ОЦІНКА ІНТЕНСИВНОСТІ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ ТА АКТИВНОСТІ КАТАЛАЗИ В СИСТЕМІ «СИРОВАТКА КРОВІ-ЕРИТРОЦИТ» У ХВОРИХ НА РАК ГОРТАНІ

ДУ «Інститут отоларингології ім. проф. О.С. Коломійченка НАМН України»
(дир. – акад. НАМН України, проф. Д.І. Заболотний)

Згідно вільнорадикальної теорії канцерогенезу, при фізіологічних умовах утворення активних форм кисню та нітрогену (АФК і АФА) відповідає вимогам клітинного метаболізму, що забезпечує нормальну життєдіяльність клітин. При надмірному утворенні в організмі АФК і АФА реалізується їх альтеративний вплив, зокрема у клітинах відбувається порушення регуляторних і захисних функцій [13, 15]. Вільні радикали ініціюють реакції ПОЛ, що призводить до пошкодження мембран, порушення їх функцій та підвищують імовірність неопластичної трансформації [4].

АФК є одним з канцерогенних факторів, які присутні на всіх стадіях розвитку пухлини. Ці високореактивні похідні здатні викликати пошкодження ліпідного бішару клітинних мембран, білкових молекул і безпосередньо ДНК. В організмі існує багатокомпонентна система антиоксидантного захисту (АОЗ), що обмежує надмірну інтенсифікацію вільнорадикальних процесів і захищає організм від продуктів цих реакцій. Проте при тривалій дії і надмірній інтенсифікації процесів окиснення АОЗ не в змозі їм протидіяти, внаслідок чого розвивається оксидативний стрес. Це призводить до підвищення ризику утворення і росту пухлини [8, 15].

Розвиток злоякісних новоутворень супроводжується глибокими порушеннями прооксидантно-антиоксидантного балансу в організмі пухлиноносія, тяжкість яких залежить від стадії захворювання та розмірів пухлини [1, 9, 11]. Кореляція ступеня вира-

женості цих порушень і тривалості життя пацієнтів було показано для хворих з множинною мієломою, раком молочної залози, шлунку, яєчників [1, 9, 11, 17]. Відомості про стан і динаміку прооксидантно-антиоксидантного статусу у хворих на злоякісні новоутворення орофарингеальної зони є уривчастими та суперечливими.

Метою роботи було дослідити інтенсивність перекисного окиснення ліпідів та активність каталази у хворих на рак гортані.

Методи і матеріали

У дослідженні брали участь 40 чоловіків з первинними злоякісними новоутвореннями гортані у віці від 45 до 65 років, які знаходились на стаціонарному лікуванні у відділенні онкопатології ЛОР-органів ДУ «Інститут отоларингології ім. проф. О.С. Коломійченка НАМН України». Всі пацієнти були проінформовані і надали письмову згоду на участь у дослідженні. З них у 20 пацієнтів діагностовано плоскоклітинний ороговілий рак гортані II-ї стадії та у 20 – III-ї стадії. Контрольну групу склали 20 умовно здорових людей. Усі групи були рандомізовані за віком і статтю.

Об'єктами досліджень було обрано сироватку крові та суспензію еритроцитів людини. Кров отримували з кубітальної вени натщесердце у пластикові пробірки без антикоагулянту та з 3,8% натрій цитратом у співвідношенні 9 до 1. Сироватка крові отримувалась з цільної крові після інкубування при +37 °С протягом 30 хв. та центрифугування при частоті обертання

4000 об/хв. протягом 20 хв. Для отримання суспензії еритроцитів цитратну кров тричі відмивалась 0,9% розчином натрій хлориду шляхом центрифугування при частоті обертання 1500 об/хв. протягом 10 хв. [14].

Вміст ТБК-позитивних продуктів в плазмі крові та еритроцитах визначався за методом Гончаренко та співавторів [6]. Метод дозволяє оцінити інтенсивність перекисних процесів за концентрацією в плазмі крові та еритроцитах одного з кінцевих продуктів ПОЛ – малонового діальдегіду (МДА), що визначається в реакції з 2-тіобарбітуровою кислотою (ТБК). Окрім МДА, забарвлені комплекси з ТБК також можуть утворювати ряд низькомолекулярних сполук, тому в кінцевому результаті реакції визначалась сума ТБК-позитивних продуктів. Одночасне їх визначення в плазмі та еритроцитах є більш інформативним, оскільки продукти вільнорадикального окиснення можуть дифундувати з клітин.

