

УДК 616-006.36.04-085.277.3:612.015.1:612.1

СОСТОЯНИЕ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ В ЭРИТРОЦИТАХ БОЛЬНЫХ САРКОМАМИ МЯГКИХ ТКАНЕЙ

**Качесова П.С., Горошинская И.А., Андрейко Е.А., Аушева Т.В., Шалашная Е.В.,
Сурикова Е.И., Немашкалова Л.А.**

*ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России,
Ростов-на-Дону, e-mail: vnp.kachesova@gmail.com*

Представлены результаты сравнительного исследования активности антиоксидантных ферментов и содержания малонового диальдегида (МДА) в эритроцитах крови больных саркомами мягких тканей (СМТ), которым проводилась неoadъювантная химиотерапии (НХТ) с использованием компонентов аутокрови для разведения цитостатиков, и больных СМТ, которым проводили только хирургическое лечение. У больных СМТ, прошедших только оперативное лечение, происходит усиление окислительного стресса в ранний послеоперационный период, о чем свидетельствует достоверное увеличение концентрации МДА, снижение активности супероксиддисмутазы и каталазы, активация ферментов системы глутатиона. У больных, прошедших НХТ, наблюдается нормализация большинства изученных параметров до уровня здоровых доноров. В период 4-х летнего наблюдения рецидивы и метастазы у больных, получивших НХТ, возникли в 5 случаях из 21, а у пациентов, не получавших НХТ, в 12 случаях из 21. По нашему мнению, снижение окислительного стресса на системном уровне является одним из механизмов эффективности предложенного метода.

Ключевые слова: саркомы мягких тканей, неoadъювантная химиотерапия, свободнорадикальное окисление, антиоксидантные ферменты

OXIDATIVE STRESS AND ANTIOXIDATIVE STATUS OF ERYTHROCYTES IN PATIENTS WITH SOFT TISSUE SARCOMA

**Kachesova P.S., Goroshinskaya I.A., Andreyko E.A., Ausheva T.V., Shalashnaya E.V.,
Surikova E.I., Nemashkalova L.A.**

Rostov Scientific Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, e-mail: vnp.kachesova@gmail.com

The aim of this research was to study oxidative stress in red blood cells of the soft tissue sarcoma (STS) patients who underwent neoadjuvant chemotherapy (NACT). NACT method was combined with topical and systemic administration of cytotoxic drugs using autologous blood components for breeding drugs. The patients in main group were treated with NACT. The control group included STS patients who received surgical treatment alone. Content of malondialdehyde (MDA), activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase and glutathione-S-transferase were examined. There were significant increase of the MDA concentration, decreased SOD and CAT activities and compensatory enhancement of the glutathione-dependent enzymes activities in control group. These changes indicated that oxidative stress increased in the early postoperative period. After the NACT we observed a reliable normalization of the most studied parameters to the level of healthy donors. A 4-year follow-up of patients, who treated with NACT, showed that local recurrence and metastases of STS appeared in 5 out of 21 cases. The patients, who had not been treated with NACT, local recurrence and metastases of STS were showed in 12 out of 21 cases. In our opinion, reduction in the level of oxidative stress is one of the mechanisms responsible for the effectiveness of the proposed method.

Keywords: soft tissue sarcoma, neoadjuvant chemotherapy, oxidative stress, antioxidant status, tumor tissue

Саркомы мягких тканей (СМТ) представляют собой редкую группу злокачественных новообразований, однако, смертность от этого заболевания имеет тенденцию к росту, что связано с крайне агрессивным течением и недостаточной эффективностью лечения данной патологии. По литературным данным, около 80% местных рецидивов и отдаленных метастазов СМТ возникают в первые два года после основного этапа лечения первичной опухоли [3]. С целью профилактики развития местного и отдаленного рецидивирования СМТ нами была применена методика неoadъювантной химиотерапии, сочетающая местное и системное введение противоопухолевых препаратов. Для повышения эффективности и снижения токсического действия химио-

терапии (ХТ) мы использовали компоненты аутокрови для разведения цитостатиков [3].

Наряду с оценкой клинических и морфологических характеристик терапевтического патоморфоза для понимания изменений, происходящих в организме-опухоленосителе под влиянием проводимого лечения, необходимо проводить изучение метаболических параметров гомеостаза. Известно, что при развитии неоплазмы в организме происходят неспецифические изменения окислительного метаболизма. В частности, наблюдается системное истощение антиоксидантных ферментов, контролирующих концентрацию активных форм кислорода и соответственно их участие в редокс-регуляции клеточных процессов, связанных с прогрессией опухоли и мета-

стазированием [6]. Поскольку большинство лекарственных препаратов, распределяясь между тканями и органами через систему кровообращения, взаимодействуют с эритроцитами, а также учитывая применение аутоэритроцитомассы в качестве носителя доксорубина, нам представилось целесообразным оценить состояние некоторых звеньев окислительного метаболизма в красных клетках крови.

