

В.И. Жуков, С.В. Перепадя, О.В. Зайцева, А.С. Моисеенко, М.А. Бондаренко, Н.А. Гордиенко

Исследование уровня эндогенной интоксикации организма больных колоректальным раком и его прогностическое значение для выделения групп риска

Харьковский национальный медицинский университет

Ключевые слова: колоректальный рак, эндогенная интоксикация, перекисное окисление липидов, пероксидация белков, молекулы средней массы, биофлуоресценция.

У больных (n=239) колоректальным раком с различными стадиями (I–IV) и анатомической локализацией опухолевого процесса проведено исследование лейкоцитарного индекса интоксикации, уровней содержания продуктов перекисного окисления липидов (диеновые конъюгаты, малоновый диальдегид), продуктов окислительной модификации белков (2,4-динитрофенилальдогидразоны, 2,4-динитрофенилкетогидразоны), молекул средней массы, т. е. субстратов эндогенной токсификации организма. Перекисное окисление липидов и окислительную модификацию белков исследовали также по интенсивности биофлуоресценции и фосфоресценции сыворотки крови больных. Выявлено существенное увеличение на 100–200% содержания диеновых конъюгатов, малоновых диальдегидов, 2,4-ДНФАГ, 2,4-ДНФКГ, молекул средней массы и лейкоцитарного индекса интоксикации при различных локализациях опухоли, что свидетельствует о значительной эндогенной токсификации организма и о формировании мембранной патологии у больных колоректальным раком. Наблюдаемое снижение интенсивности биофлуоресценции сыворотки крови и увеличение интенсивности фосфоресценции свидетельствует об ингибировании процессов биоэнергетики на фоне разобщения процессов окисления и фосфорилирования. Исследованные показатели эндогенной токсификации организма больных колоректальным раком могут иметь прогностическое значение при диагностике стадии канцерогенеза, эффективности адекватного лечения, а также для выявления групп риска среди населения.

Дослідження рівня ендогенної інтоксикації організму хворих на колоректальний рак і його прогностичне значення для виділення груп ризику

В.І. Жуков, С.В. Перепадя, О.В. Зайцева, А.С. Моисеєнко, М.О. Бондаренко, Н.О. Гордієнко

У хворих (n=239) на колоректальний рак з різними стадіями (I–IV) й анатомічною локалізацією пухлинного процесу проведено дослідження лейкоцитарного індексу інтоксикації, рівнів вмісту продуктів перекисного окислення ліпідів (диєнові кон'югати, малоновий диальдегід), продуктів окислювальної модифікації білків (2,4-динітрофенілальдогидразони, 2,4-динітрофенілкетогидразони), молекул середньої маси, тобто субстратів ендогенної токсифікації організму. Перекисне окислення ліпідів й окислювальну модифікацію білків досліджували також за інтенсивністю біохемілюмінесценції та фосфоресценції сироватки крові хворих. Виявлено суттєве підвищення на 100–200% вмісту диєнових кон'югатів, малонових диальдегідів, 2,4-ДНФАГ, 2,4-ДНФКГ, молекул середньої маси й лейкоцитарного індексу інтоксикації при різних локалізаціях пухлини, що свідчить про значну ендогенну токсифікацію організму та формування мембранної патології у хворих на колоректальний рак. Спостережуване зниження інтенсивності біохемілюмінесценції сироватки крові й зростання інтенсивності фосфоресценції свідчить про інгібування процесів біоенергетики на фоні роз'єднання процесів окислення й фосфорилування. Досліджені показники ендогенної токсифікації організму хворих на колоректальний рак можуть мати прогностичне значення при діагностиці стадії канцерогенезу, ефективності адекватного лікування, а також для виявлення груп ризику серед населення.

Ключові слова: колоректальний рак, ендогенна інтоксикація, перекисне окислення ліпідів, пероксидація білків, молекули середньої маси, біохемілюмінесценція.