Вміст дієнових кон'югатів гідропероксидів ліпідів (ДК) в сироватці крові та еритроцитах досліджувався за методом Плацера в модифікації В.Б. Гаврилова та М.І. Мішкорудної [5]. Цей метод заснований на встановленні вмісту первинних продуктів ПОЛ у крові за поглинанням ліпідним екстрактом монохроматичного світлового потоку в ультрафіолетовій області спектра, так як молекули з двома спряженими зв'язками

(дієнові кон'югати) мають максимум поглинання при довжині хвилі 233 нм. Вміст ДК визначався окремо в сироватці крові та в еритроцитах. Для цього еритроцитарна маса розводилась в 50 разів 0,9% розчином натрій хлориду.

Каталазна активність визначалась за методом Королюка та співавторів [10]. В основі методу здатність пероксиду водню утворювати з солями молібдену стійкий забарвлений комплекс. Визначення каталазної активності проводилось окремо в сироватці крові та в еритроцитах. Для цього еритроцитарна маса розводилась в 60 разів 0,9% розчином натрій хлориду.

Статистична обробка результатів проводилась за допомогою пакету програм для статистичної обробки біометричних даних WinPEPI. Для оцінки різниці між пацієнтами та групою контролю було використано t-критерій Стюдента з урахуванням рекомендацій Є.В. Гублера [7] та Е.В. Мальцева [12]. Різниця вважалась статистично достовірною при $p < 0,05$.

Результати дослідження та їх обговорення

В ході наших досліджень було виявлено зміни вмісту продуктів перекисного окиснення ліпідів та каталазної активності в сироватці крові хворих при II-й та III-й стадіях раку гортані (табл. 1).

Таблиця 1

Вміст продуктів ПОЛ та каталазна активність у сироватці крові хворих на рак гортані

Показники	Групи обстежених		
	практично здорові особи, n=20	хворі на рак гортані	
		II-ї стадії, n=20	III-ї стадії, n=20
Дієнові кон'югати, од. оп. /мл	4,54±0,38	6,12±0,57*	7,16±0,89*
ТБК-позитивні продукти, мкмоль/л	33,65±2,07	41,67±2,68*	52,88±6,61*
Каталаза, мкат/л	4,06±0,50	2,72±0,34*	2,76±0,23*

Примітка: * – достовірність різниці між групою практично здорових осіб та відповідними показниками групи хворих ($p < 0,05$).

Встановлено підвищення рівня ДК у хворих раку гортані II-ї та III-ї стадій в 1,4 та 1,6 рази, відповідно, порівняно з групою

контролю. Рівень ТБК-позитивних продуктів у хворих з II-ю стадією раку гортані підвищувався в 1,2 рази, з III-ю – в 1,6 рази, тобто,

їх вміст збільшувався по мірі прогресування пухлинного процесу. Було також відмічено зниження каталазної активності відносно її контрольної величини при обох стадіях раку гортані в середньому у 1,5 рази.

Отримані нами результати узгоджуються з даними літератури, згідно яких порушення в прооксидантно-антиоксидантних системах у пацієнтів з місцево-поширеним раком порожнини рота і глотки корелюють зі стадією захворювання: зростає рівень

малонового діальдегіду і знижується активність антиоксидантної системи захисту [13]. ПОЛ є одним з важливих процесів для підтримки гомеостазу і корекції інтоксикаційних явищ в організмі. Ця система має особливе значення для зрілих еритроцитів, позбавлених апарату синтезу білка і тому практично не здатних до репаративних процесів [16]. Тому другий етап роботи був присвячений дослідженню цих показників в еритроцитах хворих на рак гортані (табл. 2).

Таблиця 2

Вміст продуктів ПОЛ та каталазна активність в еритроцитах хворих на рак гортані

Показники	Групи обстежених		
	практично здорові особи, n=20	хворі на рак гортані	
		II-ї стадії, n=20	III-ї стадії, n=20
Дієнові кон'югати, од. оп./мл	96,67±31,67	164,00±10,65*	188,00±10,68*
ТБК позитивні продукти, мкмоль/л	94,55±6,21	108,97±8,07	126,07±9,31*
Каталаза, мкат/л	131,54±11,66	173,16±13,32*	182,04±12,36*

Примітка: * – достовірність різниці між групою практично здорових осіб та відповідними показниками групи хворих ($p<0,05$).

