

11. Nakasato T. *Superselective continuous arterial infusion chemotherapy through the superficial temporal artery for oral cavity tumors [Text]* / T. Nakasato // *Am. J. Neuro-radiol.* – 2000. – Vol. 21. – P. 1917–1922.
12. *Stages III and IV squamous cell carcinoma of the mouth: three-year experience with superselective intraarterial chemotherapy using cisplatin prior to definitive treatment [Text]* / T. Hirai, Y. Korogi, S. Hamatake [et al.] // *Cardiovasc. Intervent. Radiol.* – 1999. – Vol. 22, № 3. – P. 201–205.
13. Гуртовая И.Б. *Клиническая оценка химиоэмболизации у больных злокачественными новообразованиями: автореф. дис. на соискание ученой степени канд. мед. наук: 14.00.14 онкология* / Гуртовая Инна Борисовна. — М. — 1999. — 20 с.
14. Чиссов В.И. *Онкология [Текст]* / В.И. Чиссов, С.Л. Дарьялова. — М., 2007. — 560 с.

В.І. Чорна¹, О.Л. Лянна², Н.А. Дорофеева³,
М.І. Хворостенко²

¹Дніпропетровський державний аграрний університет,

²Дніпропетровська державна медична академія,

³Алчевський онкологічний диспансер

Вплив препарату спіруліни на стан протеолізу селезінки опромінених щурів

Influence of Spirulina on the state of spleen proteolysis in irradiated rats

Summary. The mechanisms of spleen intracellular proteolysis function in rats after fractionated x-ray exposure at a dose of 25 cGy as well as correction of the damages to lysosomal-vacuole apparatus of the cell with Spirulina drug (*Spirulina platensis*) are featured. It was established that spleen proteolysis system in all investigated terms was destabilized and had a tendency to activation.

Key words: cathepsin H, fractionated x-ray radiation, spirulina, spleen, rats.

Резюме. Рассмотрены механизмы функционирования внутриклеточного протеолиза селезенки крыс после фракционированного рентгеновского облучения в дозе 25 сГр и коррекции повреждения лизосомально-вакуолярного аппарата клеток препаратом спирулины (*Spirulina platensis*). Установлено, что система протеолиза в селезенке во все исследуемые сроки дестабилизирована и имеет тенденцию к активации.

Ключевые слова: катепсин Н, фракционированное рентгеновское облучение, спирулина, селезенка, крысы.

Ключові слова: катепсин Н, фракціоноване ікс-опромінення, спіруліна, селезінка, щури.

Одним з актуальних завдань сучасної радіобіології є розширення фундаментальних досліджень щодо з'ясування біологічної дії малих доз радіації на всіх рівнях біологічної організації [1]. Інакше неможливо науково оцінити і спрогнозувати наслідки такої дії. Біологічні ефекти, що спостерігаються під впливом малих і змішаних з ними доз радіації, це складна низка подій, пусковим механізмом яких є взаємодія квантів іонізуючого випромінювання з компонентами клітини, а результатом — перебудова режиму її функціонування. Для коректної інтерпретації таких явищ необхідно розуміння молекулярно-клітинних механізмів формування відповіді на опромінення в малих дозах [2]. Прогнозування можливих біологічних ефектів,

зумовлених дією малих доз радіації на ссавців, викликає необхідність пошуку тестів, які б дозволили адекватно оцінити ступінь цього впливу. Одним із перспективних напрямків вважають дослідження активності лізосомних протеаз та їх інгібування, оскільки протеоліз є важливою ланкою в регуляції багатьох біохімічних процесів [3]. У багатьох працях встановлено активацію протеолізу і зниження рівня ендogenous інгібіторів протеїнази у сироватці крові потерпілих від аварії на ЧАЕС і в експерименті [4, 5]. Порушення внутріклітинної компартменталізації протеолітичних ферментів (особливо з лізосомною локалізацією) є одним з важливих ланцюгів розвитку променевої патології, оскільки зміни проникності мембран лізосом під впливом іонізуючої радіації створюють сприятливі умови для виходу катепсинів із лізосом, дезорганізуючи метаболічні процеси в клітині та підсилюючи первинні радіаційні зрушення [6]. Визначення ролі лізосомних протеаз в адаптивно-відновних процесах, які відбуваються в організмі внаслідок дії надзвичайних подразників, складна й актуальна проблема. Лізосомна цистеїнова протеаза — катепсин Н (КФ 3.4.22.16) — виявляє як ендо-, так і амінопептидазну активність. Наявність в її структурі залишків манози свідчить про лізосомну локалізацію і є маркером рецептор-медіованої упаковки ферменту в лізосомах.