Патологія. – 2010. – Т.7., №3. – С. 34–37

Investigation of endogenous intoxication in patients with colorectal cancer and its prognostic significance for the selection of risk groups

V.I. Zhukov, S.V. Perepadya, O.V. Zaitseva, A.S. Moiseenko, M.A. Bondarenko, N.A. Gordienko

We studied the leukocytic index of intoxication (LII), the concentrations of lipid peroxidation products (LP) (diene conjugates (DC), malon dialdehyde (MDA)), the products of the oxidative protein modification (2,4-dinitrophenyl aldehydrazones (2,4-DNPhAH) and 2,4-dinitrophenyl ketohydrazones (2,4-DNPhKH)), the average weight molecules (AWM), i.e. substrates of the endogenic toxification, in patients (n = 239) with the colorectal cancer (CRC) at various stages (I-IV) and with various anatomic localization of a neoplastic process. The LP and the oxidation protein modification were studied by the intensity of serum biochemical luminescence (BCL) and phosphorescence (PhR). A significant increase (by 100–200%) of DC; MDA; 2,4-DNPhAH; 2,4-DNPhKH; AWM and LII with various forms of a tumor localization was revealed, which is indicative of significant endogenic body toxification and the membrane pathology formation in patients with the CRC. The intensity decreasing of BCL of the blood serum, and the intensity increasing of PhR reflects reduction of the antioxidant system activity on the background of disintegration of oxidation and phosphorylation processes. The endogenic toxification criteria, studied in patients with the CRC, are of high prognostic significance, both for diagnosis of the cancerogenesis stage, the adequate treatment efficiency, and for the identification of the high-risk groups among the population.

Key words: colorectal cancer, endogenous intoxication, lipid peroxidation, protein peroxidation, average weight molecules, biochemical luminescence.

Pathologia. 2010; 7(3): 34–37

В настоящее время одним из актуальных направлений в медицине является экология внутренней среды организма. Задача очищения «эндоэкологического пространства» клеток организма от экзо- и эндотоксинов играет важную роль в системе мер по эндоэкологической реабилитации больных [1,8,10].

Исследования показывают, что развитие эндогенной интоксикации сопровождается увеличением концентрации молекул средней массы (МСМ) и коррелирует с тяжестью состояния больных, что может служить показателем степени токсикации организма. МСМ оказывают влияние на жизнедеятельность всех систем и органов организма. По своему строению они близки к регуляторным пептидам, способны соединять и блокировать рецепторы клеток, изменяя при этом внутриклеточный метаболизм и их функции [9,15]. Это особенно отчетливо проявляется при воспалительных процессах различной локализации, воздействии токсических химических веществ, злокачественном опухолевом росте. По мнению ряда авторов, к субстратам эндогенной интоксикации относятся активные формы кислорода (АФК), продукты перекисного окисления липидов (ПОЛ) и окислительной модификации белков, перекиси, гидроперекиси, диеновые конъюгаты (ДК), малоновый диальдегид (МДА), кетоны, спирты, альдо- и кетогидразоны и др. низкомолекулярные реакционно-способные молекулы. Повышение их содержания в крови является прогностически неблагоприятным признаком, свидетельствующим о деградации биополимеров, надмолекулярных комплексов и нарушении структурно-метаболических и физико-химических процессов в клеточных мембранах [4,7].

Рак толстого кишечника (колоректальный рак – КРР) занимает одно из ведущих мест в структуре онкологической заболеваемости желудочно-кишечного тракта. В последние годы повсеместно регистрируется неуклонный рост этой патологии [3,6,12,13]. Смертность в результате формирования КРР в США и странах западной Европы занимает второе место после рака молочной железы у женщин, третье – после рака предстательной железы и легких у мужчин. По сведениям канцер-реестра Украины [11], КРР чаще встречается у мужчин, чем у женщин. Ежегодно регистрируется около 36,5 новых случаев заболевания КРР на 100 тыс. населения.

КРР относится к медленно прогрессирующим опухолям. Вопрос эндогенной токсификации организма больных КРР представляет большой научный интерес для обоснования патогенетических механизмов формирования КРР, разработки методов ранней диагностики и профилактики опухолевой патологии толстого кишечника.

