

# ФУНДАМЕНТАЛЬНАЯ БИОЛОГИЯ И МЕДИЦИНА

УДК 612.015.33:612.014462:618.11-006.6

## ОКИСЛИТЕЛЬНАЯ МОДИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ В ЭРИТРОЦИТАХ И ПЛАЗМЕ КРОВИ В ДИНАМИКЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО РАКА ЯИЧНИКОВ\*

А.Ю. Тузеева, Т.П. Генинг, Д.Р. Долгова

ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный университет»

Исследования проведены на белых крысах с перевиваемой асцитной опухолью яичников в стационарную (n=22) и терминальную (n=22) фазы роста опухоли. Асцитная опухоль яичников перевивалась внутрибрюшинно ( $7 \cdot 10^7$  клеток на крысу). В эритроцитах и в плазме крови в динамике экспериментального рака яичников оценили показатели окислительной модификации белков. Установлено повышенное образование карбонильных производных белков нейтрального и основного характера, что позволяет судить о накоплении продуктов окислительной деградации белковых молекул и свидетельствует о возникновении карбонильного стресса. Таким образом, одним из проявлений окислительного повреждения белков является повышение уровня карбонильных производных белков.

**Ключевые слова:** рак яичников, окислительная модификация белков.

**Введение.** Рак яичников (РЯ) относят к агрессивным опухолям человека, склонным к рецидивированию и, как следствие, имеющим низкие показатели выживаемости больных [6, 8].

Сложность проведения экспериментов на человеке делает актуальными вопросы моделирования злокачественных опухолей на экспериментальных животных. В случае РЯ используется модель перевиваемой асцитной опухоли.

Возникновение и развитие патологических процессов в организме сопровождается избыточным образованием активных форм кислорода (АФК) в организме, приводящих к усилению процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и окислительной модификации белков (ОМБ) [2, 13].

В отличие от продуктов перекисной окисления липидов, карбонильные производные белков

эритроцитов гораздо более стабильны, способны улавливать от 50 до 75 % свободных радикалов и могут являться маркерами окислительного повреждения в тканях [2, 14]. Экспериментальные исследования показывают, что в первую очередь окислительной деградации подвергаются молекулы белков мембран. При окислении белков в них образуются альдегидные и кетонные группы аминокислотных остатков (карбонильные группы) [1, 4, 9, 11].

**Цель исследования.** Оценка карбонильных групп белков в эритроцитах и в плазме крови в динамике экспериментального рака яичников.

**Материалы и методы.** Экспериментальные исследования проведены на белых беспородных крысах массой 180–200 г с перевиваемой асцитной опухолью (штамм опухоли яичников (ОЯ) был получен из банка штаммов РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН). После предварительного пассажа на 8-й день после внутрибрюшинной перевивки от одной

\* Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России.

крысы был взят асцит и перевит животным экспериментальной группы ( $7 \cdot 10^7$  опухолевых клеток в каждой дозе). Прогрессирование данного типа опухоли проходит в 3 фазы: логарифмическая (с 4-х сут после перевивки), стационарная (с 8-х сут после перевивки), терминальная (с 13-х сут после перевивки). Материалом для исследований послужили эритроциты и плазма крови животных в стационарную ( $n=22$ ) и терминальную ( $n=22$ ) фазы роста опухоли. Контрольную группу составили здоровые самки ( $n=24$ ). Оценивали уровень ОМБ по методу Е.Е. Дубининой [2]. Результаты учитывали на спектрофотометре Genesys (Thermo Scientific, USA). При  $\lambda=346$  нм оценивали альдегидные группы нейтрального характера; при  $\lambda=370$  нм – кетонные группы нейтрального характера; при  $\lambda=430$  нм – альдегидные группы основного характера и при  $\lambda=530$  нм – кетонные группы основного характера. Данные в гемолизате эритроцитов пересчитывали на грамм гемоглобина (Hb), определенный стандартным гемиглобинцианидным методом (набор «АГАТ», г. Москва), в плазме крови – на 1 мг белка по методу Брэдфорда [7]. Статистиче-

ская обработка материала осуществлялась с помощью программ Microsoft Excel 2010. Достоверность различий средних показателей вычисляли с использованием критерия Стьюдента. Статистические гипотезы считали подтвержденными при уровне значимости  $p < 0,05$ .

