

УДК 616-006: 621.386.85:577.152.34: 57.042.2: 616.018.1-092: 612.017.1

© В.А. Кубышкин, 2010.

## ПРОТЕОЛИЗ, АПОПТОЗ И АНТИЭНДОТОКСИНОВЫЙ ИММУНИТЕТ ПРИ ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ ПОСЛЕ ОПЕРАТИВНОГО ЛЕЧЕНИЯ

В.А. Кубышкин

*Кафедра лучевой диагностики и лучевой терапии (заведующий кафедрой - профессор А.И. Крадинов),  
Крымский государственный медицинский университет им. С. И. Георгиевского, г. Симферополь.*

### PROTEOLYSIS, APOPTOSIS AND ANTIENDOTOXIN IMMUNITY IN X-RAY THERAPY OF CANCER PATIENTS AFTER SURGICAL TREATMENT

V.A. Kubyshkin

#### SUMMARY

Influence of X-ray therapy on the state of the components of protease-inhibitor system, apoptosis factors and humoral and antiendotoxin immunity in the serum of 42 patients with cervix and uterine cancer after radical surgical treatment and without surgery it was investigated. In operated patients the more intensive normalization of proteolysis, increase level of tumor nekrosis factor - alpha and decrease antiendotoxin and humoral immunity it was found. The level of proteolysis normalization and growth of tumor necrosis factor may use such as a criterion of the effectiveness of radiation therapy, but inhibition of humoral and antiendotoxin immunity requires additional approaches to the correction.

### ПРОТЕОЛІЗ, АПОПТОЗ І АНТИЕНДОТОКСИНОВИЙ ІМУНІТЕТ ПРИ ПРОМЕНЕВІЙ ТЕРАПІЇ ОНКОЛОГІЧНИХ ХВОРИХ ПІСЛЯ ОПЕРАТИВНОГО ЛІКУВАННЯ

В.А. Кубишкін

#### РЕЗЮМЕ

Проведено дослідження впливу променевої терапії на стан компонентів протеїназ-інгібіторної системи, факторів апоптозу та показники гуморального і антиендотоксिनного імунітету сироватки крові 42 хворих із злоякісними новоутвореннями шийки і тіла матки після радикального оперативного лікування і без операції. Встановлено, що у оперованих хворих спостерігається більш виражена нормалізація показників протеолізу та зростання рівня туморнекротического фактора - альфа на тлі зниження гуморального і антиендотоксिनного імунітету. Ступінь нормалізації показників протеолізу та зростання фактора некрозу пухлин може бути критерієм ефективності променевої терапії, а пригнічення гуморального та антиендотоксिनного імунітету вимагає додаткових підходів до корекції.

**Ключевые слова:** злокачественные опухоли, лучевая терапия, протеиназы, ингибиторы протеиназ, апоптоз, антиэндоксинный иммунитет

Развитие современной радиационной онкологии (лучевой терапии) базируется на постоянном углублении знаний не только об этиологии и патогенезе злокачественных новообразований, клиническом течении заболеваний, но и оценке реакций опухолевых и нормальных тканей организма на различные виды ионизирующих излучений [1, 12, 13].

Лучевая терапия применяется как самостоятельный метод, а также в комплексном и комбинированном лечении 85-90% случаев злокачественных опухолей.

Для опухолей характерна разная радиочувствительность, которая зависит от их морфологической структуры, локализации, стадии развития и других факторов, вследствие чего поиск критериев для оценки эффективности лучевой терапии остается актуальной задачей [2]. В качестве таких критериев могут

служить компоненты биологически-активных систем, играющих существенную роль в патогенезе злокачественных новообразований [2,6,9].

При этом особое значение приобретает выявление метаболически важных показателей, определение которых позволяет представить изменения всей системы клеточного метаболизма в условиях воздействия лучевой терапии на организм. К таким показателям можно отнести компоненты протеиназ-ингибиторной системы, апоптоза и антиэндоксинного иммунитета [2,6,10,11].

Причем проведение сравнительных исследований в группах прооперированных и непрооперированных больных могут позволить с некоторой степенью достоверности говорить об эффектах лучевой терапии, связанных с ее непосредственным влиянием на опухоль или на организм в целом.

