

УДК 616.316-008.8:616-006

**ГИДРОЛИТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ СЛЮНЫ В
ОЦЕНКЕ СОСТОЯНИЯ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ
БОЛЬНЫХ**Г.А. Суханова¹, Л.И. Мусабаева², Н.Н. Кувшинов³¹ Сибирский государственный медицинский университет² Томский НИИ онкологии³ Томский государственный университет

E-mail: galsu2012@yandex.ru, nkuv@mail.tsu.ru

Суханова Галина Алексеевна, д-р биол. наук, профессор, профессор кафедры биохимии и молекулярной биологии Сибирского государственного медицинского университета.
E-mail: galsu2012@yandex.ru
Область научных интересов: биохимия, физиология.

Мусабаева Людмила Ивановна, д-р мед. наук, профессор, главный научный сотрудник отделения радиологии Томского НИИ онкологии.
E-mail: galsu2012@yandex.ru
Область научных интересов: онкология, лучевая терапия.

Кувшинов Николай Николаевич, ст. преподаватель кафедры физиологии человека и животных Института биологии, экологии, почвоведения, сельского и лесного хозяйства Томского государственного университета.
E-mail: nkuv@mail.tsu.ru
Область научных интересов: биохимия, радиобиология.

Определение активности калликрейна слюны является одним из перспективных методов контроля за развитием опухолей в области головы и шеи и эффективности лучевой терапии. Цель исследования заключалась в изучении активности амилазы и калликрейна слюны в условиях проведения курса сочетанной лучевой терапии больных со злокачественными новообразованиями области головы и шеи. Определяли активность α -амилазы (по наборам Лахема, Чехия) и калликрейна (по БАЭЭ-эстеразной активности). Активность калликрейна и калликрейногена слюны у больных со злокачественными опухолями головы и шеи была в 2,6 и 3,8 раза выше, чем в группе практически здоровых лиц, в то время как активность амилазы не изменялась. При сочетанной нейтронно-фотонной лучевой терапии активность калликрейна слюны снижалась до 20 % от исходного уровня. Обнаружена дозовая зависимость угнетения активности калликрейна слюны, более выраженная при действии нейтронов, чем фотонов. Снижение активности калликрейна до критической величины, составляющей 100 Е/л, является показателем необратимых реакций, связанных с дистрофическими изменениями слюнных желез и слизистой полости рта.

Ключевые слова:

Калликреин, амилаза слюны, опухоли головы и шеи, облучение.

Изучение активности ферментов слюны является одним из способов контроля за развитием и лечением заболеваний. Наиболее хорошо изученным ферментом слюны является α -амилаза, функции которой состоят в расщеплении полисахаридов пищи. Калликреин слюны, образующийся в значительных количествах в подчелюстных железах, участвует в поддержании кровотока железистой ткани, стимуляции проницаемости капилляров ротовой полости [1, 2]. Основываясь на этой функции, активность калликрейна слюны была использована как показатель состояния слюнных желез и слизистой оболочки полости рта у онкологических больных. После облучения онкологических больных в области головы и шеи снижается функциональная активность слюнных желез вплоть до полного отсутствия выделения слюны [3]. Изучение активности амилазы и калликрейна слюны у больных с опухолями полости рта проводилось для оценки эффективности курса лучевой терапии.

Цель исследования заключалась в изучении активности амилазы и калликрейна слюны в условиях проведения курса сочетанной лучевой терапии больных со злокачественными новообразованиями области головы и шеи.

Материал и методы исследования. Под наблюдением находилось 36 пациентов клиник Томского НИИ онкологии со злокачественными новообразованиями головы и шеи с локализацией опухоли в полости рта, слюнных железах, метастазами рака в лимфатические узлы шеи. Из них 25 мужчин и 11 женщин в возрасте 35–60 лет. Контрольную группу составили 8 человек (5 мужчин и 3 женщины).

Сочетанную лучевую терапию проводили в двух вариантах с различной последовательностью применения нейтронного и фотонного излучений. По первому варианту курс включал на первом этапе нейтронную терапию, а затем фотонное облучение. По второму варианту больные получали на первом этапе фотонную лучевую терапию, а затем лечение дополняли быстрыми нейтронами. Лучевая терапия быстрыми нейтронами ~ 6,0 МэВ проводилась на циклотроне У-120 разовой очаговой дозой 1,2 Гр 2 раза в неделю до суммарной дозы 7,2 Гр. Фотонную терапию осуществляли на аппарате «Рокус» по 2,0 Гр ежедневно, 5 раз в неделю до суммарной очаговой дозы 40 Гр. Курсовая доза сочетанной лучевой терапии при первом и втором варианте составляла 60–65 Гр.