**Результаты и обсуждение.** ОМБ играет важную роль в обмене белков в организме. Накопление окисленных белков рассматривается как один из факторов регуляции синтеза и распада белков, активации мультимолулярных протеаз, избирательно разрушающих окисленные белки [10, 12]. Карбонильные производные белков плазмы и эритроцитов более стабильны и специфичны, что позволяет использовать их в качестве маркеров окислительного стресса при патологических процессах [2].

Полученные нами данные свидетельствуют о выраженном повышении уровня карбонильных производных нейтрального и основного характера в эритроцитах (рис. 1) и в плазме крови (рис. 2) как в стационарную фазу роста асцитной опухоли яичников (АОЯ), так и в терминальную.

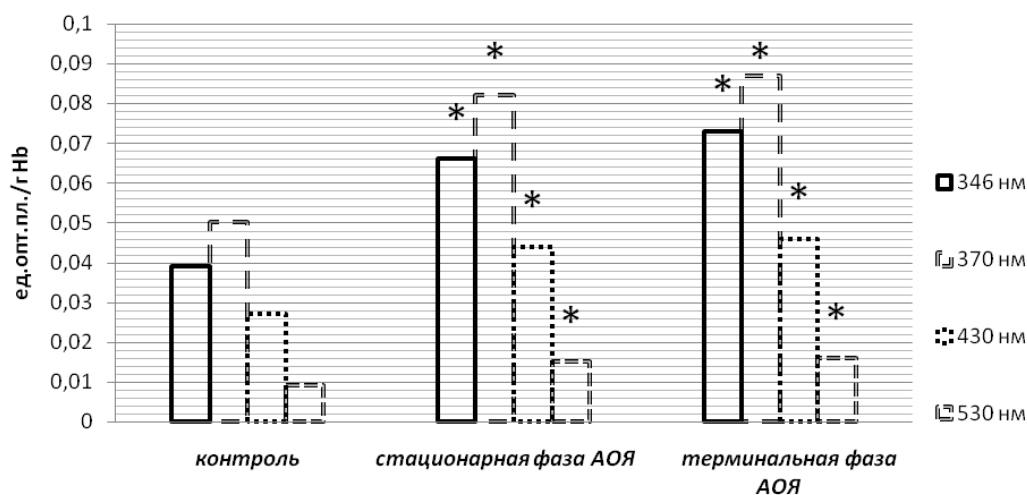


Рис. 1. Содержание продуктов ОМБ в эритроцитах в динамике экспериментального рака яичников (\*  $p \leq 0,05$  – данные, статистически значимо отличающиеся от контроля)

Из данных, представленных на рис. 1, следует, что содержание альдегидных групп нейтрального характера в гемолизате эритроцитов ( $\lambda=346$  нм) статистически значимо увеличивается относительно контроля и составляет в стационарную фазу роста опухоли

$0,066 \pm 0,004$  ед. опт. пл./г Hb; в терминальную –  $0,073 \pm 0,006$  ед. опт. пл./г Hb (в контроле –  $0,039 \pm 0,003$  ед. опт. пл./г Hb ( $p_1=0,002$ ,  $p_2=0,009$ )). Такая же динамика сохраняется и для кетонных групп нейтрального характера ( $\lambda=370$  нм): в стационарную фазу роста

АОЯ уровень этих продуктов составил  $0,082 \pm 0,005$  ед. опт. пл./г Hb; в терминальную –  $0,087 \pm 0,006$  ед. опт. пл./г Hb против  $0,050 \pm 0,003$  ед. опт. пл./г Hb в контроле ( $p_1=0,001$ ,  $p_2=0,009$ ). При этом содержание продуктов ОМБ при  $\lambda=430$  нм и  $\lambda=530$  нм также было достоверно выше контрольных значений: при  $\lambda=430$  нм в стационарную фазу –  $0,044 \pm 0,003$  ед. опт. пл./г Hb; в терминальную фазу –  $0,046 \pm 0,005$  ед. опт. пл./г Hb против  $0,027 \pm 0,003$  ед. опт. пл./г Hb в кон-

троле ( $p_1=0,001$ ,  $p_2=0,003$ ). При  $\lambda=530$  нм в стационарную и терминальную фазы уровень ОМБ составил  $0,015 \pm 0,001$  и  $0,016 \pm 0,002$  ед. опт. пл./г Hb соответственно против  $0,009 \pm 0,001$  ед. опт. пл./г Hb в контроле ( $p_1=0,001$ ,  $p_2=0,001$ ).