Як видно з даних, представлених в табл. 2, в еритроцитах хворих обох груп виявлено підвищення вмісту ДК в 1,7 та 1,9 рази, відповідно, у порівнянні з контролем. В еритроцитах крові пацієнтів з III-ю стадією раку гортані виявлено зростання рівня ТБК-позитивних продуктів у 1,3 рази. Встановлено також підвищення каталазної активності в еритроцитах крові хворих при обох стадіях раку гортані в середньому у 1,4 рази.

Відомо, що при розвитку неоплазми в організмі відбуваються неспецифічні зміни окисного метаболізму. Зокрема, спостерігається системне виснаження активності антиоксидантних ферментів, які контролюють вміст активних форм кисню і, відповідно, їх участь у редокс-регуляції клітинних процесів, пов'язаних з прогресією пухлини і метастазуванням [18].

Отримані нами дані свідчать про посилення процесів ПОЛ як в сироватці крові, так і в еритроцитах. Відомо, що внаслідок окиснення ліпідів в еритроцитах утворюється МДА, який є мутагеном і має виражену

цитотоксичну дію. Окиснення ліпідних молекул за дії активних форм кисню може призвести до незворотнього пошкодження мембранних структур, порушення їх проникності та загибелі клітин. Деструктивному впливу продуктів ПОЛ протидіє антиоксидантна система, що складається з ферментної та неферментної ланок. Активність ферментів АОЗ, зокрема каталази, використовується як показник оцінки антирадикального захисту і резистентності організму [16]. Загальновідомо, що саме в еритроцитах міститься основна кількість антиоксидантів крові. Активні форми кисню з плазми можуть легко проникати в еритроцити через аніонні канали або дифундувати через мембрану. У зв'язку з цим еритроцити можуть виступати в ролі ефективних скавенджерів АФК, що впливає на фізіологічний статус еритроцитів, зокрема регуляцію гліколізу, підтримання форми та об'єму, мембранний транспорт тощо. Встановлене в ході нашого дослідження зростання каталазної активності в еритроцитах крові можна розглядати як пристосувальну реакцію ор-

ганізму у відповідь на посилення процесів ПОЛ [2].

Висновки

Отримані нами дані свідчать про інтенсифікацію вільно-радикального окиснення на тлі функціональної напруги антиоксидантної системи захисту у хворих на рак гор-

тані, а також про порушення структурно-функціонального стану плазматичних мембран еритроцитів, що проявляється активацією перекисного окиснення ліпідів. Тобто, йдеться про виявлення формування комплексу порушень, що може відігравати суттєву роль у розвитку та поглибленні патологічного процесу.

Література

1. Алясова АВ, Контрощикова КН, Бахов БЕ. Озоновые технологии в лечении злокачественных опухолей. Новгород, 2006;40-3.
2. Белоногов РН, Титова НМ, Савченко АА. Изменение показателей тиолового гемостаза в эритроцитах больных раком легкого на различных стадиях опухолевой прогрессии. Рос. биотерапевт. журн. 2013;12(1):47-50.
3. Бобырев ВН, Почерняева ВФ, Стародубцев СП. Специфичность систем антиоксидантной защиты органов и тканей – основа дифференцированной фармакотерапии антиоксидантами. Эксперим. и клин. фармакология. 1994;57(1):47-54.
4. Брюгер АФ. Биологические мембраны и патология клетки. Зинатне: Рига, 1986; 160 с.
5. Гаврилов ВБ, Мишкорудная МИ. Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови. Лаб. дело. 1983;3: 33-6.
6. Гончаренко МС, Латинова АМ. Метод оценки перекисного окисления липидов. Лаб. дело. 1985;11:60-1.
7. Гублер ЕВ. Вычислительные методы анализа и распознавания патологических процессов. Медицина: Львів; 1978. 296 с.
8. Демидов ДВ, Плотникова НА. Динамика перекисного окисления липидов под воздействием препаратов антиоксидантного типа действия в условиях экспериментального опухолевого роста. СТМ Биомедицинские исследования. 2011;4:14-7.
9. Киреев ГВ, Баленков ОЮ, Шарипов ФК. и др. Зависимость перекисного окисления липидов при раке желудка от размеров опухоли. Клин. лаб. диагностика. 2004;12:20-33.
10. Королук МА, Иванова ЛИ, Майорова ИГ. Метод определения активности каталазы. Лаб. дело. 1988;1:16-9.
11. Лебедева ВА, Кулешов ВМ, Сафронов ИД. Перекисное окисление липидов и антиоксидантная активность у больных с раком яичников. Медицина в Кузбассе: Актуал. проблемы онкогинекологии. 2004;11:46-7.
12. Мальцев ЭВ. Методология научного творчества в медицине: Практические аспекты. Астропринт: Одесса; 2006. 120 с.
13. Масленникова АВ, Щербатюк ТГ, Лазарева ВА. Прогностическое значение параметров прооксидантного-антиоксидантного статуса больных местно-распространенным раком полости рта и глотки. Мед. альманах. 2009;3(8):110-3.
14. Меньшиков ВВ. Лабораторные методы исследования в клинике. Справочник. Медицина: Москва; 1987. 368 с.
15. Мхитарян ЛС, Кучменко ОБ. Окисловальний стрес: механізми розвитку і роль в патології. Вид-во Нац. пед. ун-ту ім. Н.П. Драгоманова: Київ; 2004. 223 с.
16. Нестеров АС. Показатели эндогенной интоксикации у больных хроническими дерматозами. Инфекционные болезни. 2006;7:349-54.
17. Третьяк НН, Аношина МЮ. Концентрация продуктов перекисного окисления фосфолипидов в плазме крови больных с множественной миеломой как прогностический критерий течения заболевания. Клин. лабор. диагностика. 2003;5:29-31.
18. Gibellini L, Pinti M, Nasi M, De Biasi S, Roat E, et al. Interfering with ROS metabolism in cancer cells: the potential role of Quercetin. Cancers (Basel). 2010 Jun 14;2(2):1288-311. doi: 10.3390/cancers2021288.

