

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МЕДИЦИНА

УДК 616-066.6:577

Т. П. Генинг, Т. В. Абакумова, Д. Р. Арсланова,
И. И. Антонеева, Е. Г. Сидоренко, С. О. Генинг

ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ НЕОПЛАЗМЫ И АСЦИТИЧЕСКОЙ ЖИДКОСТИ В ДИНАМИКЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО КАНЦЕРОГЕНЕЗА¹

Аннотация. В опухолевых клетках и асцитической жидкости крыс на логарифмической и терминальной стадиях экспериментального рака яичников определяли уровень малонового диальдегида, окислительную модификацию белков и активность антиоксидантных ферментов: каталазы, супероксиддисмутазы, глутатионредуктазы, глутатион-S⁻-трансферазы и уровень GSH. Установлено в опухолевых клетках усиление перекисного окисления липидов и окислительной модификации белков в логарифмическую фазу роста и возрастание активности глутатионового звена антиоксидантной системы в терминальную фазу.

Ключевые слова: рак яичников, опухолевые клетки, асцитическая жидкость, перекисное окисление липидов, окислительная модификация белков, антиоксидантная защита.

Abstract. In tumoral cells and ascitic liquids of rats at a logarithmic and terminal stage of an experimental ovarian cancer the authors have defined a level malondialdehyde, oxidizing modification of fibers and activity of antioxidant enzymes: catalases, superoxide dismutase, glutathione reductase, glutathione-S⁻-transferase and a level of GSH. It has been established that in tumoral cells one may observe strengthening of lipoperoxidations and oxidizing modification of fibers in a logarithmic growth phase and increase of antioxidant system's glutathione link activity in a terminal phase.

Key words: ovarian cancer, tumoral cells, ascitic liquid, lipoperoxidation, oxidizing modification of fibers, antioxidant protection.

Опухолевая трансформация сопровождается изменением внутриклеточного метаболизма, в том числе образованием и утилизацией активных форм кислорода (АФК). Существовало мнение, что на стадии развития в неоплазме повышен уровень антиоксидантных ферментов, что, возможно, защищает клетку от гибели [1]. В то время как установившиеся опухоли, по данным ряда авторов, характеризуются низким уровнем антиоксидантных ферментов, что связано с влиянием этих ферментов на процессы пролифера-

¹ Работа выполнена при поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России».

ции [2]. В то же время существует мнение, что в результате недостаточности митохондриального дыхания в неопластических клетках повышается содержание АФК и экспрессия супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы [3].

Состояние липидов и белков клеточной мембраны является определяющим для поддержания формы, функциональной активности и контактов с другими клетками. На сегодня в литературе нет единого мнения относительно активности перекисного окисления липидов (ПОЛ) в мембранах опухолевых клеток. По данным одних авторов [2, 4, 5], уровень ПОЛ снижен, антиокислительная активность и окисляемость липидов невысоки, что может объясняться повышением уровня ненасыщенных жирных кислот. Низкий уровень последних и повышенное содержание холестерина увеличивают ригидность, но не снижают уровень жизнедеятельности опухолевых клеток. В то же время в динамике опухолевой прогрессии могут возникать и отбираться варианты опухолевых клеток с высоким уровнем ПОЛ.

Согласно данным литературы, окислительная модификация белков (ОМБ) на сегодня может рассматриваться как один из ранних индикаторов повреждения ткани при свободно-радикальной патологии [6]. Показано, что при действии АФК нарушается нативная конформация белков и образуются крупные белковые агрегаты (при действии гидроксильных радикалов) либо низкомолекулярные фрагменты (при действии гидроксильных радикалов вкупе с супероксидными анионами). Предлагается два механизма ОМБ: первый механизм предполагает конъюгацию липидных пероксидов с аминокислотными остатками в белках [7]; второй механизм – окисление АФК с образованием карбонильных производных. Последние – это стабильные продукты, которые формируются при металл-катализируемом окислении белков. В поддержании тиосульфидного состояния белков и защите клеток от окислительного стресса существенную роль играет ферментативное звено антиоксидантной системы (АОС).

Таким образом, на сегодня не существует однозначных представлений о роли механизмов свободно-радикальной патологии в динамике канцерогенеза.