До начала лучевой терапии и в конце каждой недели после сеансов облучения быстрыми нейтронами и фотонами у каждого больного собирали 1–3 мл слюны в полиэтиленовую пробирку и определяли активность α -амилазы, калликреина и калликреиногена.

Активность α -амилазы (КФ 3.2.1.1) определяли с помощью наборов Lachema (Чехия). К 1 мл слюны, разбавленной в три раза фосфатным буфером (рН 7,4), добавляли 1 мл нерастворимого крахмального субстрата, инкубировали 15 мин при 37 °С. Пробы осаждали раствором сульфосалициловой кислоты, центрифугировали при 3000 об/мин в течение 15 мин, измеряли оптическую плотность надосадочной жидкости при 590 нм. Активность калликреина (КФ 3.4.21.8) определяли по методу Т.С. Пасхиной, А.В. Кринской [4] в нашей модификации для слюны. У больных с опухолями головы и шеи собирали 1–3 мл слюны в полиэтиленовую пробирку, центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин. 0,25 мл центрифугата разводили в три раза 0,02 М фосфатным буфером (рН 7,0), переносили на колонку из полистирола объемом 3×0,8 см, заполненную DEAE-сефадексом А-50. Фермент элюировали 0,02 М фосфатным буфером, содержащим 0,05 М NaCl (рН 7,0) со скоростью 1 мл/мин, довели объем до 5,0 мл. Для определения активности калликреина к 1 мл элюата добавляли 1 мл 0,1 М фосфатного буфера (рН 8,0) и 1 мл 1,5 мМ раствора БАЭЭ (бензоил-аргининовый эфир, Reanal, Венгрия), измеряли прирост оптической плотности при 253 нм в течение 15 мин. Для определения активности калликреиногена к 1 мл элюата добавляли 0,8 мл 0,1 М фосфатного буфера (рН 8,0) и 0,1 мл 0,1% раствора трипсин-ингибитора из сои (ICN, США) в 0,1 М фосфатном буфере (рН 8,0), через 15 мин вносили 1 мл 1,5 мМ раствора БАЭЭ. Активность калликреина и калликреиногена выражали в Е/л слюны.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием критерия Манна – Уитни.

Результаты исследования. Активность ферментов слюны у 36 больных с опухолями головы и шеи сопоставлена с данными 8 практически здоровых лиц, составивших контрольную группу. Средние показатели активности амилазы слюны у онкологических больных практически не отличались от контрольной группы ($P > 0,05$). В отличие от амилазы, активность калликреина была в 2,6 раза, а калликреиногена – в 3,8 выше, чем в группе здоровых лиц (табл. 1).

Таблица 1. Активность ферментов слюны (Е/л) здоровых и больных с опухолями головы и шеи ($M \pm m$)

Группы наблюдения	<i>n</i>	α -амилаза	Калликреин	Калликреиноген
Здоровые	8	529,6 ± 20,6	260,7 ± 12,5	65,6 ± 3,7
Больные	36	534,4 ± 6,20	672,6 ± 16,5	252,9 ± 13,1
		$p > 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$

Курс сочетанной лучевой терапии проводился в двух вариантах: нейтронно-фотонной и фотонно-нейтронной. При обоих вариантах лучевой терапии активность амилазы слюны увеличивалась, а активность калликреина и калликреиногена, напротив, резко снижалась. Наиболее значительные изменения выявлены при действии нейтронного облучения (рис. 1). Изменения активности ферментов слюны зависели от дозы и типа излучения. В первом варианте увеличение активности амилазы имело прямо пропорциональную зависимость от дозы нейтронного облучения; γ -облучение на этом фоне практически не изменяло активности амилазы слюны.

Нейтронное облучение угнетало активность калликреина на 79 %, а при последующем γ -облучении – ещё на 15 %. Активность калликреиногена в этих же условиях изменялась аналогично активности калликреина (табл. 2).