Цель работы – выявить особенности в реакциях протеолитических, апоптотических и антиэндоксинных механизмов организма при лучевой терапии злокачественных новообразований у прооперированных и непрооперированных больных.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Под наблюдением находились больные с онкопатологией, проходившие лечение в отделении лучевой терапии Крымского Республиканского онкологического диспансера. Всего обследовано 42 больных с онкопатологией. Для характеристики больных использовали классификацию TNM. Распространенность опухоли и ее точная локализация были уточнены на основе обследования, данных компьютерной томографии, обычного рентгенологического и рентгеномографического исследований. У большинства больных диагноз был гистологически верифицирован. Возраст основной массы больных был в пределах 50-70 лет.

Больные были распределены на 2 группы. В первой группе лучевую терапию получали 17 больных с опухолями тела матки после проведенного радикального оперативного лечения. Во второй группе, которая была группой сравнения, лучевую терапию получали 25 пациентов с опухолями тела и шейки матки без оперативного лечения. 93% обследованных пациентов были с опухолями T2-T3 стадии. Контрольную группу составили 14 здоровых людей.

Лучевую терапию применяли согласно стандартных схем лучевой терапии. У больных с опухолью тела матки проводили лучевую терапию в суммарной очаговой дозе 30-45 Гр. У больных с опухолью шейки матки суммарная очаговая доза при I стадии составляла 36–38 Гр, II стадии – 40–42 Гр, III стадии – 44–46 Гр. У прооперированных больных лучевая терапия проводилась с соответствующей коррекцией.

Материалом исследования служила сыворотка крови больных с онкопатологией, полученная в начале и в конце курса лучевой терапии. Кровь для исследований получали из локтевой вены. Сыворотку крови получали из нестабилизированной крови путем центрифугирования в течение 15 минут при 3 000 об/мин после предварительного охлаждения.

Определение трипсиноподобной активности (ТПА) проводили на основании измерения скорости отщепления N-бензоил-L-аргинина (БА) от синтетического субстрата этилового эфира N- $\alpha$ -бензоил-L-аргинина (БАЭЭ) (Reanal) [5].

Определение эластазоподобной активности (ЭПА) проводили по изучению скорости гидролиза синтетического субстрата N-t-вос-аланил-n-нитрофенилового эфира (БАНФЭ) [8]. Концентрацию альфа-1-ингибитора протеиназ ( $\alpha_1$ -ИП) проводили на основании торможения расщепления трипсином белковых и низкомолекулярных субстратов этилового эфира N- $\alpha$ -бензоил-L-аргинина (БАЭЭ) (Reanal) [7]. При определении активности кислотостабильных ингиби-

торов (КСИ) предварительная подготовка сыворотки крови заключалась в ее прогревании при кислых значениях pH для полной инактивации лабильных ингибиторов. Для этого сыворотку, предварительно разбавленную цитратным буфером до pH 4,1 прогревали в течение 30 мин при 60°C. Дальнейшее определение проводили, как описано для  $\alpha_1$ -ингибитора протеиназ [7].

Из показателей апоптоза для определения были выбраны три ключевых компонента, которые участвуют в формировании апоптотической реакции на разных этапах ее развития: фактор некроза опухоли- (TNF- $\alpha$ ), каспазу 8 и p53 протеин. Определение перечисленных показателей осуществляли методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием соответствующих коммерческих тест-систем. TNF- $\alpha$  определяли с помощью иммуноферментного набора «Вектор-БЕСТ» (Россия), каспазу 8 и p53 - с помощью иммуноферментных наборов «Bender MedSystems» (Австрия).

Анти-ЭТ-антитела классов А, М и G (соответственно анти-ЭТ-IgA, анти-ЭТ-IgM и анти-ЭТ-IgG) определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа, применяя протоколы, разработанные в лаборатории клинической иммунологии ЦНИЛ Крымского государственного медицинского университета им. С.И. Георгиевского. В качестве антигена использовали коммерческий препарат липополисахарида *E. coli* K235 (Sigma Chem. Co., USA). Уровни анти-ЭТ-IgA, анти-ЭТ-IgM и анти-ЭТ-IgG выражали в условных единицах оптической плотности для разведения тестируемой сыворотки крови 1:50 [3].

Содержание общих иммуноглобулинов классов А, М и G (соответственно IgA, IgM и IgG) в сыворотке крови определяли микротурбидиметрическим методом [4].

