

Л.І. Маковецька
В.В. Сарнацька

Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, Київ, Україна

Ключові слова: окисно-карбонільний стрес, маркери, карцинома Герена, чутливість до цисплатину, альбумін.

БІОМАРКЕРИ ОКИСНО-КАРБОНІЛЬНОГО СТРЕСУ У ЩУРІВ З КАРЦИНОМОЮ ГЕРЕНА В ПРОГРЕСІЇ РОЗВИТКУ ПУХЛИН ЗАЛЕЖНО ВІД ЧУТЛИВОСТІ ДО ЦИСПЛАТИНУ

Мета: дослідити на моделі карциноми Герена зміни маркерів окисно-карбонільного стресу при прогресії новоутворень з різною чутливістю до цисплатину та встановити зв'язок таких маркерів з молекулярно-структурними змінами альбуміну в плазмі крові. **Об'єкт та методи:** робота виконана на щурах лінії Wistar (самки віком 2,5 міс та з масою тіла 180–200 г) із перещепленими чутливим та резистентним до цисплатину штамами карциноми Герена. Біологічний матеріал для аналізу відбирали на 3-тю, 5-ту, 7-му, 9-, 14-, 18-ту та 21-шу доби після імплантації. Визначали прооксидантно-антиоксидантне співвідношення та активність каталази в гемолізаті, вміст малонового діальдегіду в плазмі крові, вміст вільних SH-груп і фруктозаміну в молекулі альбуміну та концентрацію альдегіддинітрофенілгідрозонів в альбумінових фракціях плазми крові. Конформаційні зміни, що відбуваються в молекулі альбуміну плазми крові, оцінювали методами абсорбційної та флуоресцентної спектроскопії. **Результати:** у динаміці росту карциноми Герена з різною чутливістю до цисплатину виявлено збільшення (порівняно з показниками інтактного контролю) про-антиоксидантного співвідношення з двома піками, які пов'язані з початком активного росту пухлин: на 5- і 18-ту (чутливий штаб) та 9-ту і 21-шу (резистентний штаб) доби після перещеплення. Відмічено підвищення інтенсифікації пероксидного окиснення ліпідів у плазмі крові щурів з пухлинами впродовж усього експерименту на тлі поступового зниження каталазної активності в гемолізатах. Максимально високі значення вмісту малонового діальдегіду виявлені у щурів з резистентним до цисплатину штамом з 9-ї по 21-шу доби після перещеплення пухлин. Встановлено зниження вільних сульфгідрильних груп, зростання окисної модифікації, кінцевих продуктів глікооксидації і полімерних поперечно зшитих β -структур амлоїдного типу в альбуміновому пулі плазми крові щурів залежно від стадії розвитку і штаму карциноми Герена. Відмічено суттєві зміни молекулярної конформації альбуміну в плазмі крові у щурів відповідно до зовнішнього мікрооточення, сформованого в плазмі крові. **Висновки:** у щурів з карциномою Герена показана наявність прогресуючого окисно-карбонільного стресу, що може розглядатися в якості пускового механізму розвитку пухлин і набуття неопластичними клітинами високої злоякісності на тлі молекулярно-структурних змін альбуміну в плазмі крові. Показаний зв'язок окисно-карбонільного стресу з молекулярно-структурними змінами альбуміну в плазмі крові. Результати роботи можуть бути використані для покращення диференційної діагностики новоутворень, а досліджені показники — поповнити панель позাপухлинних маркерів розвитку і перебігу пухлинного процесу.

Упродовж останніх десятиліть відзначається чітка тенденція до збільшення частоти розвитку гормонозалежних пухлин, у тому числі раку молочної (РМЗ) та передміхурової залоз (РПЗ), раку ендометрію як в Україні, так і в розвинених країнах світу [1, 2]. РМЗ є доволі агресивним захворюванням,

яке швидко «молодшає» і вражає все більше жінок активного працездатного та репродуктивного віку, що, безумовно, має вплив на демографічну ситуацію. У свою чергу, РПЗ — одне з найбільш поширених злоякісних новоутворень у чоловіків. Згідно з останніми даними статистики, РМЗ та РПЗ за-

ймають провідні позиції за показниками захворюваності та смертності в структурі онкологічних захворювань [3]. За даними Національного канцер-реєстру, РМЗ посідає перше місце за захворюваністю (20,3%), рак ендометрію — третє (9,5%) з-поміж усіх нозологічних форм злоякісних новоутворень у жіночого населення України, РПЗ — друге місце (12,4%) серед злоякісних новоутворень у чоловіків. За показниками смертності РМЗ знаходиться на першому місці (20,1%), РПЗ — на другому (9,7%) [1]. На сьогодні добре відомо, що ці захворювання є гетерогенними як за морфологічною та молекулярною будовою, так і за клінічним перебігом, що вимагає інноваційних підходів до їх діагностики та терапії.

