ

**Резюме.** Показано, що курсове застосування у хворих на дисемінований рак шлунка або кишечника церулоплазмину для ін'єкцій модулює продукцію нейтрофільними гранулоцитами ефекторних молекул супероксидних радикал-аніонів та оксиду азоту, що є складовою механізму детоксикуючої дії цього білка та стимуляції за його допомогою гемопоезу.

Церулоплазмін (ЦП — мідьвмісний багатфункціональний фермент) використовують для стимуляції гемопоезу, детоксикації, імунологічної корекції у період передопераційної підготовки пацієнтів онкологічного профілю, особливо ослаблених хворих з анемією, інтоксикацією та кахексією; у післяопераційний період у пацієнтів із значною інтраопераційною втратою крові, гнійно-септичними ускладненнями; у складі комбінованої хіміотерапії. Перші дані про роль ЦП як антиоксиданта з'явилися наприкінці 70-х років, коли відкрили його здатність виконувати функцію перехоплювача супероксидних радикал-аніонів [1]. При цьому ферментна (оксидазна) активність ЦП не залежить від його взаємодії з речовинами, попередньо відновленими супероксидом, а швидше, залежить від взаємодії з самим  $O_2^-$  [2]. Як з'ясовано, ця функція ЦП є подібною до аналогічної супероксиддисмутази (СОД). Пізніше встановили, що реакція окислення за участю ЦП відрізняється від істинного дисмутування, яке каталізується СОД, тим, що замість кисню у ній присутній  $O_2^-$ . ЦП також перешкоджає накопиченню та дії токсичних окислювальних радикалів у плазмі крові за рахунок пероксидазної активності.

Каталізуючи окиснення  $Fe^{2+}$  до  $Fe^{3+}$ , ЦП підтримує співвідношення ( $Fe^{2+}/O_2$ ), яке дорівнює  $4/1$ , забезпечуючи при цьому перенесення на  $O_2$  4 електронів з утворенням води, та попереджує неферментативну реакцію, у результаті якої утворюється  $O_2^-$ . Окиснюючи  $Fe^{2+}$  до  $Fe^{3+}$ , ЦП може попереджати запуск реакції Фестона — утворення супероксидантних радикалів при взаємодії  $Fe^{2+}$  з  $H_2O_2$ . Сприяючи вбудовуванню у феритин окисненого  $Fe^{3+}$ , ЦП інгібує супероксидантне та феритинзалежне перекисне окислення ліпідів (ПОЛ) [4]. Перелічені властивості ЦП можуть бути підґрунтям його протизапальної активності та дезінтоксикуючої дії [5]. Швидке підвищення концентрації ЦП (у 2–3 рази) у кров'яному руслі вже на початку запальної реакції дозволяє віднести його до білків гострої фази. Поряд з цим ЦП може виступати як засіб дезінтоксикації внаслідок антиоксидантних властивостей [6].

З метою поглибленого вивчення механізмів біологічних і клінічних ефектів препарату ЦП проведено дослідження нейтрофільних гранулоцитів хворих онкологічного профілю, спроможності генерувати ефекторні молекули — супероксидні радикал-аніони і оксид азоту; проведена також оцінка рівнів активної форми ЦП у крові хворих.

Дослідження проведено за участю 27 пацієнтів, які проходили лікування у Київській міській онкологічній лікарні, з них 12 — з приводу раку шлунка, 15 — з приводу раку кишечника. Всього у дослідну групу увійшло 17 чоловіків та 10 жінок. Вік хворих коливався від 41 до 69 років. В усіх хворих діагностовано дисеміновану форму захворювання. У 10 хворих уперше встановлено IV стадію пухлинного процесу, а у 17 реєстрували метастази внаслідок продовження хвороби після проведеного радикального лікування. Усіх хворих виявлено інтоксикацію та вторинну анемію різного ступеня, що визначали за класифікацією ВООЗ.

