

УДК 612.015.348:616-018.7

*Л.М. Обухова, Е.И. Ерлыкина, Т.В. Копытова***БЕЛКИ ПЛАЗМЫ КРОВИ И СВОБОДНОРАДИКАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ПРИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЯХ ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ ТКАНЕЙ**

Целью исследования стал анализ взаимосвязи изменений белкового спектра крови и активности свободно радикальных процессов с наличием и стадией развития при злокачественных новообразованиях эпителиальных тканей. Были изучены образцы плазмы крови 39 пациентов с опухолями эпителиальных тканей, ранее не подвергавшихся противоопухолевому лечению. Контролем служила плазма крови 14 практически здоровых людей. Свободно радикальную активность оценивали методом индуцированной биохемилюминесценции. Содержание общего белка и белковых фракций плазмы крови оценивали на анализаторе. Определение окислительной модификации белков проводилось по уровню карбонильных производных. Общее содержание белка в плазме крови при онкологических заболеваниях значимо не отличалось от такового у практически здоровых людей, однако у больных злокачественными новообразованиями эпителиальных тканей по сравнению с контрольной группой достоверно снижен уровень альбуминов и β -глобулинов и повышен уровень α 1-глобулинов и γ -глобулинов. Свободно радикальная активность плазмы крови значимо возрастала при всех стадиях канцерогенеза. Показано увеличение степени окислительной модификации белков плазмы крови: на начальных стадиях как за счет альдегидных, так и кетонных карбонильных производных, при III-IV – за счет алифатических кетон-динитрофенилгидразонов, являющихся маркерами агрегации белков. Параметры окислительной модификации белков плазмы крови могут быть использованы для дооперационной диагностики стадии злокачественных новообразований эпителиальных тканей.

Ключевые слова: опухоли эпителиальных тканей, свободно радикальная активность, окислительная модификация белков, белки плазмы крови.

Характерной особенностью течения злокачественных опухолей является отсутствие симптоматики в начальном периоде заболевания. Эффективность лечения онкологических заболеваний существенно возрастает при их выявлении на ранней стадии заболевания. При выявлении рака на первой стадии излечиваются примерно 90 % пациентов, на второй – около 75 %, на третьей стадии – 75 %, на четвертой – менее 10 %. Поэтому актуальными проблемами современной онкологии являются выявления пациентов на ранних стадиях заболевания.

Концентрация активных форм кислорода является одним из патогенетических факторов канцерогенеза. Белки одними из первых подвергаются действию активных форм кислорода, в связи с чем окислительная модификация белков служит одним из ранних и наиболее надежных маркеров окислительного стресса [1].

Цель исследования – анализ взаимосвязи изменений белкового спектра крови и активности свободно радикальных процессов с наличием и стадией развития при злокачественных новообразованиях эпителиальных тканей.

Материалы и методы исследований

Объектом исследования служила плазма крови 39 больных: 17 мужчин (47–74 лет) и 22 женщины (34–67 лет) с раком почки, мочевого пузыря, простаты, яичников, гортани, кишечника, матки, поджелудочной железы, желчного пузыря. Анализ распределения больных по стадиям и диагнозам показал, что I стадию имели 19 % пациентов, II – 19 %, III – 42 %, IV – 20 %; рак почки диагностирован у 8 человек (27 %), рак кишечника – 14 (37 %), рак мочевого пузыря, рак матки и рак простаты – 3 (по 6 %), рак яичников и рак гортани – 2 (по 5 %), рак поджелудочной и рак желчного пузыря – 1 (по 4 %). Контролем служила плазма крови 14 практически здоровых людей: 6 мужчин (24–74 лет) и 8 женщин (25–65 лет).

Свободно радикальную активность (CРА) оценивали методом индуцированной биохемилюминесценции [2] на биохемилюминетре БХЛ-07. Содержание общего белка и белковых фракций плазмы крови оценивали на анализаторе «КонеЛаб 20/20i» (Финляндия). Определение окислительной модификации белков (ОМБ) проводилось по уровню карбонильных производных, выявляемых в реакции с 2,4-динитрофенилгидразином (ДНФГ) [3]. Пул ДНФГ-производных включает альдегидные и кетонные производные.