Цель исследования. Изучить состояние антиоксидантного статуса и интенсивность процессов липопероксидации эритроцитов в раннем послеоперационном периоде у больных СМТ, прошедших неоадьювантную комбинированную НХТ с применением аутокрови в качестве носителя цитостатиков.

Материалы и методы исследования

В исследование были включены 42 пациента с резектабельными (T2a-bN0M0) верифицированными злокачественными опухолями мягких тканей. В большинстве случаев преобладали опухоли с низкой степенью дифференцировки (G3 – 68 %) , а размеры опухолей превышали 4 см более чем в 60 % случаев. Средний возраст больных составил $56 \pm 3,6$ лет (от 25 до 72 лет). Больные были разделены на две группы методом случайного отбора. Пациентам основной группы (9 женщин и 12 мужчин) проводили неоадьювантную комбинированную химиотерапию с последующим оперативным лечением. Комбинированная химиотерапия проводилась по следующей схеме: в два стерильных флакона, содержащих по 50 мл аутоплазмы, добавляли циклофосфан (600 мг/м^2) и метотрексат (40 мг/м^2); к эритроцитомассе (около 100 мл) добавляли доксорубин (40 мг/м^2). После термостатирования (30 минут при 37°C) эритроцитомассу с доксорубином вводили в локтевую вену; аутоплазмой с цитостатиками обкалывали периферическую зону опухоли из нескольких точек. Химиотерапию проводили в первый и седьмой день, через

14 дней производили удаление опухоли. В группе сравнения (11 женщин и 10 мужчин) больным проводилось только оперативное вмешательство. В дальнейшем все больные СМТ проходили стандартную химиолучевую терапию.

Для оценки состояния ферментативного звена антиоксидантной системы в 1% гемолизатах эритроцитов определяли активность глутатионпероксидазы (ГПО), глутатионтрансферазы (ГТ), супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы общепринятыми спектрофотометрическими методами [1]. Об интенсивности перекисного окисления липидов (ПОЛ) судили по накоплению молекулярного продукта – малонового диальдегида (МДА) [1]. Результаты представляли в пересчете на мг гемоглобина. Перечисленные показатели определяли до начала лечения (перед химиотерапией и/или оперативным лечением) и на 7-10 сутки после проведения операции. Полученные данные сопоставляли со значениями в группе доноров ($n=33$) без онкопатологии, аутоиммунных, тяжелых хронических или психических заболеваний, сходных по возрастному и половому составу с группой больных СМТ.

Статистическую обработку достоверности полученных данных проводили с использованием U-критерия Манна-Уитни, критерия Вальда-Вольфовица и точного критерия Фишера.

Результаты исследования и их обсуждение

Из представленных данных видно (таблица), что у обследованных больных СМТ имело место снижение активности ферментов первой линии антиоксидантной защиты. Так активность СОД была ниже нормальных значений в среднем на 11,8 % ($p < 0,05$), каталазы – на 18,6 % ($p < 0,01$) по отношению к значениям в группе лиц без онкопатологии. Коэффициент СОД/Каталаза за счет более выраженного снижения активности последней превышал нормальные значения в среднем на 20,0 % ($p < 0,01$).

Активность некоторых антиоксидантных ферментов и содержание МДА в эритроцитах больных саркомами мягких тканей до и после лечения

Показатели	Доноры (n=33)	Больные СМТ		
		Фон до лечения (n=42)	Контрольная группа (n=21) После операции	Основная группа (n=21) После операции
МДА нМ/мл	$487,4 \pm 40,0$	$1030,12 \pm 50,0^*$	$996,35 \pm 57,80^*$	$677,33 \pm 84,4^{*X0}$
СОД у.е./мг Hb	$497,1 \pm 12,85$	$438,32 \pm 15,04^*$	$436,02 \pm 22,55^*$	$421,82 \pm 48,31^*$
Каталаза мкМ H ₂ O ₂ /мин	$128,61 \pm 3,56$	$104,7 \pm 3,62^*$	$93,22 \pm 5,05^*$	$127,5 \pm 7,47^{X0}$
СОД/Каталаза	$3,737 \pm 0,116$	$4,482 \pm 0,270^*$	$5,243 \pm 0,337^{*X}$	$3,671 \pm 0,209^{X0}$
ГПО (МЕ/мг Hb)	$204,3 \pm 14,41$	$425,6 \pm 19,8^*$	$425,17 \pm 30,06^*$	$237,83 \pm 43,13^{X0}$
ГТ (МЕ/мг Hb)	$57,49 \pm 1,23$	$68,6 \pm 1,55^*$	$64,8 \pm 2,87^*$	$67,63 \pm 5,44^*$
Каталаза/ГПО	$0,626 \pm 0,045$	$0,250 \pm 0,019^*$	$0,221 \pm 0,019^*$	$0,460 \pm 0,117^{X0}$