Таким образом, интенсивность ОМБ в динамике роста АОЯ в эритроцитах возрастает, что снижает дыхательную функцию крови, приводит к гипоксическим изменениям и усугубляет течение опухолевого процесса.

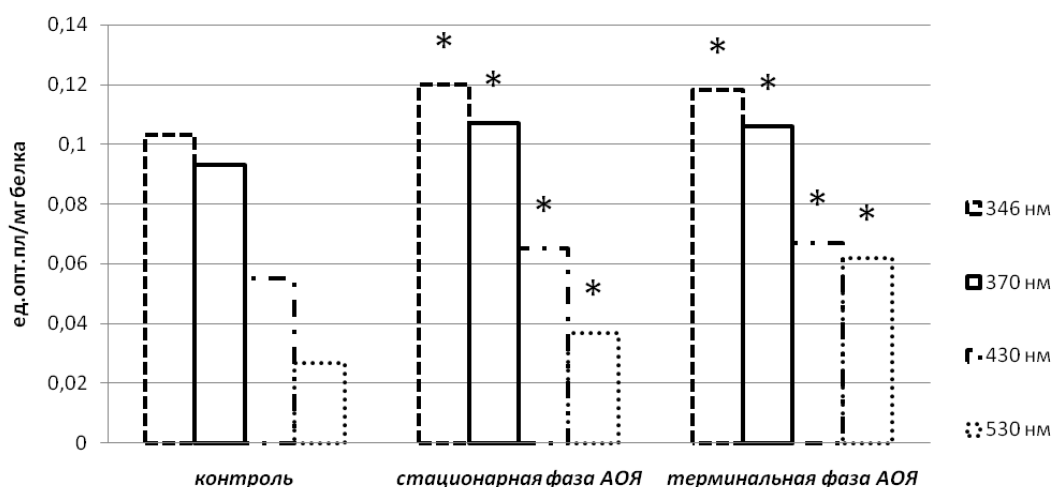


Рис. 2. Содержание продуктов ОМБ в плазме крови в динамике экспериментального РЯ (\*  $p \leq 0,05$  – данные, статистически значимо отличающиеся от контроля)

Проведенный нами сравнительный анализ окисления белков в плазме крови (рис. 2) для альдегидных групп показал, что при  $\lambda=346$  нм в стационарную и терминальную фазы отмечается статистически значимое увеличение продуктов относительно контроля:  $0,120 \pm 0,016$  и  $0,118 \pm 0,015$  ед. опт. пл./мг белка соответственно против  $0,103 \pm 0,006$  ед. опт. пл./мг белка в контроле ( $p_1=0,03$ ,  $p_2=0,02$ ). Уровень кетонных групп нейтрального характера ( $\lambda=370$  нм) в стационарную фазу роста АОЯ составил  $0,107 \pm 0,014$  ед. опт. пл./мг белка; в терминальную –  $0,106 \pm 0,010$  ед. опт. пл./мг белка; в контроле –  $0,093 \pm 0,005$  ед. опт. пл./мг белка ( $p_1=0,01$ ,  $p_2=0,01$ ). Установлено, что уровень карбонильных производных при  $\lambda=430$  нм и  $\lambda=530$  нм в стационарную и терминальную фазы также был достоверно выше контрольных значений:  $0,065 \pm 0,007$  и  $0,067 \pm 0,001$  ед. опт. пл./мг белка соответ-

ственно против  $0,093 \pm 0,005$  ед. опт. пл./мг белка в контроле ( $p_1=0,007$ ,  $p_2=0,01$ ). При  $\lambda=530$  нм:  $0,037 \pm 0,004$  и  $0,062 \pm 0,006$  ед. опт. пл./мг белка соответственно против  $0,027 \pm 0,002$  ед. опт. пл./мг белка в контроле ( $p_1=0,002$ ,  $p_2=0,005$ ). Из данных рис. 2. следует, что содержание продуктов карбонильных производных белков в плазме крови у животных с РЯ возрастает по мере прогрессирования опухоли.