Цель работы

Изучение эндогенной токсификации организма больных КРР по содержанию в сыворотке крови среднемолекулярных пептидов, продуктов ПОЛ и окислительной модификации белков и обоснование их прогностического значения для выделения групп риска среди населения.

Материалы и методы исследования

Обследовано 43 условно здоровых пациента в возрасте 40–65 лет (20 женщин, 23 мужчины) и 239 больных в возрасте от 35 до 76 лет с установленным диагнозом: рак прямой кишки (РПК) – 54 случая (у 29 мужчин и 25 женщин), сигмовидной (РСигК) – 62 (у 37 мужчин и 25 женщин), слепой (РСлК) – 27 (у 15 мужчин и 12 женщин), поперечно-ободочной (РПОК) – 66 (у 48 мужчин и 18 женщин), толстой (РТК) – 30 (у 17 мужчин и 13 женщин). Первая стадия заболевания выявлена у 6, II – у 34, III – у 161 и IV – у 38 онкологических больных (неоперабельная форма КРР). Все больные находились на стационарном лечении в отделениях Харьковского областного онкологического центра.

Программа исследования предусматривала изучение лейкоцитарного индекса интоксикации (ЛИИ), определение в сыворотке крови продуктов ПОЛ – ДК и МДА; продуктов окислительной модификации белков – 2,4-динитрофенилальдогидразонов (2,4-ДНФАГ) и 2,4-динитрофенилкетогидразонов (2,4-ДНФКГ); молекул средней массы (МСМ).

ПОЛ и окислительную модификацию белков исследовали также по уровням интенсивности биофлуориминесценции (БХЛ) и фосфоресценции (ФС) сыворотки крови.

Концентрацию МСМ определяли скрининговым методом [2] с последующим измерением концентрации на спектрофотометре СФ-46 при длине волны $\lambda=254\text{нм}$. ЛИИ оценивали по Я.Я. Кальф-Калифу. Интенсивность спонтанной (СХЛ), H_2O_2 -индуцированной (ИХЛ) и люминол-усиленной хемиллюминесценции (ЛУХЛ) сыворотки крови регистрировали на медицинском биофлуориметре (ХЛМЦ1-01). Содержание молекулярного продукта ПОЛ (МДА) в сыворотке крови определяли флуориметрическим методом по реакции с тиобарбитуровой кислотой [14]. ДК исследовали спектрофотометрическим методом.

Уровень окислительной модификации белков оценивали по концентрации карбонильных групп, реагирующих с 2,4-динитрофенилгидразоном. По содержанию продуктов реакции 2,4-ДНФАГ и 2,4-ДНФКГ судили о состоянии перекисного окисления белков [5]. Оценку структурно-функционального состояния белков проводили путем исследования интенсивности фосфоресценции сыворотки крови. Исследуемые компоненты эндогенной токсификации изучали при поступлении больных в отделение перед проведением соответствующего лечения.

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием методов вариационной статистики с оценкой достоверности различий по Стьюденту-Фишеру.

Результаты и их обсуждение

Результаты исследования выявили увеличение в сыворотке крови больных КРР содержания МДА, ДК, 2,4-ДНФАГ, 2,4-ДНФКГ, МСМ и ЛИИ при различных формах локализации опухолевого процесса (табл. 1). В

**Состояние показателей эндогенной интоксикации у больных КРР
в зависимости от локализации опухолевого процесса**

Показатели	Группа наблюдения, М±m					Условно здоровые
	РПК	РСлК	РСигК	РПОК	РТК	
МДА (мкмоль/л)	3,8±1,5*	4,2±1,6*	3,7±1,4*	4,4±1,3*	3,6±1,5*	2,1±0,18
ДК (мм/л)	27,2±4,4*	15,3±3,9*	19,8±4,3*	22,6±4,5*	24,3±4,2*	9,2±0,67
2,4-ДНФАГ (ед. опт. плотн./1г белка, λ-370 нм)	58,4±5,7*	61,5±5,3*	56,7±4,9*	60,3±4,2*	55,3±4,5*	27,3±1,87
2,4-ДНФКГ (ед. опт. плотн./1г белка, λ-380 нм)	65,3±8,7*	60,8±8,2*	66,8±7,5*	64,2±6,6*	57,2±5,8*	23,8±2,19
МСМ (усл. ед.)	0,58±0,19*	0,62±0,24*	0,53±0,25*	0,66±0,22*	0,63±0,26*	0,22±0,03
ЛИИ	3,8±1,8*	4,1±1,7*	4,8±1,2*	4,4±1,3*	4,6±1,3*	1,3±0,08