До складу синьо-зеленої водорості спіруліни (*Spirulina platensis*) (рис.1) входить набір біологічно активних компонентів: речовини антиоксидантного ряду (бета-каротин, глутатіон, глютамінова кислота, селен, супероксиддисмутаза). Завдяки оптимальному співвідношенню ненасичених і насичених жирних кислот забезпечується висока антиоксидантна та мембранопротекторна активність препарату спіруліни [7]. Дослідженнями Є.М. Горбань зі співавт. встановлені антиоксидантні властивості препарату спіруліни, геропротекторний ефект та корекція радіаційних порушень глюкокортикоїдної функції надниркових

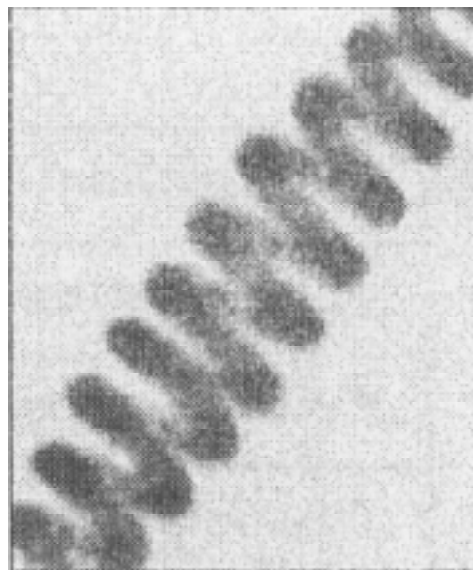


Рис.1. Мікроскопічний вигляд *Spirulina (Arthrospira) platensis*

залоз — відновлення їх реактивності на дію АКТГ й запобігання розвитку пострадіаційного гіпертиреозу [8].

Метою нашого дослідження було вивчення можливості корекції препаратом спіруліни радіаційно-індукованих ушкоджень лізосомного апарату клітин селезінки при фракціонованому тотальному рентгенівському опроміненні щурів за дози 25 сГр з визначенням активності лізосомного цистеїнового катепсину Н.

Досліди проведено на 50 щурах-самцях лінії Вістар. Щурів опромінювали на апараті РУМ-17 за таких технічних умов: напруга 150 кВ, сила струму 6 мА, фільтри 0,5 мм Cu + 2 мм Cu, потужність дози 0,26 сГр/хв, фокусна відповідь 1,86 м, фракціоноване опромінення протягом 25 діб із добовою дозою 1 сГр і сумарною дозою 25 сГр. Термін дослідження після опромінення — 24 і 72 години. Тварин поділяли на 4 групи: I — псевдо-опромінену контрольну, II — тварин, яким згодовували протягом 25 діб препарат спіруліни (450 мг/кг), III — опромінені фракціоновано (1 сГр × 25 діб), IV — групу щурів, яким при фракціонованому опроміненні (1 сГр × 25 діб) згодовували протягом 25 діб препарат спіруліни з розрахунку 450 мг/кг за добу. Після завершення курсового згодовування спіруліни через 24 та 72 години в селезінці піддослідних визначали активність лізосомного цистеїнового катепсину Н у гомогенаті, неседиментованій та седиментованій фракціях. Така постановка експерименту інформативна в плані виявлення змін компартменталізації катепсину Н у клітині [9]. Десятивідсотковий гомогенат готували на 0,025 М трисбуфері з рН 7,4, який містив 0,15 М NaCl та 1 мМ ЕДТА. Неседиментовані і седиментовані фракції отримували на центрифугі VAC-601 (105000 g × 50 хв). Активність катепсину Н виявляли за гідролізом 2-нафтиламідю L-лейцину (Лей-НА) Koch-Light Laboratories, Англія [10]. Питому активність визначали в 1,0 мл інкубаційної суміші з 15 хв преінкубацією ферментів у присутності 2 мМ 2-меркаптоетанолу і 2 мМ Na₂ЕДТО. Активність виражали в мкМ нафтиламіну на 1 мг білка за 1 хв. Кількісну оцінку білка в пробах проводили методом Bradford [11]. Результати опрацьовували статистично загальноприйнятими методами варіаційної статистики [12].