Статистическая обработка полученных данных проведена методами вариационной статистики с вычислением средних величин (M) и оценкой вероятности расхождений (m). В качестве критерия при оценке достоверности наблюдаемых изменений соответствующих показателей использовали t-критерий Стьюдента. За достоверную принималась разность средних значений при  $p < 0,05$ .

Для оценки эффекта воздействия лучевой терапии применялись непараметрические методы, включающие критерий знаков и парный критерий Вилкоксона. Статистические расчеты выполняли в среде электронных таблиц Excel для Microsoft Office.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенный анализ показал, что у прооперированных и не прооперированных больных существуют различия в состоянии протеиназ-ингибиторной системы. В частности, у прооперированных больных активность трипсиноподобных протеиназ до лучевой терапии была на 46% ниже, чем у больных с наличием опухоли (табл. 1).



Эластазоподобные протеиназы в крови менялись менее существенно. Проведение лучевой терапии приводило к разнонаправленной тенденции сдвигов трипсиноподобной активности. У прооперированных больных наблюдался рост трипсиноподобной активности, значения которой становились достоверно выше контрольного уровня. В тоже время у больных с наличием опухоли ТПА снижалась, хотя продолжала оставаться достоверно выше контрольных значений.

Исходные значения ингибиторов протеиназ в сыворотке крови также отличались у прооперированных и не прооперированных больных. Альфа-1-ингибитор протеиназ у прооперированных больных был несколько ниже, чем у не прооперированных, и достоверно не отличался от контроля. Проведение лучевой терапии у прооперированных больных приводило хоть и к незначительному, но еще большему

снижению уровня  $\alpha$ -1-ИП, в то время как у больных с наличием новообразования лучевая терапия стимулировала активацию  $\alpha$ -1-ингибитора.

Как видно из представленных данных, прослеживается четкая тенденция разнонаправленных сдвигов в содержании  $\alpha$ -1-ингибитора протеиназ у больных, которым проводилось и не проводилось оперативное лечение. Состояние кислотостабильных ингибиторов протеиназ во всех группах больных было достоверно выше, чем в контроле. Следует отметить, что в группе больных с оперативным лечением уровень ингибиторов был несколько выше, чем у больных с опухолями, но лучевая терапия практически не приводила к сколь либо значимым изменениям активности КСИ.

Определение факторов апоптоза показало, что наиболее существенно при опухолях и проведении лучевой терапии изменялся уровень TNF- $\alpha$  (Табл. 2).

Таблица 2

**Изменения показателей апоптоза в сыворотке крови больных с опухолями при лучевой терапии у оперированных и неоперированных больных, (M $\pm$ m)**

Группы больных	Показатели					
	TNF- $\alpha$ пг/мл		Каспаза – 8 нг/мл		P-53 ц/мл	
	До лучевой терапии	После лучевой терапии	До лучевой терапии	После лучевой терапии	До лучевой терапии	После лучевой терапии
Контроль n = 14	0,21 $\pm$ 0,16		0,048 $\pm$ 0,039		1,20 $\pm$ 0,63	
После-операционная лучевая терапия n = 17	* 2,37 $\pm$ 1,03	* ** 8,93 $\pm$ 1,35	0	0,020 $\pm$ 0,014	0,37 $\pm$ 0,16	0,20 $\pm$ 0,16
Лучевая терапия без операционного лечения n = 25	* 2,70 $\pm$ 0,72	* ** 5,47 $\pm$ 3,20	0,064 $\pm$ 0,051	0,127 $\pm$ 0,065	1,54 $\pm$ 0,72	1,58 $\pm$ 0,82

Примечание: Звездочками обозначена достоверность различий: одна звездочка ( $p < 0,05$ ) по отношению к контролю (критерий Стьюдента); две звездочки – по отношению до и после лучевой терапии (критерий знаков).

В группе прооперированных больных он был несколько ниже, чем в группе больных с наличием опухоли, но превосходил контроль более чем в 11 раз ( $p < 0,001$ ). Лучевая терапия в обеих группах приводила к достоверному росту показателя. Но если в группе без оперативного лечения наблюдалось двукратное увеличение показателя, то в группе прооперированных больных TNF- $\alpha$  увеличивался по сравне-

нию с уровнем до лучевой терапии в 3,8 раза ( $p < 0,001$ ). В состоянии каспазы 8 и p53 достоверных тенденций сдвигов выявлено не было.