Таблица 2. Активность ферментов слюны (Е/л) у больных со злокачественными новообразованиями головы и шеи при сочетанной нейтронно-фотонной терапии

Ферменты слюны	до лечения	после нейтронной терапии	после фотонной терапии
Амилаза	533,4 ± 6,2	909,5 ± 10,5	937,0 ± 8,2
Калликреин	672,6 ± 16,5	138,9 ± 20,4	117,0 ± 5,8
Калликреиноген	2529,0 ± 31,5	791,9 ± 16,4	730,6 ± 14,0

Различия достоверны для каждого показателя в сравнении с группой до лечения ($p < 0,05$)

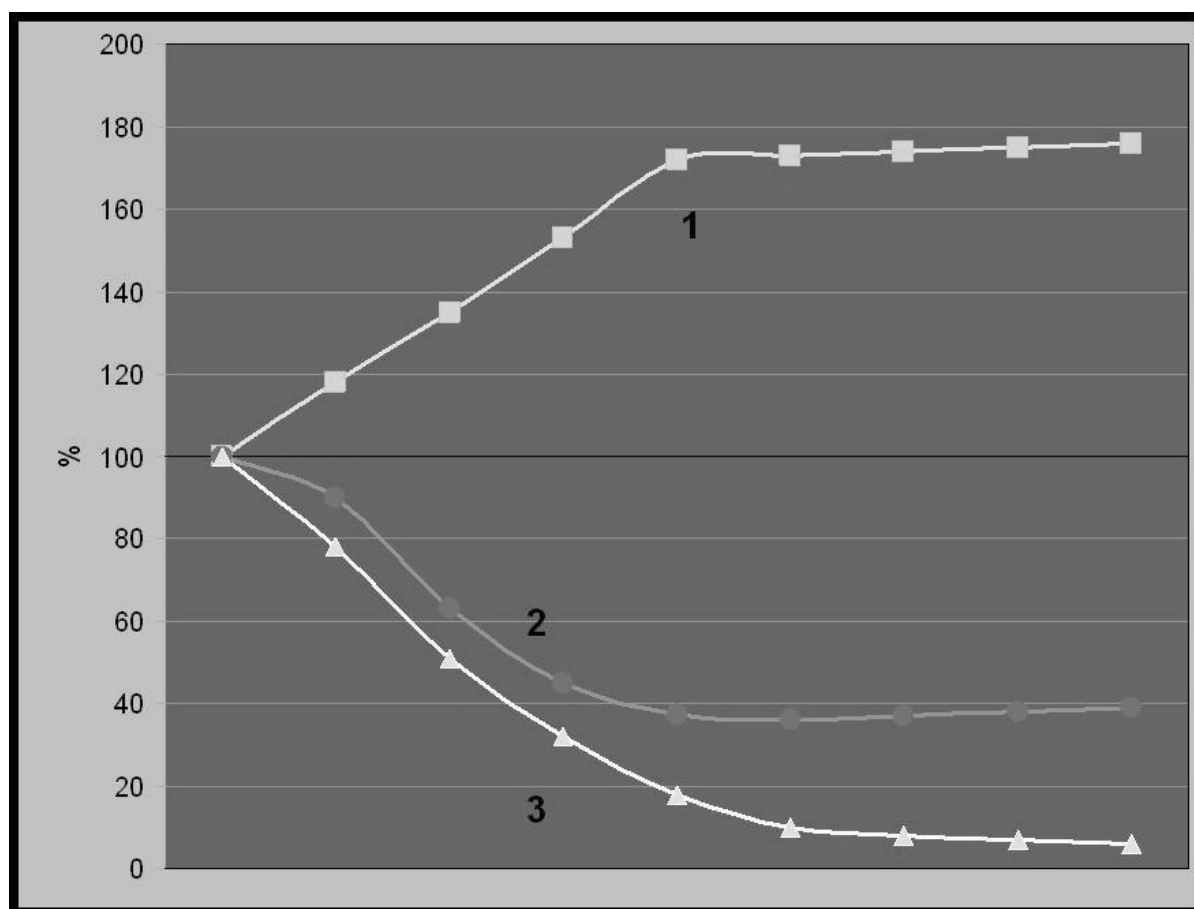


Рис. 1. Активность амилазы (1), калликреина (2) и калликреиногена (3) слюны больных при нейтронно-фотонном облучении (значения контроля приняты за 100 %). Дозы нейтронного облучения: 1,2 Гр 2 раза в неделю до суммарной дозы 7,2 Гр. Дозы фотонного облучения: 2,0 Гр ежедневно, 5 раз в неделю до суммарной очаговой дозы 40 Гр

Увеличение активности амилазы после второго варианта облучения происходило как при γ -, так и при нейтронном облучении. После γ -облучения активность амилазы слюны увеличивалась на 33 %, после нейтронного – ещё на 29 %. Активность калликреина слюны понижалась после γ -облучения на 40 %, после нейтронного – на 29 %. Активность калликреиногена уменьшалась на 26 и 61 % соответственно (табл. 3).