За нашими експериментальними даними встановлені зміни активності та компартменталізації лізосомної цистеїнової ендопептидази з амінопептидазною активністю (катепсин Н) у селезінці при фракціонованому тотальному опроміненні щурів за сумарної дози 0,25 Гр.

Динаміка зміни вільної активності катепсину Н після фракціонованого опромінення представлена на рис. 2. За 24 години після закінчення останнього опромінювання згадана активність підвищувалась у 6,3 разу порівняно з контролем, а через 72 години зростала в 1,2 разу порівняно з попереднім терміном.

Для з'ясування впливу фракціонованого опромінення на стабільність структурної організації мембран лізосом селезінки розглянемо динаміку неседименто-

ваної форми активності катепсину Н у пострадіаційний період. Визначення неседиментованої активності — найбільш поширений і визнаний метод оцінки стабільності лізосомних мембран [9]. Період 24–72 години після опромінювання характеризується односпрямованими змінами, а саме підвищенням неседиментованої активності катепсину Н на 440 та 340 % порівняно з контролем. Це свідчить про радіаційно-індуковані порушення архітекtonіки і стабільності мембран лізосом селезінки. За зміною показників рівнів неседиментованої активності катепсину Н можна визначити ступінь ефекту променевого впливу на лабілізацію мембран лізосом. Ці зміни можуть розглядатися як важливі біохімічні індикатори тяжкості променевого пошкодження.

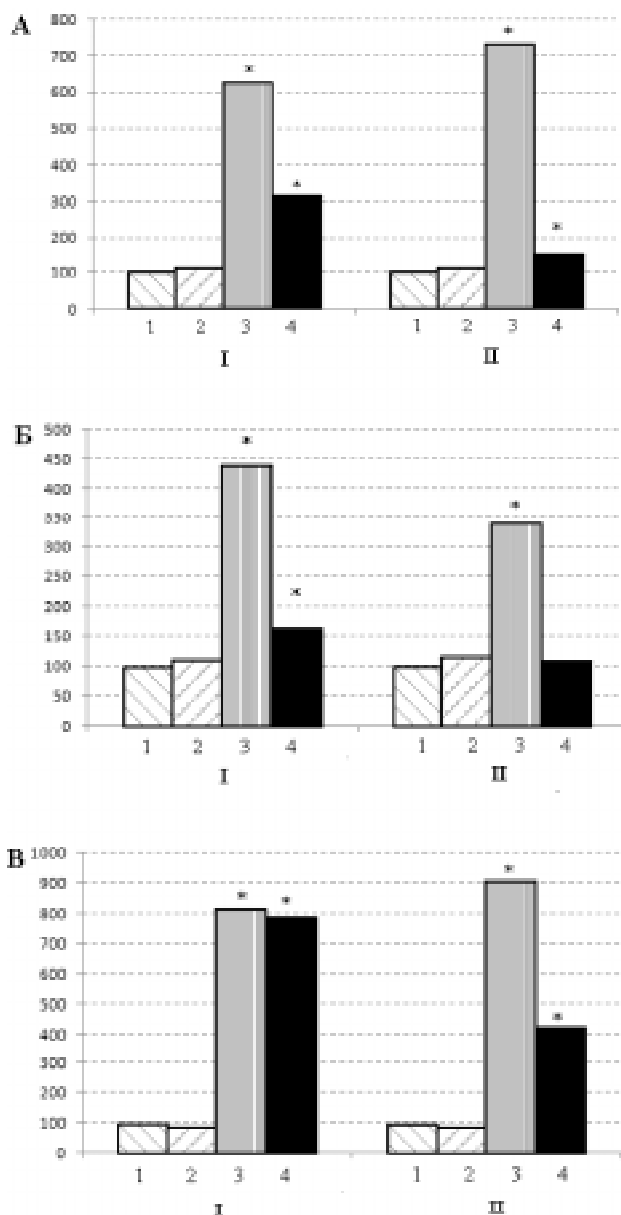


Рис. 2. Вільна (А), неседиментована (Б) та седиментована (В) активність катепсину Н у селезінці щурів (у % від контролю, $M \pm m$, $n = 8-9$): 1 — контроль; 2 — контрольні щури, яким давали спіруліну; 3 — фракціоновано опромінені щури (25 сГр); 4 — опромінені щури, що вживали спіруліну. I — через 24 години; II — через 72 години після опромінювання, * $p < 0,05$ порівняно з контролем