230 нм – алифатические альдегид-динитрофенилгидразоны нейтрального характера;
 270 нм – алифатические альдегид-динитрофенилгидразоны основного характера;
 370 нм – алифатические кетон-динитрофенилгидразоны основного характера;
 430 нм – алифатические альдегид-динитрофенилгидразоны основного характера;
 530 нм – алифатические кетон-динитрофенилгидразоны основного характера [4].

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью пакета программ BIOSTAT.

Результаты и их обсуждение

Свободнорадикальная активность плазмы крови значимо возрастала при всех стадиях канцерогенеза – на 208 %, 233 %, 314 % и 270 % соответственно. Развитие бластоматозного процесса сопровождается повышением уровня супероксидного анион-радикала и других активных форм кислорода (АФК), развитием в организме состояния окислительного стресса [5]. Существует гипотеза, предполагающая участие активных форм кислорода, в частности, супероксидного радикала и пероксида водорода, в регуляции пролиферации клеток [6]. При III и IV стадиях наблюдался более высокий статистически значимый рост свободно радикальной активности, выше, чем при I, II стадиях, что, вероятно, связано с наличием отдаленных метастазов; установлено наличие достоверной взаимосвязи этих двух параметров ($r = 0,456$). Известно, что в процессах метастазирования значительная роль принадлежит матриксным металлопротеиназам – семейству внеклеточных цинк-зависимых эндопептидаз, способных разрушать все типы белков внеклеточного матрикса [7]. Регуляция активности этих ферментов осуществляется, в том числе, и активными формами кислорода [8]. Таким образом, показанное увеличение свободно радикальной активности плазмы крови, начиная с первой стадии злокачественных новообразований эпителиальных тканей и возрастающее при последующих стадиях, может быть обусловлено выявленной активацией данного процесса при метастазировании.

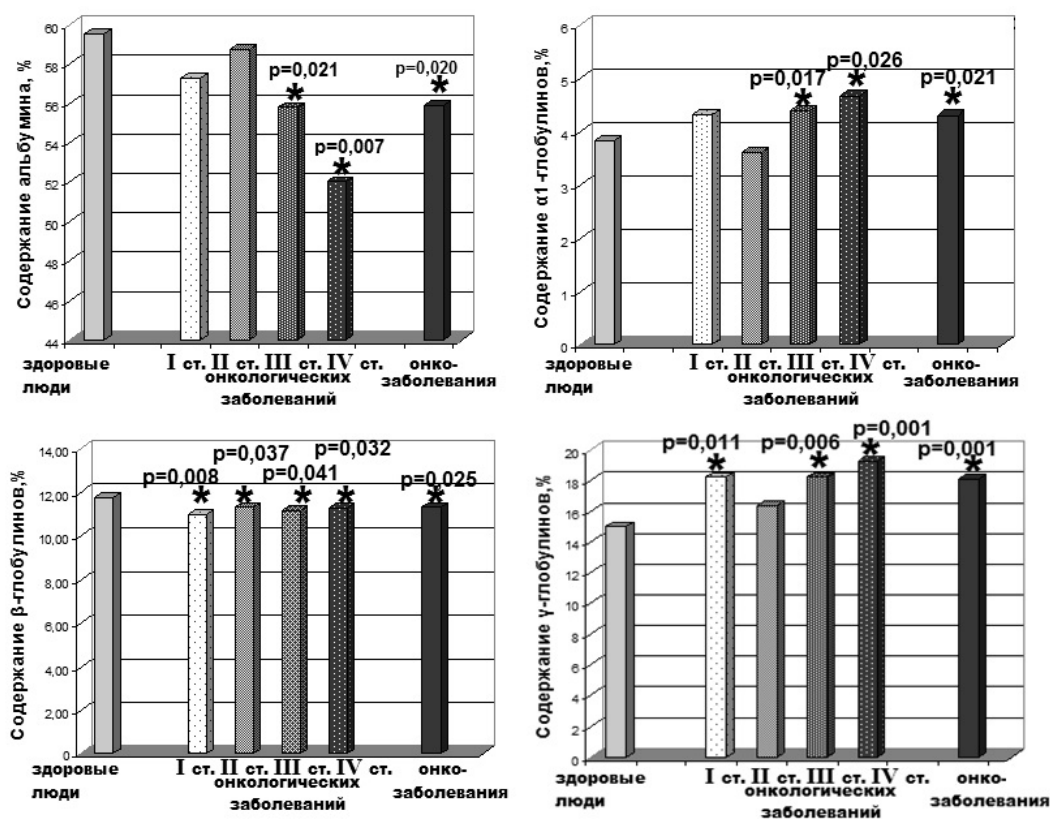


Рис. 1. Изменение уровня белковых фракций плазмы крови при онкологических заболеваниях