Цель исследования – оценка окислительно-восстановительного потенциала неоплазмы и асцитической жидкости в динамике экспериментального канцерогенеза.

1. Материал и методы исследования

Для моделирования опухоли использовали инбредных крыс в возрасте 4 месяцев массой 120 г ($n = 12$), которым внутрибрюшинно перевивали штамм ОЯ (асцитная опухоль яичника, банк опухолевых штаммов РОНЦ им. Блохина) в объеме 0,5 мл 9-дневного инокулята (асцитическая жидкость с опухолевыми клетками). Прогрессирование данного типа опухоли проходило в три этапа: логарифмическая (на 4-й день после перевивки), стационарная (на 9-й день) и терминальная (на 14-й день) фазы. Асцит отбирался под эфирным наркозом. При выполнении эксперимента руководствовались правилами проведения работ и использования экспериментальных животных, утвержденными Приказом Министерства здравоохранения СССР № 755 от 12 августа 1977 г., а также положениями Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации от 1964 г., дополненной в 1975, 1983 и 1989 гг., а также требованиями этического комитета Института медицины, экологии и физической культуры Ульяновского государственного университета.

Интенсивность ПОЛ оценивали по уровню вторичного продукта – малонового диальдегида (МДА) в тесте с тиобарбитуровой кислотой [8], а ОМБ – по уровню карбонильных производных белков, которые определяли по методу Е. Е. Дубининой [9]. Активность СОД в биологическом материале определяли по методу М. Nishikimi в модификации Е. Е. Дубининой [10, 11]. Определение активности каталазы основано на определении скорости утилизации H_2O_2 в реакционной смеси [12], активности глутатион-редуктазы – на измерении скорости окисления NADPH, которая регистрируется по уменьшению оптической плотности при длине волны 340 нм в присутствии окисленного глутатиона [12]. Активность глутатион-S-трансферазы определяли по скорости образования глутатион-S-конъюгатов между GSH и 1-хлор-2,4-динитробензолом при длине волны 340 нм [13]. Определение количества восстановленного глутатиона (GSH) основано на взаимодействии GSH с 5,5-дитио-бис-2-нитробензойной кислотой с образованием окрашенного в желтый цвет аниона 2-нитро-5-тиобензоата. Увеличение концентрации желтого аниона в ходе данной реакции регистрировали спектрофотометрически при длине волны 412 нм [14]. Активность антиоксидантных ферментов и уровень МДА пересчитывались на 1 мг белка, который определяли по методу Брэдфорда [15]. При статистической обработке применяли непараметрический критерий Манна–Уитни (Stata v.6.0).

2. Результаты и их обсуждение

В результате проведенных исследований было установлено возрастание уровня карбонильных групп белков как в опухолевой ткани (ОК), так и в асцитической жидкости (АЖ) животных с экспериментальным раком яичников (РЯ) (рис. 1).

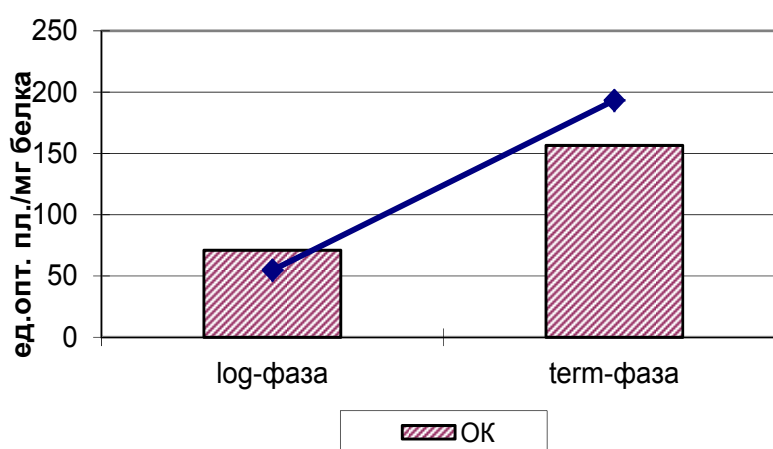


Рис. 1. Уровень карбонильных производных белков в лизате опухолевых клеток и асците в динамике канцерогенеза экспериментального РЯ