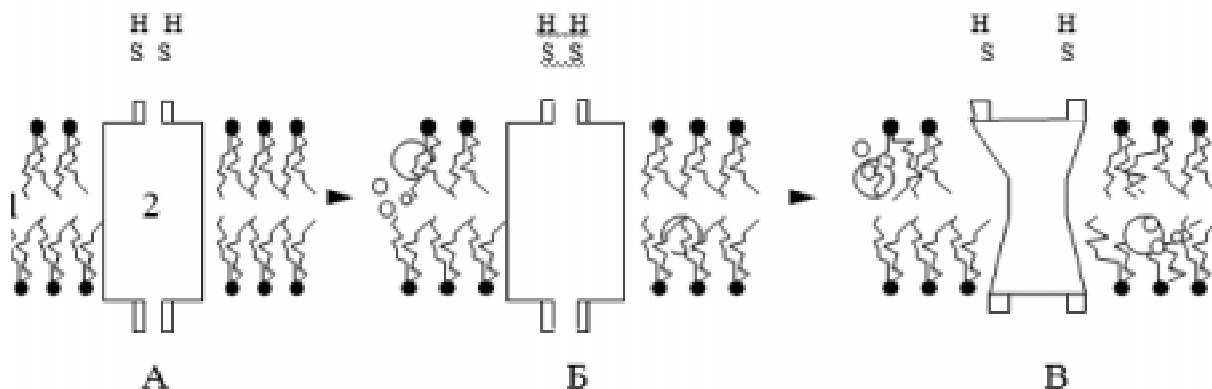


Рис. 3. Біологічні наслідки дії малих доз іонізуючого випромінювання на мембрани клітин (1 — ліпідний бішар; 2 — трансмембранний білок): А — інтактна мембрана (до впливу іонізуючого випромінювання); Б — продукція ліпідних перекисів і вхід води до гідрофобної частини ліпідного бішару; В — структурні та динамічні зміни в ліпідному бішарі мембран та зміна конформації трансмембранних білків

Відомо, що активація перекисного окиснення ліпідів у мембранах клітин тварин, опромінених малими дозами, проявляється насамперед у підвищеній проникності мембран (головним чином, пасивної) для електrolітів і метаболітів [13, 14]. Volpe et al. встановили, що на молекулярному рівні першим наслідком перекисного окиснення ліпідів є проникність води у внутрішні гідрофобні шари мембран (рис. 3), що зумовлює зміни бар'єрних властивостей, а також функціональні порушення білків і ферментів [15]. Подібні зміни ліпідної фази мембрани негативно впливають на її функціональний стан (рецепцію, активний трансмембранний іонний транспорт тощо) та свідчать про виснаження компенсаторних механізмів [16].

Малі дози випромінень істотно не впливають безпосередньо на білки мембран, але здатні викликати окисдацію ліпідів і порушення конформаційних і функціональних властивостей мембран [17].

Зміни мембранозв'язаної форми активності катепсину Н у селезінці в динаміці пострадіаційного періоду після фракціонованого рентгенівського опромінювання представлені на рис. 2В.

Через 24 та 72 години після опромінювання седиментована активність катепсину Н підвищувалась і набувала максимального значення. В цьому випадку може мати місце більш швидке оновлення популяції лізосом селезінки опромінених тварин. Особливості змін вільної і неседиментованої активності катепсину Н свідчать про перерозподіл їх зі зв'язаної форми, а також про збільшення кількості лізосом, підсилення авто- і гетерофагоцитозу.

Узагальнюючи результати, можна сформулювати такі закономірності для лізосомного цистеїнового катепсину Н селезінки: лізосомно-вакуолярний апарат клітини відповідає реакцією активації на дію іонізуючого випромінювання за дози 25 сГр, яка доцільна і спрямована на адаптивну перебудову метаболізму клітини і тільки надмірна лабілізація мембран лізосом призводить до виходу цистеїнових катепсинів у цитоплазму.

Згодовування препарату спіруліни щурам протягом 25 діб під час фракціонованого опромінювання сприяло

зниженню активності катепсину Н у селезінці. Так, рівні вільної та седиментованої активності знизилися за 24 години на 50 та 63 % порівняно з групою опромінених щурів відповідно. Аналогічна тенденція спостерігалася і через 72 години після опромінювання. Неседиментована активність катепсину Н у селезінці опромінених тварин, які отримували спіруліну через 72 години, знизилася, порівняно з такою у опромінених щурів, на 69 % ($p < 0,05$) і вірогідно не відрізнялася від контрольних показників.