Для зменшення вираженості анемії [7] та інтоксикації у хворих застосовували 2% розчин ЦП для ін'єкцій («Біофарма»), що вводили внутрішньовенно, крапельно протягом 30–40 хв у дозі 100 мг на 200 мл фізіологічного розчину хлориду натрію щоденно протягом 5 днів. Сумарна доза становила 500 мг на курс лікування.

Ефективність препарату визначали за динамікою рівня гемоглобіну та вмісту еритроцитів до і після курсового застосування.

Досліджували венозну кров на 3% розчині трилону Б. Нейтрофільні гранулоцити виділяли з крові за стандартною методикою на градієнті щільності фікол/верографін. Дослідження швидкостей генерування супероксидних радикал-аніонів НАДФН-оксидазою нейтрофільних гранулоцитів проводили методом електронного парамагнітного резонансу (ЕПР) з використанням спінового уловлювача 2,2,6,6-тетраметил-оксипіперидину (Росія) при кімнатній температурі у спеціальній кварцовій кюветі. Рівні NO, синтезованого iNOS нейтрофільних гранулоцитів оцінювали методом ЕПР з використанням спінового уловлювача

## КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

диетилдитиокарбому (ДЕТК «Sigma») при температурі рідкого азоту (77 °К). Рівні фізіологічно активної форми ЦП досліджували методом ЕПР у цільній крові хворих при температурі рідкого азоту (77 °К).

Показано, що після проведеного курсового лікування з використанням 2% розчину ЦП (для ін'єкцій) у 80% хворих відзначають підвищення вмісту гемоглобіну у периферичній крові з  $85,70 \pm 3,38$  до  $96,29 \pm 3,65$  г/л ( $p \leq 0,0001$ ). При цьому кількість еритроцитів мала лише тенденцію до збільшення — з  $(3,48 \pm 0,23)$  до  $(3,75 \pm 0,22)$  Т/л ( $p \geq 0,05$ ). Загальна кількість хворих з анемією середнього ступеня за класифікацією ВООЗ зменшилась з 63 до 42%, відповідно збільшилась кількість хворих з незначною анемією — з 24 до 42%; у 2 хворих гемоглобін нормалізувався. Ці об'єктивні зміни супроводжувалися покращанням загального стану більшості пацієнтів: зменшенням вираженості слабкості, втоми, запаморочення, серцебиття, покращанням апетиту, підвищенням фізичної активності. У частини хворих стало можливим проведення курсів поліхіміотерапії з включенням препаратів платини, що, як відомо, має значний пригнічувальний вплив на утворення гемоглобіну [8].

Встановлено, що застосування ЦП не впливає на NO-синтазу функцію нейтрофільних гранулоцитів. Рівень NO, що продукувався iNOS нейтрофільних гранулоцитів, після введення препарату залишився таким, який реєстрували до проведення курсу лікування:  $1,56 \pm 0,49$  проти  $1,50 \pm 0,53$  нмоль/10<sup>3</sup>кл ( $p > 0,1$ ). Показано зниження ( $p < 0,05$ ) швидкості продукції супероксидних радикал-аніонів, що генеруються нейтрофільними гранулоцитами, у хворих після введення досліджуваного препарату (рис. 1). У цих хворих відзначено також підвищення у крові рівнів активної форми ЦП (рис. 2). На другий день після закінчення введення препарату рівень вмісту функціонально активної форми ендogenous ЦП у крові перевищував вихідні значення, характерні для цих хворих, на 51%.

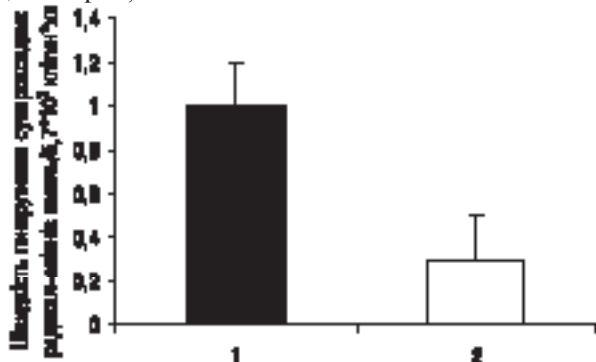


Рис. 1. Швидкість генерування супероксидних радикал-аніонів НАДФН-оксидазою нейтрофільними гранулоцитами крові до застосування (1) і після застосування (2) ЦП у хворих на рак шлунково-кишкового тракту