В результате серии исследований, посвященных оценке окислительной модификации белков при различных патологиях, появился термин «карбонильный стресс» [16, 17], поскольку определение карбонильных производных белков в плазме, сыворотке, клетках крови [18] и в тканях [19] свидетельствовало о повышении их содержания. Наиболее существенным является инактивация ферментов в результате ОМБ [20]. Кроме этого, модификация белков

делает их более чувствительными к протеолизу [21–23]. T. Nystrom было высказано предположение о возможности развития карбонилового стресса и в отсутствие избыточной генерации АФК и снижения АОЗ. Этот путь связан с продукцией абберантных белков, которые образуются, например, при стрессе, и карбонилирование необходимо для их деградации [24].

В результате проведенных исследований было установлено повышение уровня МДА в ОК и АЖ на терминальной стадии по сравнению с логарифмической (табл. 1).

Таблица 1

Уровень МДА в опухолевых клетках и асцитической жидкости
асцитной опухоли яичников на различных стадиях канцерогенеза

Стадия/субстрат	ОК, мкмоль/мг белка ($M \pm m$)	АЖ, мкмоль/л ($M \pm m$)
Логарифмическая	$10,25 \pm 0,51$	$4,25 \pm 0,31$
Терминальная	$18,62 \pm 1,45^*$	$7,43 \pm 0,57^*$

Примечание. * – данные статистически значимо отличаются от аналогичных на предыдущей стадии экспериментального РЯ.

Основными индукторами окислительной модификации белков являются АФК и продукты ПОЛ при снижении антиоксидантной защиты. АФК нарушают нативную конформацию ряда доменов белков. При этом увеличивается число гидрофобных остатков на поверхности глобул, что приводит к образованию крупных белковых конгломератов. Радикалы липидов также вызывают фрагментацию белковых молекул.

В результате проведенных исследований установлено возрастание активности в опухолевых клетках АОЯ глутатионового звена антиоксидантной защиты в терминальной стадии по сравнению с логарифмической стадией роста опухоли (табл. 2), что может свидетельствовать о нарастающей диспропорции образования O_2 и H_2O_2 , характерной для некоторых опухолей [25].

Таблица 2

Показатели компонентов АОС в ОК и АЖ
в динамике экспериментального канцерогенеза ($M \pm m$)

Показатели	Серия	ГР, ммоль/мин/мг белка	ГТ, ммоль/мин/мг белка	GSH, ммоль/мг белка	СОД, усл.ед./мг белка	Каталаза, ммоль/мин/мг белка
ОК	log-фаза	$6,73 \pm 0,560$	$137,1 \pm 17,711$	$34,0 \pm 3,932$	$147,7 \pm 25,20$	$0,41 \pm 0,057$
	term-фаза	$7,25 \pm 0,710$	$331,2 \pm 61,765^*$	$54,3 \pm 7,846^*$	$130,5 \pm 18,60$	$0,38 \pm 0,049$
АЖ	log-фаза	$3,20 \pm 0,330$	$7,28 \pm 0,473$	$6,57 \pm 1,043$	–	$0,44 \pm 0,052$
	term-фаза	$4,00 \pm 0,250$	$7,87 \pm 1,007$	$6,87 \pm 0,398$	–	$0,92 \pm 0,070$

Примечание. * – данные статистически значимо отличаются от аналогичных на предыдущей стадии.

Таким образом, полученные данные позволяют предполагать возникновение оксидативного и карбонильного стресса в опухолевых клетках в логарифмическую фазу роста асцитной опухоли яичников.

Заключение

1. В опухолевых клетках асцитной опухоли яичников в логарифмическую фазу роста усиливаются перекисное окисление липидов и окислительная модификация белков.

2. В терминальную фазу роста асцитной опухоли яичников в опухоли возрастает активность глутатионового звена антиоксидантной системы.