Спіруліна має високу антиоксидантну активність і запобігає накопиченню МДА у тканинах [18] за рахунок вмісту біологічно активних речовин — мікроелементів, вітамінів, амінокислот, есенціальних жирних кислот [19] і, таким чином, забезпечує мембранопротекторну активність, як ми визначили, на рівні лізосомної мембрани селезінки щурів.

Активність катепсину Н у седиментованій фракції селезінки опромінених тварин, які отримували спіруліну, на 56 % вірогідно зменшилася порівняно з такою у групі опромінених щурів через 72 години.

У групі неопромінених щурів, яким додавали до корму препарат спіруліни, показники активності лізосомного цистеїнового катепсину Н порівняно з контролем вірогідно не змінювалися (див. рис. 2).

Таким чином, за дози 25 сГр відбувається лабілізація мембран лізосом селезінки фракціоновано опромінених щурів за ферментативним критерієм, тобто значним підвищенням рівня вільної і неседиментованої активності лізосомного цистеїнового катепсину Н, що можна інтерпретувати як тригерне перемикання лізосом в інший режим функціонування, коли потужність систем репарації стає недостатньою для ефективного усунення пошкоджень.

Згодовування препарату синьо-зеленої водорості спіруліни опроміненим щурам запобігає активації процесів внутріклітинного протеолізу та справляє нормалізуючий вплив на вільну, неседиментовану, седиментовану форми активності цистеїнового катепсину Н у селезінці фракціоновано опромінених щурів за дози 25 сГр, що свідчить про високу мембранопротекторну активність спіруліни, яка містить антиоксидантні

компоненти (С-фікоціанін, β-каротин, вітамін В₁₂, мінерали).

Література

1. Чорна В.І., Лянна О.Л. // *Наук. праці.* — 2008. — Т. 102, вип. 89. — С. 94–98.
2. Гераськин С.А. // *Радиац. биол. Радиоэкол.* — 1995. — Т. 35, № 5. — С. 571–580.
3. Mohamed M.M., Sloane B.F. // *Nature.* — 2006. — Vol. 6. — P. 764–775.
4. Суркенова Г.Н., Малахова Л.В., Газиев А.И. // *Радио-биол.* — 1999. — Т. 30, № 6. — С. 740–748.
5. Lykholat E.A., Chornaya V.I. // *Укр. биохим. журн.* — 1999. — Т. 71, № 3. — С. 82–85.
6. Чорна В.І., Лянна О.Л. // *Наук. праці.* — 2009. — Т. 116, вип. 103. — С. 23–28.
7. Купраш Л.П., Чекман Н.С., Горчакова Н.А. *Спирулина и здоровье.* — Николаев, 2000. — 76 с.
8. Горбань Е.Н., Юрженко Н.Н., Брюзгина Т.С. и др. // *Вестн. гиг. и эпидемиол.* — 2002. — Т. 6, № 1. — С. 25–27.
9. Покровский А.А., Тутельян В.А. *Лизосомы.* — М.: Наука, 1976. — 382 с.
10. Schwartz W.N., Barrett A.J. // *Biochem. J.* — 1980. — Vol. 191, № 2. — P. 487–497.
11. Bradford M.M. // *Analyt. Biochem.* — 1976. — Vol. 72. — P. 248–254.
12. Лакин Г.Ф. *Биометрия.* — М.: Высш. шк., 1990. — 352 с.
13. Чорна В.І. // *УРЖ.* — 2000. — Т. VIII, вип. 3. — С. 269–271.
14. Барабой В.А., Олійник С.А., Блюм І.О. та ін. // *Укр. біохім. журн.* — 1994. — № 5. — С. 39–47.
15. Volpe P., Parasassi T., Sapora O. et al. // *Internat. J. Radiat. Med.* — 1999. — 1(1). — P. 78–89.
16. Барабой В.А., Сутковой Д.А. *Окислительно-антиоксидантный гомеостаз в норме и патологии* — К.: Наук. думка, 1997. — 420 с.
17. Parasassi T., Giusti A., Raimondi M. et al. // *Free Radic. Biol. Med.* — 1995. — № 19. — P. 511–516.
18. Горбань Е.М., Топольнікова Н.В. // *УРЖ.* — 2003. — Т. XI, вип. 2. — С. 83–86.
19. Belay A. // *J. Amer. Nutraceutic. Assoc.* — 2002. — Vol. 5, № 2. — P. 27–48.