Проведенные исследования состояния гуморального антиэндоксинного иммунитета показали, что у больных с опухолями и после оперативного лечения отмечались схожие изменения в уровне антиэндоксинных антител (табл.3).

Таблица 3

Изменения уровня антиэндотоксиновых антител сыворотки крови больных с опухолями при лучевой терапии у оперированных и неоперированных больных, ( $M \pm m$ )

Группы больных	Показатели					
	Анти-Ig A мг/мл		Анти -Ig M мг/мл		Анти -Ig G мг/мл	
	До лучевой терапии	После лучевой терапии	До лучевой терапии	После лучевой терапии	До лучевой терапии	После лучевой терапии
Контроль n = 14	0,18±0,01		0,22±0,02		0,31±0,03	
Послеоперационная лучевая терапия n = 17	0,21±0,02	0,18±0,02	0,12±0,03*	0,09±0,02*	0,52±0,08*	0,44±0,08**
Лучевая терапия без операционного лечения n = 25	0,31±0,03*	0,28±0,03*	0,14±0,02*	0,13±0,01*	0,50±0,05*	0,46±0,04*

Примечание: Звездочками обозначена достоверность различий: одна звездочка ( $p < 0,05$ ) по отношению к контролю (критерий Стьюдента); две звездочки – по отношению до и после лучевой терапии (критерий знаков).

Уровни анти-ЭТ-IgA и анти-ЭТ-IgG были повышены до проведения лучевой терапии, а уровень анти-ЭТ-IgM был снижен. Проведение курса лучевой терапии приводило к снижению всех трех показателей. Причем для анти-ЭТ-IgG в группе проопе-

рированных больных это снижение составляло 15% и было достоверно при использовании критерия знаков. Описанные изменения антиэндотоксинового иммунитета происходили на фоне изменений в состоянии гуморального иммунитета (табл.4).

Таблица 4

Изменения уровня иммуноглобулинов сыворотки крови больных с опухолями при лучевой терапии у оперированных и неоперированных больных, ( $M \pm m$ )

Группы больных	Показатели					
	Ig A, мг/мл		IgM, мг/мл		Ig G, мг/мл	
	До лучевой терапии	После лучевой терапии	До лучевой терапии	После лучевой терапии	До лучевой терапии	После лучевой терапии
Контроль n = 14	2,78±0,30		2,27±0,32		13,76±1,12	
Послеоперационная лучевая терапия n = 17	2,73±0,35	2,53±0,35	1,57±0,33*	1,23±0,18*	11,33±1,76	10,71±1,31*
Лучевая терапия без операционного лечения n = 25	3,64±0,29*	3,08±0,23**	2,00±0,19	2,11±0,20	13,78±0,85	13,56±0,88

Примечание: Звездочками обозначена достоверность различий: одна звездочка ( $p < 0,05$ ) по отношению к контролю (критерий Стьюдента); две звездочки – по отношению до и после лучевой терапии (критерий знаков).

В частности, отмечена тенденция к снижению уровня иммуноглобулинов всех классов в группе прооперированных больных. Причем лучевая терапия приводила к еще более выраженному снижению IgM по отношению к контролю на 46% ( $p < 0,01$ ) и IgG на 23% ( $p < 0,05$ ). В группе непрооперированных больных следует отметить повышение уровня IgA на 31% ( $p < 0,01$ ) по сравнению с контролем. Однако при проведении лучевой терапии уровень IgA достоверно снижался на 15% и терял достоверное отличие по сравнению с контролем,

Полученные результаты активности протеиназ и их ингибиторов, факторов апоптоза и показателей гуморального и антиэндотоксического иммунитета при лучевой терапии в группах прооперированных и непрооперированных больных позволяют в некоторой степени вычлнить эффекты лучевой терапии, связанные с непосредственным влиянием на опухоль и на организм в целом. При этом у прооперированных больных по сравнению с непрооперированными следует выделить тенденции к нормализации показателей протеолиза и ингибиторов протеиназ, более низкого уровня TNF- $\alpha$  и не столь повышенных значений показателей антиэндотоксического иммунитета. Проведение лучевой терапии приводило к более выраженной нормализации показателей протеолиза и более интенсивному росту уровня TNF- $\alpha$  в группе прооперированных больных.