* – различия с показателями здоровых людей статистически значимы ($p < 0,05$)

Основными субстратами, на которые воздействуют АФК, являются белки. Общее содержание белка в плазме крови значимо не отличалось у практически здоровых людей ($71,06 \pm 0,47$ г/л) от тако-

вого при различных стадиях новообразований: I – $70,67 \pm 1,38$ г/л; II – $72,33 \pm 2,21$ г/л; III – $72,83 \pm 1,07$; IV – $69,38 \pm 2,21$. Показано, что у больных злокачественными новообразованиями эпителиальных тканей по сравнению с контрольной группой (практически здоровыми людьми) достоверно снижен уровень альбуминов ($p=0,020$) и β -глобулинов ($p=0,025$) и повышен уровень α_1 -глобулинов ($p=0,021$) и γ -глобулинов ($p=0,001$) (рис. 1). При проведении сравнения групп больных с разной локализацией опухолей эпителиальных тканей по дисперсии значений статистически значимых отличий выявлено не было ($p>0,05$), что позволяет предположить, что подобные изменения белкового спектра крови при онкогенезе обусловлены неспецифической реакцией организма на развивающуюся опухоль.

Взаимодействуя с белками плазмы крови, продукты свободнорадикального окисления вызывают их модификацию. В ходе этого воздействия происходят изменения в структуре белковых молекул, приводящие к нарушению их физико-химических, биологических и конформационных свойств [4]. В качестве конечных продуктов окисления выступают карбонильные фрагменты полипептидной цепи, определяемые в виде 2,4-динитрофенилгидразонов [9]. При злокачественных опухолях эпителиальных тканей наблюдалась значительная активация суммарной ОМБ, о чем свидетельствует увеличение содержания карбонильных производных белков в плазме, начиная с I стадии заболевания (на 71 %, 146 %, 259 % и 82 % соответственно). Окисление белков является надежным и ранним маркером окислительных повреждений. В условиях окислительного стресса под влиянием АФК происходят изменения в структуре белковых молекул, нарушающие ее физико-химические и биологические свойства. Измененные белковые молекулы легче подвергаются протеолизу с образованием пептидов средней молекулярной массы. ОМБ генерирует новые антигены и провоцирует иммунный ответ [10]. Продукты такой модификации могут служить причиной вторичного повреждения других биомолекул [11]. Появление значительного количества модифицированных белков провоцирует развитие иммунных реакций (активации макрофагов при кислородном взрыве) не только к измененным белкам, но и нормальным молекулам. Функциональная активность белков связана с уникальной структурой локальных участков, например, активных центров ферментов. В состав таких участков входят наиболее реакционно-способные аминокислотные остатки, которые в силу этого модифицируются в первую очередь. Инактивация белков происходит одновременно с их модификацией [12].

Анализ распределения карбонильных производных по различным длинам волн продемонстрировал сходный характер изменений по сравнению с практически здоровыми людьми для I, II и III стадий злокачественных новообразований эпителиальных тканей (рис. 2).