Таким образом, в динамике роста асцитной опухоли яичников в эритроцитах и в плазме крови отмечается повышенное образование карбонильных производных белков нейтрального и основного характера.

**Заключение.** При развитии экспериментального РЯ в плазме крови и эритроцитах возрастает количество продуктов ОМБ, что позволяет предполагать развитие карбонильного стресса.

1. Булгакова Е. Б. Перекисное окисление липидов мембран и природные антиоксиданты / Е. Б. Булгакова // Успехи химии. – 2006. – № 9. – С. 105–110.
2. Дубинина Е. Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток / Е. Е. Дубинина. – СПб. : Медицинская пресса, 2006. – 400 с.
3. Изменение содержания продуктов окислительной модификации белков и липидов в опухолевой ткани на разных стадиях рака легкого / Р. Н. Белоногов [и др.] // Бюл. экспериментальной биологии и медицины. – 2009. – Т. 147, № 5. – С. 562–564.
4. Имянитов Е. Н. Молекулярная патология рака легкого: клинические аспекты / Е. Н. Имянитов // Практическая онкология. – 2006. – Т. 7, № 3. – С. 131–136.
5. Применение наночастиц железа в таргетной химиотерапии экспериментальных опухолей / И. А. Горошинская [и др.] // Онкохирургия. – 2013. – № 1. – С. 84.
6. Урманчеева А. Ф. Лекарственная терапия рецидивирующего рака яичника (обзор литературы) / А. Ф. Урманчеева // Сибирский онкологический журн. – 2010. – № 3 (39). – С. 28–33.
7. 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. – Vol. 72. – P. 248–254.

8. Cancer statistics, 2001 / R. T. Greenlee [et al.] // CA Cancer J. Clin. – 2001. – Vol. 1. – P. 15–36.

9. Dean R. T. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation / R. T. Dean, F. Stocker, M. Davies // Biochem. J. – 1997. – Vol. 324. – P. 1–18.

10. Gieche J. Oxidation and proinflammation in RAW264.7 macrophages: effects of PMA activation / J. Gieche, J. Mehlhase, A. Liclu // Biochim. Biophys. Acta. – 2001. – Vol. 1538, № 2–3. – P. 321–328.

11. Giulivi C. Tyrosine oxidation products: analysis and biological relevance / C. Giulivi, N. J. Trasseth, K. J. A. Davies // Amino acids. – 2003. – Vol. 25. – P. 227–232.

12. Grune T. Degradation of oxidized proteins in mammalian cells / T. Grune, T. Reinheckel, K. Davies // FASEB J. – 1997. – Vol. 11, № 7. – P. 526–534.

13. Kinnula V. L. Superoxide dismutases in malignant cells and human tumors / V. L. Kinnula, J. D. Crapo // Free Radic. Biol. Med. – 2004. – Vol. 36, № 6. – P. 718–744.

14. Stadtman E. R. Protein oxidation / E. R. Stadtman, R. L. Levine // Annals of N.Y. Academy of Sciences. – 2000. – Vol. 899. – P. 191–208.

## OXIDATIVE MODIFICATION OF PROTEINS IN THE ERYTHROCYTES AND PLASMA IN THE DYNAMICS OF EXPERIMENTAL OVARIAN CANCER

A.Yu. Tuzeeva, T.P. Gening, D.R. Dolgova

*Ulyanovsk State University*

Studies have been conducted on white rats with transplanted ascitic tumor in the ovarian stationary (n=22) and in the terminal phase of tumor growth (n=22). Ovarian ascites tumor transplanted intraperitoneally in an amount  $7 \cdot 10^7$  cells per rat. In red blood cells and plasma dynamics in experimental ovarian cancer evaluated indicators of oxidative modification of proteins. Found an increase in the formation of protein carbonyl derivatives of neutral and basic character, which gives an indication of the accumulation of oxidative degradation of protein molecules, which may be indicative of the occurrence of carbonyl stress. Thus, one of the manifestations of OMP is the increase of the carbonyl derivative proteins

**Keywords:** ovarian cancer, oxidative modification of proteins.