Примечание: * – различия с группой «условно здоровые» достоверны, $p < 0,05$.

зависимости от места развития онкопатологии, уровень МДА в наибольшей мере повышался у больных при РПОК и РСлК соответственно на 105,6% и 96,2%, по сравнению с показателями условно здоровых пациентов. Концентрации ДК были значительно увеличены при РПК, РПОК и РТК: на 194%, 144% и 162% соответственно. Содержание продуктов окислительной модификации белков 2,4-ДНФАГ и 2,4-ДНФКГ во всех случаях повышалось более чем на 100%. Особенно высокие уровни 2,4-ДНФКГ отмечались у больных РПК, РСигК и РПОК: соответственно на 173%, 180% и 169%.

Наличие молекул средней массы было существенно повышено при РСлК, РПОК и РТК: соответственно на 181,8%, 200% и 186,3%. Лейкоцитарный индекс интоксикации при всех формах КРР повышался в 2,92–3,69 раза. Следует отметить, что в целом средние величины изучаемых показателей во всех случаях (все больные без разделения их по полу и стадии развития опухолевого процесса) статистически отличались от данных по группе условно здоровых пациентов, что свидетельствует о значительной токсификации организма в условиях развития рака толстого кишечника.

Установленные нами метаболические нарушения на фоне увеличения содержания МСМ и ЛИИ могут указывать на усиление эндогенной интоксикации и

формирование мембранной патологии у больных КРР. Эти суждения нашли подтверждение при исследовании динамики показателей в зависимости от стадии канцерогенеза (табл. 2).

Анализ динамики МДА у больных КРР обнаружил увеличение концентрации этого показателя в сыворотке крови при первой стадии на 23%, второй – на 47% и, особенно, при третьей и четвертой – соответственно на 204,7% и 308%, в сравнении с группой условно здоровых пациентов. Сходная динамика была присуща и ДК. Так, при первой, второй, третьей и четвертой стадиях их уровни увеличивались на 226%, 286,9%, 307,6% и 343%. Содержание продуктов окислительной модификации белков (альдо- и кетогидразоны) повышалось при всех стадиях канцерогенеза на 200–300%. Уровни среднемолекулярных пептидов, в зависимости от стадии опухолевого процесса, увеличивались более чем в 2 раза, а ЛИИ возрастал от 1,92 (I стадия) до 3,92 (IV стадия). Во всех случаях отмечалась четкая зависимость между стадией развития опухоли и показателями динамики МДА, ДК, 2,4-ДНФАГ, 2,4-ДНФКГ, МСМ и ЛИИ ($p < 0,05$).

Изучение интенсивности ХЛ сыворотки крови больных КРР выявило обратную зависимость этого показателя. При всех стадиях опухолевого процесса

Таблица 2

Состояние показателей эндогенной интоксикации у больных КРР, в зависимости от стадии канцерогенеза