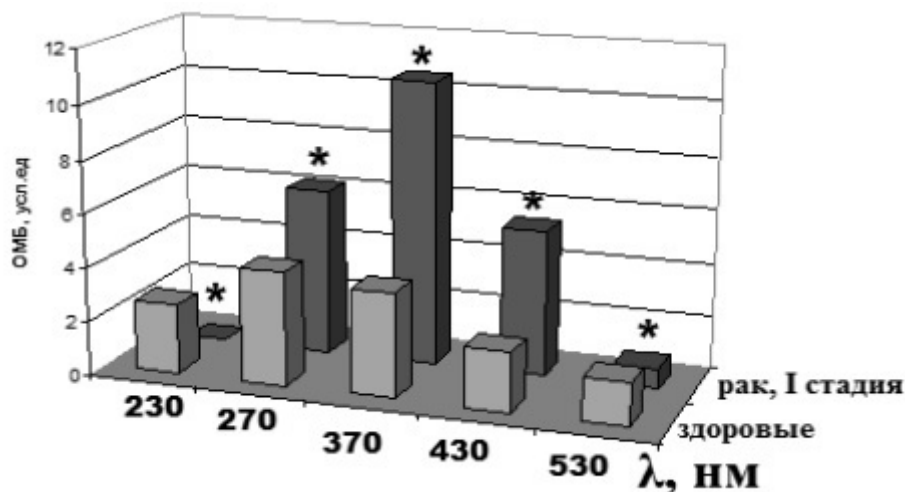


Рис. 2. Спонтанная ОМБ плазмы крови у больных злокачественными новообразованиями эпителиальных тканей (I стадия) по сравнению с практически здоровыми людьми
* – различия с показателями практически здоровых людей достоверны ($p<0,05$)

На ранних стадиях окислительного стресса преобладают альдегидные фенилгидразоны (230 нм – альдегиды нейтрального характера, 270 нм – альдегиды основного характера), на поздних стадиях – кетон-динитрофенилгидразоны основного характера (370 нм) [13]. Под действием АФК могут происходить фрагментация белков, маркерами которой являются альдегидные производные динитрофенилгид-

розонов, и агрегация белков, маркерами которой являются их кетопроизводные [14]. Наблюдается статистически значимое снижение уровня поглощения, регистрируемого на длине волны 230 нм, на которой определяются алифатические АДНФГ нейтрального характера. Эти соединения являются маркерами фрагментации белков. Напротив, содержание карбонильных производных, регистрируемых на длинах волн 270, 370 и 430, статистически значимо возрастало при I, II и III стадиях злокачественных новообразований эпителиальных тканей. Таким образом, на начальных стадиях канцерогенеза происходит накопление как альдегидных, так и кетоновых карбонильных производных, что характеризует осуществление как процессов фрагментации белков, так и их агрегации.

Напротив, на терминальной (IV) стадии злокачественных опухолей эпителиальных тканей статистически значимо увеличивается уровень фенилгидразонов, определяемых на 230, 370 и 530 нм, то есть преобладающими являются алифатические кетондинитрофенилгидразоны (рис. 3).

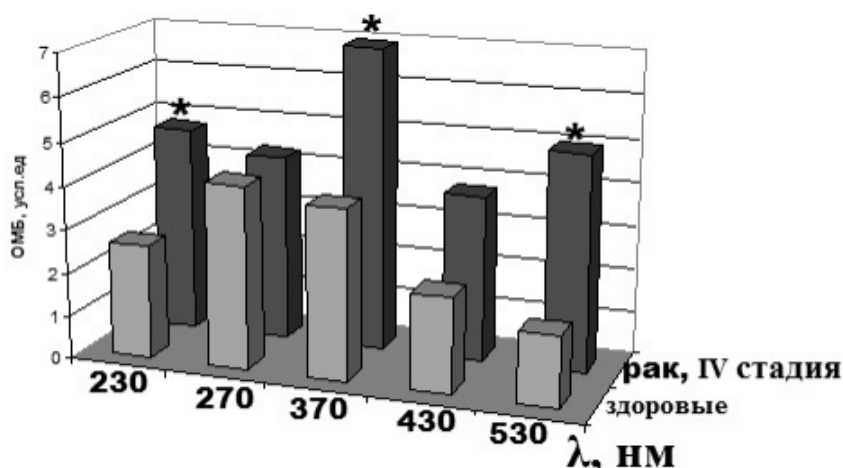


Рис.3. Спонтанная ОМБ плазмы крови у больных злокачественными новообразованиями эпителиальных тканей (IV стадия) по сравнению с практически здоровыми людьми
* – различия с показателями практически здоровых людей достоверны ($p < 0,05$)

Следовательно, повышение суммарного уровня ОМБ, сопровождаемое ростом свободно радикальной активности плазмы крови, на разных стадиях рака осуществляется за счет разных фракций карбонильных производных. На начальных стадиях заболевания это увеличение происходит и за счет альдегидных, и кетоновых ДНФГ, что свидетельствует об осуществлении как процессов фрагментации белков, так и их агрегации. На терминальной стадии рост степени ОМБ осуществляется за счет алифатических кетондинитрофенилгидразонов, являющихся маркерами агрегации белков, что характерно для поздних стадий окислительного стресса.