Список литературы

1. **Пескин, А. В.** Взаимодействие активного кислорода с ДНК / А. В. Пескин // Биохимия. – 1997. – Т. 62, вып. 12. – С. 1571–1578.
2. **Galeotti, T.** Oxy-radical sources, scavenger systems and membrane damage in cancer cells / T. Galeotti, S. Borello, L. Masotti // Oxygen Radicals: Systemic Events and Disease Processes. – Basel : Karger, 1990. – P. 129–148.
3. **Poratcal, O.** Coenzyme Q10 concentrations and antioxidant status in tissues of breast cancer patients / O. Poratcal, O. Ozakaya, M. E. Inal et al. // Clin. Biochem. – 2000. – V. 33, № 4. – P. 284–297.
4. **Франциянц, Е. М.** Перекисное окисление липидов в патогенезе опухолевой болезни : автореф. дис. ... д-ра биол. наук / Франциянц Е. М. – Ростов н/Д, 1997. – 48 с.
5. **Дейчман, Г. И.** Естественный отбор и ранние изменения фенотипа опухолевых клеток *in vivo*: приобретение новых механизмов защиты / Г. И. Дейчман // Биохимия. – 2000. – Т. 65, вып. 1. – С. 92–111.
6. **Дубинина, Е. Е.** Окислительная модификация белков / Е. Е. Дубинина, И. В. Шугалей // Успехи современной биологии. – 1993. – Т. 11, вып. 1. – С. 71–81.
7. **Grimsrud, P. A.** Oxidative stress and covalent modification of protein with bioactive aldehydes / P. A. Grimsrud, H. Xie, T. J. Griffin // J. Biol. Chem. – 2008. – V. 283 (32). – P. 21837–21841.
8. **Андреева, Л. И.** Модификация метода определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой / Л. И. Андреева, Л. А. Кожемякин, А. А. Кишкун // Лаб. дело. – 1988. – № 11. – С. 41–43.
9. **Дубинина, Е. Е.** Окислительная модификация белков плазмы крови больных психическими расстройствами (депрессия, деперсонализация) / Е. Е. Дубинина, М. Г. Морозова, Н. В. Леонова и др. // Вопросы медицинской химии. – 2010. – № 4. – С. 389–409.
10. **Дубинина, Е. Е.** Биологическая роль супероксидного анион-радикала и супероксиддисмутазы в тканях организма / Е. Е. Дубинина // Успехи современной биологии. – 1989. – Т. 108, вып. 1 (4). – С. 3–18.
11. **Nishikimi, M.** The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenacine methosulfate and molecular oxygen / M. Nishikimi, N. Appa, K. Yagi // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1972. – V. 46. – P. 849–854.
12. **Карпищенко, А. И.** Медицинские лабораторные технологии и диагностика : справочник : в 2 т. / А. И. Карпищенко. – СПб. : Интермедика, 1999. – С. 27–28.
13. **Habig, W. H.** Glutathione S-transferase A. A novel kinetic mechanism in which the major reaction pathway depends on substrate concentration / W. H. Habig, M. J. Pabst, W. B. Jakoby // J. Biol. Chem. – 1974. – V. 249 (22). – P. 7140–7147.
14. **Beutler, E.** Red cell metabolism a manual of biochemical methods / E. Beutler. – Grune & Stration, Orlando, 1990. – P. 131–134.
15. **Bradford, M. M.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M. M. Bradford // Anal Biochem. – 1976. – V. 72. – P. 248–254.