Показатели	Стадия развития опухоли, М±m				Условно здоровые, М±m
	I	II	III	IV	
БХЛ (имп/с)	548,2±18,7*	452,4±19,6*	347,2±15,4*	246,5±16,2*	752,6±149,7
Фосфоресценция (имп/с)	1644,6±50,3*	2128,7±70,4*	2962,3±120,5*	3784,6±153,4*	1228,7±82,3
МДА (мкмоль/л)	2,6±0,2*	3,1±0,4*	4,3±0,5*	4,9±0,8*	2,1±0,2
ДК (мм/л)	20,8±1,3*	26,4±1,8*	28,3±1,5*	31,6±2,3*	9,2±0,7
2,4-ДНФАГ (ед. опт. плотн. / 1 г белка, λ-370 нм)	52,6±1,9*	56,2±2,3*	59,4±3,8*	62,7±1,4*	27,3±1,8
2,4-ДНФКГ (ед. опт. плотн. / 1 г белка, λ-380 нм)	52,4±3,7*	63,7±4,9*	66,5±3,2*	71,2±2,5*	23,8±2,1
МСМ (усл. ед.)	0,5±0,1*	0,6±0,1*	0,6±0,05*	0,7±0,1*	0,2±0,01
ЛИИ	2,5±0,3	3,9±0,4*	4,7±0,6*	5,1±0,7*	1,3±0,1

Примечание: * – различия с группой «условно здоровые» достоверны, $p < 0,05$.

интенсивность ЛУХЛ сыворотки крови была снижена, по сравнению с контрольной группой и находилась в пределах следующих значений: $548,2 \pm 18,7$; $452,4 \pm 19,6$; $347,2 \pm 15,4$ и $246,5 \pm 16,2$ имп/с соответственно. По мнению многих авторов [4,5,7,15], такая динамика интенсивности биохемилуминесценции может отражать ингибирование процессов биоэнергетики, что наиболее выражено у больных при III и IV стадиях канцерогенеза. При исследовании фосфоресценции выявлен рост ее интенсивности в зависимости от стадии развития опухолей. Так, при I стадии заболевания КРР интенсивность ФС сыворотки крови повышалась на 33,8%; II – на 73,2%; III – на 241,2%, а при IV – на 308%, по сравнению с показателями условно здоровых пациентов. Эти сведения указывают на то, что при данной патологии в сыворотке крови увеличивается количество молекул, которые находятся в триплетном возбужденном состоянии, являются реакционно-способными и могут повреждать макромолекулы (белки, нуклеиновые кислоты и др.), мембраны клеток и внутриклеточные структурно-функциональные единицы (полоска митохондрий).

Выводы

Таким образом, результаты исследования свидетельствуют, что при канцерогенезе толстого кишечника наблюдается аутоинтоксикация организма, степень выраженности которой тесно связана со стадией развития онкологического процесса. Выявлено существенное увеличение (на 100–200%) содержания ДК, МДА, 2,4-ДНФАГ, 2,4-ДНФКГ, МСМ и ЛИИ при различных формах локализации опухоли, что свидетельствует о значительной эндогенной токсификации организма и формировании мембранной патологии у больных КРР. Интенсивность ЛУХЛ сыворотки крови была снижена, а интенсивность ФС увеличена, по сравнению с группой условно здоровых пациентов, что отображает ослабление активности антиоксидантной системы на фоне разобщения процессов окисления и фосфорилирования. Ведущими патогенетическими механизмами формирования КРР могут выступать активация ПОЛ, усиление окислительной модификации белков и др. макромолекул, повреждение структурно-функционального состояния мембран клеток и внутриклеточных органелл, ингибирование процессов биоэнергетики, т. е. нарушения кооперативного взаимодействия окислительно-антиоксидантного гомеостаза. Исследованные показатели эндогенной токсификации организма больных КРР могут быть прогностически значимыми как при диагностике стадии канцерогенеза, эффективности патогенетической терапии, выборе объема оперативного вмешательства, так и при мониторинге биоэнергетического гомеостаза с целью выделения групп риска среди населения при диспансеризации, профилактических осмотрах.

Перспективы дальнейших научных разработок в данном направлении. Предполагается изучение патогенетической роли продуктов триптофанового обмена в механизмах развития онкозаболеваний толстого кишечника.