Заключение

При злокачественных новообразованиях эпителиальных тканей общее содержание белка в плазме крови значимо не отличается от такового у практически здоровых людей, но нарушается соотношение белковых фракций. Показано значимое увеличение свободно радикальной активности и степени окислительной модификации белков плазмы крови, начиная с первой стадии злокачественных новообразований эпителиальных тканей. На начальных стадиях канцерогенеза уровень окислительной модификации белков плазмы крови возрастает как за счет альдегидных, так и кетоновых карбонильных производных, что свидетельствует об осуществлении процессов фрагментации и агрегации белков. При терминальной стадии злокачественных новообразований рост окислительной модификации белков осуществляется за счет алифатических кетондинитрофенилгидразонов, являющихся маркерами агрегации белков, характерной для более поздних стадий окислительного стресса. Параметры окислительной модификации белков плазмы крови могут быть использованы для дооперационной диагностики стадии злокачественных новообразований эпителиальных тканей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Caraceni P., De Maria N., Ryu H.S., Colantoni A., Roberts L., Maidt M.L., Pye Q., Bernardi M., Van Thiel D.H., Floyd R.A. Proteins but not nucleic acids are molecular targets for the three radical attack during reoxygenation of rat hepatocytes // *Free Radic. Biol. Med.* 1997. Vol. 23, N 2. P. 339-344.
2. Кузьмина Е.И., Нелюбин А.С., Щенникова М.К. Применение индуцированной хемилюминесценции для оценки свободно радикальных реакций в биологических субстратах // *Межвузовский сб. биохимии и биофизики микроорганизмов. Горький*, 1983. С. 179-183.
3. Дубинина Е.Е., Бурмистров С.О., Ходов Д.А., Поротов И.Г. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод ее определения // *Вопр. медицинской химии*. 1995. Т. 41, № 1. С. 24-26.
4. Дубинина Е.Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток (жизнь и смерть, созидание и разрушение). Физиологические и клиничко-биохимические аспекты. СПб.: Медицинская пресса, 2006. 440 с.
5. Miki J., Furusato B. Li H., Gu Y., Takahashi H., Egawa S., Sesterhenn I.A., McLeod D.G., Srivastava S., Rhim J.S. Identification of Putative Stem Cell Markers, CD 133, and CXCR 4, in hTERT – Immortalised Primary Nonmalignant and Malignant Tumor Derived Human Prostate Epithelial Cell Lines and in Prostate Cancer Specimens // *Cancer Research*. 2007. Vol. 67, № 7. P. 3153-3161.
6. Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты. М.: Слово, 2006. 553 с.
7. Chakraborti S., Mandal M., Das S., Mandal A., Chakraborti T. Regulation of Matrix Metalloproteinases. Overview // *Mol. Cell Biochem.* 2003. Vol. 253. P. 269-285.
8. Browatzki M., Larsen D., Pfeiffer C.A., Gehrke S.G., Schmidt J., Kranzhofer A., Katus H. Angiotensin II stimulates matrix metalloproteinase secretion in human vascular smooth muscle cells via nuclear factor-kappa B and activator protein-1 in a redox-sensitive manner // *R.J. Vasc. Res.* 2005. Vol. 42, N 5. P. 415-423.
9. Шугалей И.В. Цепной процесс перекисного окисления белков – удобная модель для изучения повреждающей способности активных форм кислорода // *Рус. журнал ВИЧ/СПИД и родственные проблемы*. 2000. Т. 4, № 1. С. 77-78.
10. Lambeth J.D. Nox enzymes, ROS, and chronic disease: an example of antagonistic pleiotropy // *Free Radic. Biol. Med.* 2007. Vol. 43, N 3. P. 332-347.
11. Piroddi M., Depunzio I., Aisa C.M., Galli F., Calabrese V., Mancuso C., Binaglia L., Minelli A., Butterfield A.D. Oxidatively-modified and glycated proteins as candidate pro-inflammatory toxins in uremia and dialysis patients // *Amino Acids*. 2007. Vol. 32, N 4. P. 573-592.
12. Winterbourn C.C., Kettle A.J. Biomarkers of myeloperoxidase – derived hypochlorous acid // *Free Radic. Biol. Med.* 2000. Vol. 29, N 5. P. 403-409.
13. Толочко З.С., Спиридонов В.К. Окислительная модификация белков в крови крыс при повреждении капсаицин-чувствительных нервов и изменении уровня оксида азота // *Российский физиологический журн. им. И.М. Сеченов*. 2010. Т.96, № 1. С. 77-84.
14. Муравлева Л.Е., Молотов-Лучанский В.Б., Ключев Д.А. Окислительная модификация белков: проблемы и перспективы исследования // *Фундамент. исслед.* 2010. № 1. С. 74-78.