Таблица 3. Активность ферментов слюны (Е/л) у больных со злокачественными новообразованиями головы и шеи при сочетанной фотонно-нейтронной терапии

Ферменты слюны	до лечения	после фотонной терапии	после нейтронной терапии
Амилаза	533,4 ± 6,2	642,7 ± 12,4	937,0 ± 8,2
Калликреин	672,6 ± 16,5	508,4 ± 16,7	117,7 ± 6,8
Калликреиноген	2529,0 ± 31,5	2083,0 ± 38,3	729,2 ± 18,6

Различия достоверны для каждого показателя в сравнении с группой до лечения ($p < 0,05$)

В дальнейшем курсы сочетанной лучевой терапии проводили под контролем активности калликреина слюны, который использовали в качестве критерия толерантности окружающих тканей, в частности слизистой оболочки, у больных с локализацией опухоли в полости рта или в случаях, когда полость рта и область околоушной слюнной железы непосредственно включалась в зону облучения.

Анализируя полученные данные, необходимо отметить, что активность амилазы слюны онкологических больных практически не отличалась от здоровых лиц того же возраста, составивших контрольную группу, тогда как активность калликреина и калликреиногена у них значительно возрастала. Эти данные позволяют рекомендовать определение активности калликреина слюны перед проведением лечебных процедур для онкологических больных. Следует также отметить, что активность амилазы, наиболее известного гидролитического фермента слюны, у онкологических больных не изменялась, а при лучевой терапии повышалась, что, возможно, обусловлено радиационно-индуцированной дисфункцией слюнных желез [5].

В связи с полученными результатами возникла проблема выбора критерия значимости в контроле лучевой терапии больных с опухолями в области головы и шеи. Сравнение показателей активности калликреина в группе здоровых лиц, больных до облучения и результатов обоих вариантов облучения дает основание считать критической величину активности калликреина, достигающую 100 Е/л. При этом значении необходимо рекомендовать прекращение последующего облучения больного. Снижение активности фермента до этих величин, очевидно, является показателем необратимой реакции, при которой нарастают явления ксеростомии, связанной с дистрофическими изменениями слюнных желез и слизистой оболочки полости рта.

Выводы

1. Активность калликреина и калликреиногена слюны у больных со злокачественными опухолями, локализованными в области головы и шеи, значительно выше, чем у практически здоровых лиц. Активность амилазы у этих больных не отличается от контроля.
2. Показатель активности калликреина слюны является критерием толерантности слизистой оболочки полости рта и слюнных желез при лучевой терапии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Протеолиз в норме и при патологии / К.Н. Веремеенко, О.П. Голобородько, А.И. Кизим. – Киев: Здоров'я, 1988. – 200 с.
2. Слюнные железы (биохимия, физиология, клинические аспекты) / Л.М. Тарасенко, Г.А. Суханова, В.П. Мищенко и др. – Томск: Изд-во НТЛ, 2002. – 124 с.
3. Состояние полости рта у лиц после радиационного облучения в области головы и шеи / Т.П. Терешина, К.Н. Косенко, О.Г. Цымбалюк // Вестник стоматологии. – 2010. – № 1 (70). – С. 13–15.
4. Пасхина Т.С., Кринская А.В. Количественное определение калликреина и калликреиногена в сыворотке (плазме) крови человека // Современные методы в биохимии; под ред. В.Н. Ореховича. – М., 1977. – С. 157–163.
5. Chitra S., Shyamala Devi C. Effects of radiation and [alpha]-tocopherol on saliva flow rate, amylase activity, total protein and electrolyte levels in oral cavity cancer // Indian Journal of dental research. – 2008. – V. 19 (3). – P. 213–218.

Поступила 11.11.2014.