А.О. Шумило

Донецький обласний протипухлинний центр,
Донецький національний медичний
університет ім. М. Горького

Шляхи поліпшення результатів комбінованого лікування хворих на місцево-поширений рак шийки матки

The ways of improvement of combination therapy results in patients with local cervical cancer

Summary. A new solution of a scientific task of modern oncogynecology, improvement of the efficacy of treatment for local cervical cancer (CC) on the account of expansion of the indications to operative treatment is presented on the clinical material (275 patients with stage II-III CC). The use of the developed technique of multimodality therapy based on the split course of combination radiation therapy against a background of neoadjuvant chemotherapy allowed to convert in 49.6% of cases of immobile tumor process to an operable stage followed by uterus and adnexae removal while at the traditional combination radiotherapy the resectability index was 6.9%. The developed method of chemoradiation therapy for inoperable local CC allows to reduce 1.5 times the frequency of early radiation complications when compared with the controls as

well as completely exclude such late radiation complications as fistula formation. Satisfactory results of 5-year survival, 68.4% for the general group and 75.5% for the operated patients were obtained.

Key words: local cervical cancer, multimodality treatment.

Резюме. На основанні клінічного матеріала — 275 больних раком шийки матки (РШМ) II–III стадії представлено нове рішення наукової задачі сучасної онкогінекології — підвищення ефективності лічення місцево-розпространеного РШМ за счет розширення показаній к оперативному ліченню. Використання розробаного способу комбінованого лічення, основаного на розщепленому курсі поєднаної лучевої терапії на фоні неoad'ювантної хіміотерапії дозволило привести в 49,6 % випадків іммобільний опухольовий процес в резектабельне стан з наступним виконанням екстирпачії матки з придатками, в той час як при традиційному поєднаному курсі лучевої терапії величина показателя резектабельності складала 6,9 %. Розробаний спосіб хіміолучевого лічення нерезектабельного місцево-розпространеного РШМ дозволяє знизити частоту ранніх пострадіаційних ускладнень в 1,5 рази по порівнянню з контрольною групою, повністю виключити такі пізні лучеві ускладнення, як образование свищів. Отримані задовільні результати 5-річної виживаємості — 68,4 % для загальної групи дослідної групи і 75,5 % для больних, підвергнутих оперативному ліченню, відповідно.

Ключові слова: місцево-розпространений рак шийки матки, комбіноване лічення.

Ключові слова: місцево-поширений рак шийки матки, комбіноване лікування.

З 1999 року на базі гінекологічного і радіологічного відділень Донецького обласного протипухлинного центру розпочато впровадження в клінічну практику хемопроменевого і комбінованого методів лікування хворих на місцево-поширений рак шийки матки (РШМ) з використанням двоетапної (розщепленої) методики опромінювання.

Дослідженню піддавали 275 хворих на місцево-поширений нерезектабельний РШМ II–III стадії, які одержували різні варіанти лікування на базі протипухлинного центру за період 1999–2005 рр. До дослідної групи ввійшли 145 хворих, яким проводили хемопроменеве лікування з використанням двоетапної розщепленої методики поєднаної променевої терапії (ППТ) на фоні хемотерапії (ХТ) 5-фторурацилом. Контрольну групу склали 130 пацієнток, яким був проведений курс ППТ за стандартною методикою.

Аналіз вікових особливостей хворих на РШМ дослідної і контрольної груп дозволив установити, що більшість з них перебувала у віці від 30 до 49 років — 117 (80,7 %) і 104 (80,0 %) відповідно. При порівнянні частоти виявлення різних гістологічних типів пухлин у дослідних групах хворих на РШМ установлено, що більшість випадків припадає на частку плоскоклітинного раку: 86 (59,3 %) випадків у дослідній групі й 75 (57,8 %) — у контрольній. Рідше виявлялася аденокарцинома — в 45 (31,1 %) пацієнток дослідної групи і 42 (32,4 %) — контрольної. Кількість випадків недиференційованого раку у дослідній і контрольній групах складала 14 (9,6 %) і 13 (10,0 %). Екзофітна форма росту пухлини, яка зустрічалася найчастіше, виявлена у хворих на РШМ дослідної і контрольної групи в 59,3 і 62,3 % випадку. Більш ніж у половини хворих (56,0 %) дослідної і контрольної групи — 56,0 і 57,8 %, була виявлена