Поступила в редакцию 07.07.17

L.M. Obukhova, E.I. Erlykina, T.V. Kopytova

BLOOD PLASMA PROTEINS AND FREE RADICAL ACTIVITY OF NEOPLASM TUMORS OF EPITHELIAL TISSUES

Analysis of relationships between blood proteins content and free radical activity in blood plasma and tumor presence and stage was studied. Blood plasma samples of 39 patients with tumors of epithelial tissues previously non-exposed to anti-tumor treatment and 14 healthy patients without tumor (control sample) have been taken for analysis. Free radical activity was evaluated by induced biochemiluminescence and oxidative modification of proteins was estimated by the level of carbonyl derivatives. The content of blood plasma proteins and their fractions was determined by bioanalyzer. Blood investigation of patients with neoplasms revealed decrease in albumins and β -globulins, while the total plasma protein was not practically changed. Blood analysis in malignant tumors of epithelial tissues showed a significant increase in free radical activity and the degree of plasma proteins oxidative modification. In the initial stages of carcinogenesis processes of both fragmentation and aggregation of proteins predominate (growth of aldehyde and ketone carbonyl derivatives of dinitrophenylhydrazones). Protein aggregation dominates at the fourth stage of carcinogenesis (increase of aliphatic ketone-dinitrophenylhydrazones). Parameters of oxidative modification of blood plasma proteins can be used for preoperative diagnosis of the stage of malignant neoplasms of epithelial tissues.

Keywords: Tumors of epithelial tissues, free radical activity, oxidative modification of proteins, blood plasma proteins.