Примечание. * – достоверно по отношению к значениям в группе доноров; ^X – достоверно по отношению к значениям до лечения; ⁰ – достоверно по отношению к значениям в контрольной группе. ($p \leq 0,05$)

Одновременно у больных СМТ наблюдались значимые изменения активности глутатионзависимых ферментов: повышение активности ГТ на 19,3 % ($p < 0,001$) и двукратное, по сравнению с донорами, увеличение активности ГПО ($p < 0,0001$). Нарушение соотношения активности перекись-устраняющих ферментов – каталазы и ГПО привело к снижению коэффициент Каталаза/ГПО в 2,5 раза ($p < 0,0001$) по сравнению со значениями в группе доноров. Содержание вторичного продукта ПОЛ – МДА, у больных СМТ превышало норму в среднем в 2 раза ($p < 0,0001$).

После хирургического лечения показатели СОД, ГПО и ГТ в эритроцитах больных контрольной группы оставались на прежнем уровне, а дальнейшее снижение активности каталазы привело к увеличению коэффициента СОД/Каталаза на 40,0% ($p < 0,01$) по сравнению со значениями в группе доноров и снижению коэффициента Каталаза/ГПО более, чем в 2,8 раза ($p < 0,0001$). Концентрация МДА на данном этапе оставалась на прежнем уровне.

У больных СМТ, которым была проведена предоперационная комбинированная ХТ, наблюдалась нормализация работы системы перекись-устраняющих ферментов в послеоперационный период (через 21-27 после окончания ХТ). Активность каталазы достоверно повысилась как по сравнению с фоном, так и показателями в контрольной группе – на 36,8% и 21,7% соответственно. Активность ГПО, напротив, достоверно снизилась, достигнув нормальных величин. Значения СОД у больных данной группы оставались ниже нормы, тем не менее, наблюдалось восстановление сопряженной работы каскада СОД/Каталазы. Концентрация МДА снизилась на 32,0 % ($p < 0,01$) по отношению к показателям до лечения, приближаясь к уровню донорских величин ($0,1 > p > 0,05$), что указывает на эффективное удаление пероксида водорода в эритроцитах.

Результаты исследования свидетельствуют об интенсификации процессов липопероксидации в эритроцитах крови больных СМТ и нарушении работы каскада СОД/каталаза, выполняющего основную роль в защите эритроцитов человека от действия АФК. Наблюдаемое при этом усиление активности ферментов глутатионного цикла не привело к снижению интенсивности накопления продуктов ПОЛ, что в совокупности с низкой активностью каталазы служило показателем недостаточной резистентности мембран эритроцитов к перекислению [7].

Оперативное лечение больных СМТ приводило к прогрессированию дисфункции

каскада СОД/каталаза, с превалирующим снижением активности каталазы, что может способствовать деградации мембран эритроцитов в результате накопления пероксида водорода. Такое усиление окислительного стресса в послеоперационный период, на фоне ограниченности компенсаторных механизмов онкобольных, является закономерным, поскольку операционная травма, кровопотеря и анестезиологическое пособие являются факторами активации процессов перекисидации [8].

У больных основной группы наблюдается снижение интенсивности свободно-радикального окисления, на что указывает нормализация большинства изученных параметров.