16. **Stadtman, E. R.** Protein oxidation / E. R. Stadtman, R. L. Levine // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2000. – V. 899. – P. 191–208.
17. **Dalle-Donne, I.** Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression / I. Dalle-Donne, G. Aldini, M. Carini et al. // *Cell Mol. Med.* – 2006. – V. 10 (2). – P. 389–406.
18. **Жаворонок, Т. В.** Участие тиосульфидной системы в регуляции окислительной модификации белков в нейтрофилах при окислительном стрессе / Т. В. Жаворонок, Е. А. Степовая, Г. В. Петина // *Фундаментальные исследования.* – 2007. – № 12. – С. 383.
19. **Gastegna, A.** Proteomic identification of oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease brain. Part I: creatine kinase BB, glutamine synthase, and ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L-1 / A. Gastegna, M. Aksenov, M. Aksenova, V. Thongbookerd // *Free Radic. Biol. Med.* – 2002. – V. 33. – P. 562–571.
20. **Walters, D. M.** Oxidative stress and antioxidants in the pathogenesis of pulmonary fibrosis: a potential role for Nrf2 / D. M. Walters, H. Y. Cho, S. R. Kleeberger // *Antioxidants & redox signaling.* – 2008. – V. 10 (2). – P. 321–332.
21. **Белоногов, Р. Н.** Окислительная модификация белков и липидов крови больных раком легкого / Р. Н. Белоногов, Н. М. Титова, Ю. А. Дыхно // *Сибирский онкологический журнал.* – 2009. – № 4 (34). – С. 48–53.
22. **Shringarpure, R.** Ubiquitin conjugation is not required for the degradation of oxidized proteins by proteasome / R. Shringarpure, T. Grune, J. Mehlhase, K. J. Davies // *J. Biol. Chem.* – 2003. – V. 278. – P. 311–318.
23. **Shringarpure, R.** Protein turnover by the proteasome in aging and disease / R. Shringarpure, K. J. Davies // *Free Radic. Biol. Med.* – 2002. – V. 32. – P. 1084–1089.
24. **Nystrom, T.** Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence / T. Nystrom // *The EMBO Journal.* – 2005. – V. 24. – P. 1311–1317.
25. **Du, J.** Proteins are major initial cell targets of hydroxyl free radicals / J. Du, J. M. Gebicki // *Intern. J. Biochem. Cell. Biol.* – 2004. – V. 36. – P. 2334–2343.

Генинг Татьяна Петровна

доктор биологических наук, профессор, заведующая кафедрой физиологии и патофизиологии, начальник лаборатории молекулярной и клеточной биологии, Научно-исследовательский технологический институт, Ульяновский государственный университет

E-mail: Naum-53@yandex.ru

Gening Tatyana Petrovna

Doctor of biological sciences, professor, head of sub-department of physiology and pathophysiology, head of laboratory of molecular and cellular biology, Research Technological Institute, Ulyanovsk State University

Абакумова Татьяна Владимировна

кандидат биологических наук, старший преподаватель, кафедра физиологии и патофизиологии, старший научный сотрудник, лаборатория молекулярной и клеточной биологии, Научно-исследовательский технологический институт, Ульяновский государственный университет

E-mail: taty-abakumova@yandex.ru

Abakumova Tatyana Vladimirovna

Candidate of biological sciences, senior lecturer, sub-department of physiology and pathophysiology, senior staff scientist, laboratory of molecular and cellular biology, Research Technological Institute, Ulyanovsk State University

Арсланова Динара Ришатовна

кандидат биологических наук, старший преподаватель, кафедра физиологии и патофизиологии, старший научный сотрудник, лаборатория молекулярной и клеточной биологии, Научно-исследовательский технологический институт, Ульяновский государственный университет

E-mail: monika_rainbow@mail.ru

Arslanova Dinara Rishatovna

Candidate of biological sciences, senior lecturer, sub-department of physiology and pathophysiology, senior staff scientist, laboratory of molecular and cellular biology, Research Technological Institute, Ulyanovsk State University

Антонеева Инна Ивановна

доктор медицинских наук, профессор, кафедра онкологии и лучевой диагностики, ведущий научный сотрудник, лаборатория молекулярной и клеточной биологии, Научно-исследовательский технологический институт, Ульяновский государственный университет

E-mail: aii72@mail.ru

Antoneeva Inna Ivanovna

Doctor of medical sciences, professor, sub-department of oncology and radiology, research manager, laboratory of molecular and cellular biology, Research Technological Institute, Ulyanovsk State University

Сидоренко Екатерина Геннадьевна

ассистент, кафедра онкологии и лучевой диагностики, Ульяновский государственный университет

E-mail: nikolaenkova73@mail.ru

Sidorenko Ekaterina Gennadyevna

Assistant, sub-department of oncology and radiology, Ulyanovsk State University

Генинг Снежанна Олеговна

студентка, Ульяновский государственный университет

E-mail: Digitally_bright@bk.ru

Gening Snezhanna Olegovna

Student, Ulyanovsk State University

УДК 616-066.6:577

Окислительно-восстановительный потенциал неоплазмы и асцитической жидкости в динамике экспериментального канцерогенеза / Т. П. Генинг, Т. В. Абакумова, Д. Р. Арсланова, И. И. Антонеева, Е. Г. Сидоренко, С. О. Генинг // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. – 2012. – № 3 (23). – С. 3–9.