REFERENCE

1. Caraceni P., De Maria N., Ryu H.S., Colantoni A., Roberts L., Maitt M.L., Pye Q., Bernardi M., Van Thiel D.H. and Floyd R.A. Proteins but not nucleic acids are molecular targets for the three radical attack during reoxygenation of rat hepatocytes, in *Free Radic. Biol. Med.*, 1997, vol. 23, no 2, pp. 339-344.
2. Kuz'mina E.I., Neljubin A.S. and Schennikova M.K. [Use of induced chemiluminescence to assess free radical reactions in biological substrates], in *Mezhvuzovskij sb. biohimii i biofiziki mikroorganizmov*, Gor'kij, 1983, pp. 179-183 (in Russ.).
3. Dubinina E.E., Burmistrov S.O., Hodov D.A. and Porotov I.G. [Oxidative modification of proteins of human serum, the method of its determination], in *Voprosy medicinskoj himii*, 1995, vol. 41, no 1, pp. 24-26 (in Russ.).
4. Dubinina E.E. *Produkty metabolizma kisloroda v funkcional'noj aktivnosti kletok (zhiznj i smertj, sozidanie i razrushenie). Fiziologicheskie i kliniko-biohimicheskie aspekty* [Products of oxygen metabolism in the functional activity of cells (life and death, creation and destruction). Physiological, clinical and biochemical aspects], SPb.: Medicinskaja pressa, 2006, 440 p. (in Russ.).
5. Miki J., Furusato B. Li H., Gu Y., Takahashi H., Egawa S., Sesterhenn I.A., McLeod D.G., Srivastava S. and Rhim J.S. Identification of Putative Stem Cell Markers, CD 133, and CXCR 4, in hTERT – Immortalised Primary Nonmalignant and Malignant Tumor Derived Human Prostate Epithelial Cell Lines and in Prostate Cancer Specimens, in *Cancer Research*, 2007, vol. 67, no. 7, pp. 3153-3161.
6. Men'schikova E.B., Lankin V.Z. and Zenkov N.K. *Okislitel'nyj stress. Prooksidanty i antioksidanty* [Oxidative stress. Pro-oxidants and antioxidants], M.: Slovo, 2006, 553 p. (in Russ.).
7. Chakraborti S., Mandal M., Das S., Mandal A. and Chakraborti T. Regulation of Matrix Metalloproteinases. Overview, in *Mol. Cell Biochem.*, 2003, vol. 253, pp. 269-285.
8. Browatzki M., Larsen D., Pfeiffer C.A., Gehrke S.G., Schmidt J., Kranzhofer A. and Katus H. Angiotensin II stimulates matrix metalloproteinase secretion in human vascular smooth muscle cells via nuclear factor-kappa B and activator protein-1 in a redox-sensitive manner, in *R.J. Vasc. Res.*, 2005, no 5, vol. 42, pp. 415-423.
9. Shugalej I.V. [Chain protein peroxidation process is a convenient model for studying harm-ing the ability of reactive oxygen species], in *Russkij Zhurnal VICH/SPID i rodstvennye problem*, 2000, vol. 4, no 1, pp. 77-78 (in Russ.).
10. Lambeth J.D. Nox enzymes, ROS, and chronic disease: an example of antagonistic pleiotropy, in *Free Radic. Biol. Med.*, 2007, vol.43, no 3, pp. 332-347.
11. Piroddi M., Depunzio I., Aisa C.M., Galli F., Calabrese V., Mancuso C., Binaglia L., Minelli A. and Butterfield A.D. Oxidatively-modified and glycated proteins as candidate pro-inflammatory toxins in uremia and dialysis patients, in *Amino Acids*, 2007, vol. 32, no 4, pp. 573-592.
12. Winterbourn C.C., Kettle A.J. Biomarkers of myeloperoxidase – derived hypochlorous acid, in *Free Radic. Biol. Med.*, 2000, vol. 29, no 5, pp. 403-409.
13. Tolochko Z.S. and Spiridonov V.K. [Oxidative modification of proteins in the blood of rats with damage capsic-CIN-sensitive nerve and change of nitric oxide], in *Rossijskij fiziologicheskij zhurn. im. I.M. Sechenov*, 2010, vol. 96, no 1, pp. 77-84 (in Russ.).
14. Muravleva L.E., Molotov-Luchanskij V.B. and Kljuev D.A. [Oxidative modification of proteins: problems and prospects research], in *Fundament. issled.*, 2010, no 1, pp. 74-78 (in Russ.).

Обухова Лариса Михайловна,
доктор биологических наук, доцент
кафедры биохимии им. Г.Я. Городисской
E-mail: ObuhovaLM@yandex.ru

Ерлыкина Елена Ивановна,
доктор биологических наук, профессор,
заведующая кафедрой биохимии им. Г.Я. Городисской
E-mail: biochem@nizhgma.ru

Копытова Татьяна Викторовна,
доктор биологических наук, доцент
кафедры биохимии им. Г.Я. Городисской
E-mail: biochem@nizhgma.ru

ФГБОУ ВО «Нижегородская государственная
медицинская академия»
603950, Россия, г. Нижний Новгород,
пл. Минина и Пожарского, д. 10/1

Obukhova L.M.,
Doctor of Biology, Associate Professor,
at Department of Biochemistry n.a. G.Ya. Gorodisskaya
E-mail: ObuhovaLM@yandex.ru

Erlykina E.I.,
Doctor of Biology, Professor, Head of the Department
of Biochemistry n.a. G.Ya. Gorodisskaya
E-mail: biochem@nizhgma.ru

Kopytova T.V.,
Doctor of Biology, Associate Professor,
at Department of Biochemistry n.a. G.Ya. Gorodisskaya
E-mail: biochem@nizhgma.ru

Nizhny Novgorod State Medical Academy
10/1 Minin & Pozharsky sq., Nizhny Novgorod,
Russia, 603950