Интересно, что механизмом непрямого цитостатического действия применяемых нами противоопухолевых препаратов является генерация АФК и индукция окислительного стресса. Однако наблюдаемое нами снижение активности ГПО у больных основной группы происходило на фоне нормализации работы СОД и каталазы, а активность ГТ достоверно не отличалась от таковых в контрольной группе. Данные литературы о влиянии доксорубина на состояние редокс-системы эритроцитов довольно неоднозначны. Так, в работе одних авторов было показано, что различные дозы доксорубина *in vivo* стимулируют развитие в эритроцитах окислительного стресса в результате снижения активности СОД, каталазы и ферментов глутатионного цикла [9]. Исследования Shinohara K и Tanaka KR. показали, что инкубация эритроцитов с доксорубином не ингибирует активность данных ферментов [10]. Другие авторы при изучении влияния инкубации препарата (0,03 мг/мл) на активность металлопротеинов в эритроцитах выявили, что химиопрепарат снижал активность СОД, но не влиял на работу каталазы [4]. Можно полагать, что доксорубин в применяемых нами дозах не вызывает грубых нарушений функционирования антиоксидантных ферментов. Кроме того, инкубация цитостатических препаратов, в частности антрациклиновых антибиотиков, с эритроцитами способствует повышению его фармакологической активности вследствие более выраженного и длительного цитотоксического действия по сравнению с нативным препаратом [5].

Заключение

Выявленные на фоне сочетанного действия регионарной и системной неоадьювантной химиотерапии изменения изученных параметров окислительного метаболизма в эритроцитах отражают про-

цесс снижения тканевой гипоксии и восстановления дисбаланса окислительных процессов в организме. Такой эффект мы связываем с уменьшением системного влияния опухоли на организм в результате местного введения химиопрепаратов на аутоплазме [2]. Снижение окислительного стресса в послеоперационном периоде, очевидно, сохраняет адаптационные резервы организма, что положительно влияет на последующие этапы терапии и эффективность лечения в целом. Так, четырехлетнее наблюдение за больными показало, что местные рецидивы и/или отдаленные метастазы у больных основной группы возникли в 24,0% случаев, в контрольной группе у 57,0% больных ($p < 0,01$).

Список литературы

1. Арутюнян А.В., Дубинина Е.Е., Зыбина Н.Н. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма: методические рекомендации. – СПб.: ИКФ «Фолиант», 2000. – 104 с.
2. Влияние неоадьювантной комбинированной химиотерапии на аутосредах на состояние антиоксидантной системы опухоли и окружающих неоплазму тканей у больных саркомами мягких тканей / Качесова П.С., Андрейко Е.А., Горошинская И.А., Ващенко Л.Н., Внуков В.В., Шалашная Е.В., Аушева Т.В., Нескубина И.В. // *Фундаментальные исследования*. – 2013. – № 5 (2). – С. 291-295.
3. Салатов Р.Н., Андрейко Е.А., Аушева Т.В. Неоадьювантная комбинированная аутобиохимиотерапия в комплексном лечении сарком мягких тканей // *Известия высших учебных заведений Северо-Кавказский регион. Естественные науки*. – 2011. – № 3. – С. 191-121.
4. Тадевосян Л.Г. Влияние доксорубина на уровень и активность металлопротеинов из тканей крыс *in vitro* // *Национальная академия наук Армении. Доклады*. – 2010. Т. 111, № 1. – С. 44-51.
5. Gaundreaul R.C., Bellemare B., Lacroix J. Erythrocyte membrane-bound daunorubicin as a delivery system in anticancer treatment // *Anticancer Res*. – 1989. Vol. 9, № 4. – P. 1201-1205.
6. Interfering with ROS metabolism in cancer cells: the potential role of Quercetin / Gibellini L., Pinti M., Nasi M., De B.S., Roat E., Bertocelli L., Cossarizza A. // *Cancers*. – 2010. № 2. – P.1288-1311.
7. Nagababu E, Chrest FJ, Rifkind JM. Hydrogen-peroxide-induced heme degradation in red blood cells: the protective roles of catalase and glutathione peroxidase // *Biochim Biophys Acta*. – 2003. Vol. 1620, № 1-3. – P 211-217.
8. Prospective Trial of Antioxidant Supplementation in Critically Ill Surgical Patients / Avery B. Nathens, Margaret J. Neff, Gregory J. Jurkovich, Patricia Klotz, Katherine Farver, John T. Ruzinski, Frank Radella, Iris Garcia, Ronald V. Maier. *Randomized* // *Annals of Surgery*. – 2002. – Vol. 236, № 6. – P. 814-822.
9. Reseveratrol protects against acute chemotherapy toxicity induced by doxorubicin in rat erythrocyte and plasma / Hamlaoui M.M., Limam N., Carrier A., Limam F., Amril M.M., Aouani E. // *Journal of Physiology and Pharmacology*. – 2012. Vol. 63, № 3. – P. 293-301.
10. Shinohara K., Tanaka KR. The effects of adriamycin (doxorubicin HCl) on human red blood cells // *Hemoglobin*. – 1980. – Vol. 4, № 5-6. P. 735-45.