References

1. Alyasova AV, Kontorschikova KN, Bach BE. [Ozone technologies in the treatment of malignant tumors]. Novgorod, 2006; 40-3. [Article in Russian].
2. Belonogov RN, Titova NM, Savchenko AA. [Changes in the indices of thiol hemostasis in the erythrocytes of patients with lung cancer at various stages of tumor progression]. Rossiiskii bioterapevticheskii zhurnal. 2013;12(1):47-50. [Article in Russian].
3. Bobyrev VN, Pochernyayeva VF, Starodubtsev SP. [The specificity of the antioxidant defense systems of organs and tissues is the basis of differentiated antioxidant pharmacotherapy]. Eksp Klin Farmakol. 1994;57(1):47-54. [Article in Russian].
4. Bruger AF. [Biological membranes and cell pathology]. Zinatne: Riga; 1986. 160 p. [In Russian].
5. Gavrilov VB, Mishkorudnaya MI. [Spectrophotometric determination of plasma lipid hydroperoxide content]. Lab Delo. 1983;3:33-6. [Article in Russian].
6. Goncharenko MS, Latinova AM. [Lipid peroxidation evaluation method]. Lab Delo. 1985;11:60-1. [Article in Russian].
7. Gubler EV. [Computational methods of analysis and recognition of pathological processes]. Medicine: Lviv; 1978. 296 p. [In Russian].
8. Demidov DV, Plotnikova NA. [The dynamics of lipid peroxidation under the influence of drugs of antioxidant type of action under conditions of experimental tumor growth]. Sovrem Tekhnologii Med. 2011;4:14-7. [Article in Russian].
9. Kireev GV, Balenkov OY, Sharipov FK. [The dependence of lipid peroxidation in gastric cancer on the size of the tumor]. Klin Lab Diagn. 2004;12:20-33. [Article in Russian].
10. Korolyuk MA, Ivanova LI, Mayorov IG. [The method of determining the activity of catalase]. Lab Delo. 1988;1:16-9. [Article in Russian].
11. Lebedeva VA, Kuleshov VM, Safronov ID. [Lipid peroxidation and antioxidant activity in patients with ovarian cancer]. Medicine in Kuzbass: Actual problems of oncogynecological. 2004;11:46-7. [Article in Russian].
12. Maltsev EV. Methodology of scientific creativity in medicine: Practical aspects. Astroprint: Odessa; 2006. 120 p. [In Russian].
13. Maslennikova AV, Scherbatyuk TG, Lazarev VA. [The prognostic value of the parameters of prooxidant-antioxidant status of patients with locally advanced cancer of the oral cavity and pharynx]. Medicinskij al'manah. 2009;3(8):110-3. [Article in Russian].
14. Menshikov VV. [Laboratory research methods in the clinic]. Reference book. Medicine: Moscow; 1987. 368 p. [In Russian].
15. Mkhitaryan LS, Kuchmenko OB. Oxidative stress: mechanisms of development and role in pathology. Publishing House Drahomanov pedagogical university: Kiev; 2004. 223 p. [In Ukrainian].
16. Nesterov AS. [Indicators of endogenous intoxication in patients with chronic dermatoses]. Infectious diseases. 2006;7:349-54. [Article in Russian].
17. Tretiak NN, Anoshina MYu. [Concentration of phospholipid peroxidation products in the blood plasma of patients with multiple myeloma as a prognostic criterion for the course of the disease]. Klin Lab Diagn. 2003;5:29-31. [Article in Russian].
18. Gibellini L, Pinti M, Nasi M, De Biasi S, Roat E, et al. Interfering with ROS metabolism in cancer cells: the potential role of Quercetin. Cancers (Basel). 2010 Jun 14;2(2):1288-311. doi: 10.3390/cancers2021288.