Таким чином фармакопейний препарат ЦП (розчин для ін'єкцій) гальмує спроможність нейтрофілів генерувати супероксидні радикал-аніони, не впливає на активність iNOS цих клітин, а також підвищує рівень парамагнітної форми ЦП у крові хво-

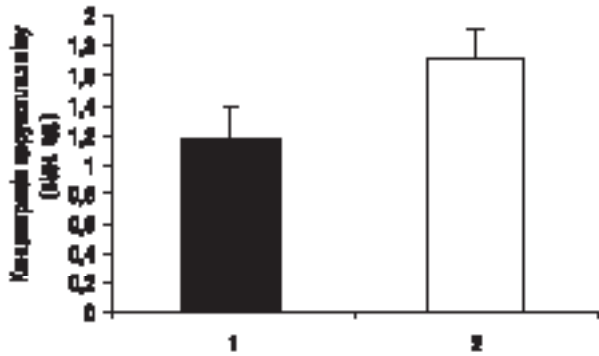


Рис. 2. Рівні ендogenous ЦП у крові хворих на рак шлунково-кишкового тракту до застосування (1) і після застосування (2) розчину ЦП для ін'єкцій

рих на рак шлунково-кишкового тракту. Ці позитивні зміни супроводжуються підвищенням вмісту гемоглобіну периферичної крові хворих, зменшенням ступеня анемії, покращанням якості життя та дає можливість подальшого продовження лікування хворих препаратами платини.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Gutteride J. Caeruloplasmin: a plasma protein, enzyme and antioxidant *Ann Clin Biochem* 1978; **15**: 293–6.
2. Bannister J, Bannister W, Hill H, *et al.* Does caeruloplasmin dismutate superoxide? *FEBS Lett* 1980; **118**: 127–9.
3. Gutteride J. Inhibition of the Fenton reaction by the protein caeruloplasmin and other copper complexes. Assessment of ferroxidase and radical scavenging activities. *Chem Biol Interac* 1985; **56**: 113–20.
4. Juan SH, Aust SD. Studies on the interaction between ferritin and caeruloplasmin. *Arch Biochem Biophys* 1993; **355**: 56–62.
5. Atanasi RL, Stea D, Mateescu MA, *et al.* Direct evidence of caeruloplasmin antioxidant properties. *Mol Cell Biochem* 1998; **189**: 127–35.
6. Senyuk OF, Skorobogatko OV, Tarasenko PD, *et al.* Examination of physiologic functions of human caeruloplasmin. Influence of caeruloplasmin on normal and pathologic immunocytes. *Biochemistry* 1994; **59** (10): 1503–10.
7. Півнюк, ВМ, Касьяненко ІВ, Олійніченко ГП та ін. Новий препарат церулоплазміну в лікуванні хворих онкологічного профілю. *Онкологія* 2004; **6** (1): 63–5.
8. Возный ЭК, Ганьшина ИП. *Фарматека* 2004; **14**: 30–5.

## ACTIVITY OF NEUTROPHIL NADF-H-OXSIDACE AND NO SYNTETASE FROM PATIENTS WITH GASTRIC OR INTESTINAL CANCER DURING COURSE OF TREATMENT WITH CERULOPLASMIN

A.P. Burlaka, E.P. Sidorik, V.M. Pivniuk, I.I. Ganusevich, Yu.M. Leshsenko, Yu.V. Gorpenko, V.M. Bazas', M.M. Nosko

**Summary.** It was demonstrated that course of caeruloplasmin treatment in patients with extensive gastric and intestinal cancer can modulate the effectors molecules production of superoxide-anions and NO by neutrophils, that is part of mechanism of detoxicating action and stimulation of hematopoies by this protein.

**Key Words:** caeruloplasmin, superoxide radical-anion, nitricoxide, gastric cancer, intestinal cancer.