Литература

1. *Бабак О.* Синдром дисбиотичних порушень мікрофлори кишечника: сучасний погляд на проблему / О.Я.Бабак. // Сімейна медицина. – 2006. – №2. – С. 4–6.
2. *Габриэлян Н.* Определение средних молекул скрининг-методом / Н.И. Габриэлян, А.А. Дмитриев // Клинич. медицина. – 1981. – №10. – С. 38–42.
3. *Делекторская В.* Клинические значения содержания молекулярно-биологических маркеров в зонах инвазивного фактора рака толстой кишки / В.В. Делекторская, Д.А. Головкин, Н.Е. Кушлинский // Бюлл. эксперим. биол. и мед. – 2008. – Т. 146, №11. – С. 552–555.
4. *Детергенты – модуляторы радиомиметических эффектов* / [В.И. Жуков, В.В. Мясоедов, Ю.И. Козин и др.]. – Белгород: Белвитамины, 2000. – 450 с.
5. *Дубинина Е.* Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, методы ее определения / Е.Е. Дубинина, С.О. Бурмистрова, Д.А. Ходов, И.Г. Порохов // Вопр. мед. химии. – 1995. – Т. 41, №4. – С. 24–26.
6. *Ермолов А.* Выбор метода хирургического лечения обтурационной непроходимости при опухолях ободочной кишки / А.С. Ермолов, Э.П. Рудин, Д.Д. Онен // Хирургия. – 2004. – №2. – С. 4–7.
7. *Зайцева О.* Анализ мониторинговых метаболических показателей у больных псориазом / О.В. Зайцева, Н.В. Жукова, Е.Г. Татузян // Эксперим. і клінічна медицина. – 2009. – №1. – С. 89–93.
8. *Иммунорегуляция в системе микрофлоры – интестинальный тракт* / С.С. Хромова, Б.А. Ефимов, Н.П. Тарабрина и др. // Аллергология и иммунология. – 2004. – №2. – С. 265–271.
9. *Николайчук В.* «Средние молекулы» – образование и способы определения / В.В. Николайчук, Б.В. Корковский, Г.А. Лобычева // Лаб. дело. – 1989. – №8. – С. 31–33.
10. *Диагностика стадий эндогенной интоксикации и дифференциальное применение методов эфферентной терапии* / С.В. Оболенский, М.Я. Малахова, А.Л. Ермолов // Вестник хирургии. – 1991. – №3. – С. 95–100.
11. *Рак в Украине, 2006–2007* / Бюллетень национального канцер-регистра Украины – К., 2008. – 100 с.
12. *Показатели выживаемости больных раком ободочной кишки с отдаленными метастазами после операции различного объема* / И.А. Савина, В.М. Моисеенко, С.В. Васильев, Н.Н. Симонов // Вопр. онкол., 2003. – Т. 49, №3. – С. 340–346.
13. *Ткач С.* Колоректальный рак: распространенность, основные факторы риска и современные подходы к профилактике / С.М. Ткач, А.Ю. Иоффе // Укр. терапев. журн. – 2005. – №2. – С. 83–88.
14. *Федорова Т.* Реакция с тиобарбитуровой кислотой для определения малонового диальдегида в крови методом флюориметрии / Т.К. Федорова, Т.С. Коршунова, Э.Т. Ларская // Лаб. дело. – 1983. – №3. – С. 25–28.
15. *Чаленко В.* Возможные причины повышения концентрации молекул средней массы при патологии / В.В. Чаленко // Пат. физиология. – 1998. – №4. – С. 13–15.

Сведения об авторах:

Жуков В.И., д. мед. н., проф., зав. каф. биохимии ХНМУ.
 Перепада С.В., аспирант каф. биохимии, врач-онколог, ХНМУ.
 Зайцева О.В., д. мед. н., проф. каф. медицинской и биологической физики ХНМУ.
 Моисеенко А.С., аспирант каф. биохимии ХНМУ.
 Бондаренко М.А., к. физ.-мат. н., доц. каф. медицинской и биологической физики ХНМУ.
 Гордиенко Н.А., к. биол. н., доц. каф. медицинской и биологической физики ХНМУ.

Адрес для переписки:

Зайцева Ольга Васильевна. 61202, г. Харьков, ул. Ахсарова, д. 20-А, кв. 136.
 Тел.: (057) 338 79 22, (067) 375 22 28.
 E-mail: bondaren-koma@yandex.ru