В связи с этим можно предположить, что нормализация показателей протеолиза и рост уровня TNF- $\alpha$  можно рассматривать как диагностический критерий, свидетельствующий об эффективности проводимой лучевой терапии.

В тоже время тенденция к снижению уровня иммуноглобулинов и антиэндотоксических антител как в группе прооперированных, так и не прооперированных больных позволяет прийти к заключению, что снижение гуморального и антиэндотоксического иммунитета при лучевой терапии более свидетельствует о дополнительном угнетении иммунной системы. Этот факт следует учитывать при проведении лучевой терапии с целью коррекции состояния иммунной системы и снижения уровня эндотоксемии.

#### ВЫВОДЫ

1. Более интенсивная нормализация показателей протеиназ-ингибиторной системы при применении лучевой терапии в группе прооперированных больных свидетельствует о возможности использования данных изменений для оценки эффективности лучевой терапии.

2. Выраженный рост TNF- $\alpha$  при проведении лучевой терапии позволяет рекомендовать использование данного показателя в качестве критерия ее эффективности.

3. Снижение гуморального и антиэндотоксического иммунитета при проведении лучевой терапии

у прооперированных и непрооперированных больных можно расценивать как не благоприятный эффект лучевой терапии, требующий проведения дополнительной коррекции иммунного статуса и эндотоксемии.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Акимов А.А., Иванов С.Д., Хансон К.П. Апоптоз и лучевая терапия злокачественных новообразований // Вопросы онкологии. – 2003. – Т. 49, № 3. – С. 261-269.
2. Антонов В.Г., Козлов В.К. Патогенез онкологических заболеваний: иммунные и биохимические феномены и механизмы // Цитокины и воспаление. – 2004. – 3, №1. – С. 8-19
3. Гордиенко А.И. Новый подход к повышению специфичности определения антител к липополисахаридам грамотрицательных бактерий методом твердофазного иммуноферментного анализа // Укр. біохімі. журн. – 2004. – 76, №6. – С. 130-135
4. Гордиенко А.И., Белоглазов В.А. Микротурбидиметрический метод определения Ig G, IgM и IgA человека // Имунологія та алергологія. – 2000. – № 1. С. 12-15
5. Кринская А.В., Пасхина Т.С. Количественное определение калликреина и калликреиногена в сыворотке (плазме) крови человека // Современные методы биохимии. – М.: Медицина, 1977. – С. 163-170.
6. Кубышкин В.А., Паленая Ю.В., Кубышкин А.В., Опрышко В.В. Роль протеиназ-ингибиторной системы в процессах канцерогенеза // Загальна патологія та патологічна фізіологія. – 2007. – №1. – с. 9-16
7. Нартикова В.Ф., Пасхина Т.С. Унифицированный метод определения активности  $\beta_1$ -антитрипсина и  $\beta_2$ -макроглобулина в сыворотке (плазме) крови человека // Вопросы медицинской химии. – 1979. – № 4. – С. 494-499.
8. Оглоблина О.Г., Платонова Л.В., Мясникова Л.В., Лившиц М.Б., Пасхина Т.С. Активность протеиназ гранулоцитов и уровень кислотостабильных ингибиторов протеиназ в бронхоальвеолярном секрете детей с бронхопатиями различной этиологии // Вопросы медицинской химии. – 1980. – № 3. – С. 387-392.
9. Hengartner M.O. The biochemistry of apoptosis (comment). // Nature. – 2000. – 407. – P. 770-776.
10. Kaufmann S.H., Hengartner M.O. Programmed cell death: alive and well in the new millennium // Trends Cell Biol. – 2001. – 11. – P. 526-534.
11. Skrzydlewska E., Sulkowska M., Koda M., Sulkowski S. Proteolytic-antiproteolytic balance and its regulation in carcinogenesis // World J. Gastroenterol. – 2005. – № 11(9). – P. 1251-1266
- 12.155. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy / M.I. Ghobrial, T.E. Witzig, A.A. Adjei, K.C. Anderson // Cancer Journal for Clinical. – 2005. – № 55. – P. 178-194.
- 13.170. Zhivotovsky B., Joseph B., Orrenius S. Tumor radiosensitivity and apoptosis // Experimental Cell Research. – 1999. – V. 248. – P. 10-17.