Надійшла до редакції 18.11.2019

© Ю.Б. Бурлака, Н.В. Гринь, С.В. Верьовка, 2019

**ОЦІНКА ІНТЕНСИВНОСТІ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ
ТА АКТИВНОСТІ КАТАЛАЗИ В СИСТЕМІ «СИРОВАТКА КРОВІ-ЕРИТРОЦИТ»
У ХВОРИХ НА РАК ГОРТАНІ**

Бурлака ЮБ, Гринь НВ, Верьовка СВ

ДУ «Інститут отоларингології ім. проф. О.С. Коломійченка НАМН України»

e-mail: burlakaiuliiia@yahoo.com

А н о т а ц і я

Мета: Оцінити інтенсивність перекисного окиснення ліпідів та активність каталази у хворих на рак гортані.

Матеріали та методи: Досліджено зразки сироватки крові та еритроцитів у 40 хворих на рак гортані II-ї та III-ї стадій та 20 практично здорових осіб.

Результати: Встановлено підвищення рівня ТБК-позитивних продуктів та дієнових кон'югатів на тлі зниження каталазної активності в сироватці крові хворих на рак гортані II-ї та III-ї стадій. В еритроцитах хворих обох груп виявлено підвищення вмісту дієнових кон'югатів та каталазної активності порівняно з контролем. Рівень ТБК-позитивних продуктів підвищувався тільки у пацієнтів з III-ю стадією захворювання. Отримані нами дані свідчать про інтенсифікацію вільно-радикального окиснення на тлі функціональної напруги антиоксидантної системи захисту у хворих на рак гортані, а також про порушення структурно-функціонального стану плазматичних мембран еритроцитів, що проявляється активацією перекисного окиснення ліпідів. Тобто, йдеться про виявлення формування комплексу порушень, що може відігравати суттєву роль у розвитку та поглибленні патологічного процесу.

Ключові слова: рак гортані, еритроцити, перекисне окиснення ліпідів, каталазна активність.

**ASSESSMENT OF THE INTENSITY OF LIPID PEROXIDATION AND CATALASE ACTIVITY
IN THE BLOOD-ERYTHROCYTE SERUM SYSTEM IN PATIENTS WITH LARYNGEAL CANCER**

Burlaka YuB, Gryn NV, Verevka SV

*State Institution «O.S. Kolomyichenko Institute of Otolaryngology
of National Academy of Medical Sciences of Ukraine»*

e-mail: burlakaiuliiia@yahoo.com

A b s t r a c t

Aim: To evaluate the intensity of lipid peroxidation and the activity of catalase in patients with laryngeal cancer.

Materials and Methods: Samples of blood serum and erythrocytes from 40 patients with laryngeal cancer of stages II and III and 20 healthy volunteers were investigated.

Results: The level of TBA-positive products and diene conjugates in blood serum samples of stage II and III patients with laryngeal cancer was increased than that of control. In the same time catalase activity was significantly reduced. In the erythrocytes of patients in both groups the level of diene conjugates and catalase activity was higher than that of control. The level of TBA-positive products increased only in patients with III stage disease. Our results indicate the intensification of free-radical oxidation against the background of the functional stress of the antioxidant defense system in patients with laryngeal cancer, as well as the violation of the structural and functional state of erythrocyte plasma membranes, which is manifested in the activation of lipid peroxidation. This indicates about the formation of a complex of disorders, which can play a significant role in the development and deepening of the pathological process.

Key words: laryngeal cancer, erythrocytes, lipid peroxidation, catalase activity.