Питання механізмів канцерогенезу та злоякісної трансформації клітин, ранньої діагностики, прогнозування перебігу захворювання залишаються однією з найбільш актуальних проблем сучасної біології і медицини. Швидкий ріст і аномальна проліферація пухлинних клітин часто пов'язані зі значними змінами в енергетичному обміні та порушеним окиснювально-відновним гомеостазом. Будь-який патологічний процес протікає на тлі утворення активних форм кисню (АФК) та інтенсифікації вільнорадикального окиснення біосубстратів з утворенням пероксидів, епоксидів, альдегідів, кетонів, спиртів, діальдегідів та ін. Канцерогенез пов'язується з порушенням регуляції процесів вільнорадикального окиснення [4, 5]. Шкідлива дія вільних радикалів спрямована на три типи мішеней: ліпіди, нуклеїнові кислоти і білки. Впливаючи на останні, АФК можуть порушувати їх структуру та функції, викликаючи окиснення амінокислотних залишків (особливо тих, які містять SH-, SCH₃-групи цистеїну, метіоніну, NH-групи лізину тощо) [6]. Усе це викликає модифікацію білків, у тому числі ферментів, зміну їх активності, руйнування біоантиоксидантів (вітамінів, убіхінону, стероїдних гормонів тощо), зміну фосfolіпідного складу, появу в гідрофобній частині продуктів окиснення, які ініціюють процеси іонного транспорту, зміну конформації білків і ліпідного складу, а отже, структурних та функціональних властивостей мембран. У разі підвищення концентрації АФК збільшуються окисні пошкодження ДНК, накопичуються зміни в геномі, що призводить до збільшення кількості мутацій. Тобто окисний стрес як результат інтенсифікації вільнорадикальних процесів на фоні дисрегуляції систем антиоксидантного захисту відіграє значну роль у канцерогенезі. Сполуки, що є промоторами пухлинного росту, стимулюють утворення АФК. Дослідженню окисного метаболізму при онкологічній патології приділяється значна увага, оскільки його порушення, з одного боку, розглядаються як один з механізмів формування та розвитку онкологічних захворювань. З іншого боку, проведення неад'ювантної терапії та радикальних хірургічних втручань самі по собі можуть бути тригерними факторами. Тривале зрушення прооксидантно-ан-

тиоксидантної рівноваги призводить до порушення структур і функцій ключових ферментів, мембран, органел, тобто до створення умов малігнізації тканин. Дисбаланс між прооксидантами і антиоксидантами викликає реакцію переокиснення, що може призводити до загибелі нормальних і злоякісно змінених клітин. Відмічено підвищення рівня пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ), світлосуми хемілюмінесценції (про-антиоксидантного співвідношення), зниження каталазної активності у крові хворих на рак шлунка [7] та молочної залози [8], зміни окисного метаболізму узгоджуються з несприятливим прогнозом і більшою поширеністю процесу.

Посилення процесів ПОЛ за розвитку окисного стресу призводить до утворення насичених і ненасичених альдегідів, дикарбонілів, серед яких високо-токсична і мутагенна сполука — малоновий діальдегід (МДА) [9, 10]. Альдегіди, зв'язуючись з протеїнами, утворюють стійкі аддукти, які вважаються кінцевими продуктами ПОЛ (КПЛ). У разі їх неензиматичної реакції з SH- та NH₂-групами протеїнів, ліпідів і нуклеїнових кислот [11] запускається процес глікування або низка реакцій Майяра [12]. У результаті цих перетворень утворюються продукти Амадоре — фруктозаміни, які є похідними гексоз [13, 14]. На практиці ці речовини мають важливе діагностичне значення [15]. Продукти Амадоре визначаються як ранні продукти глікації, що характеризуються відносною нестабільністю і швидко вступають у наступні перетворення, зокрема піддаються фрагментації, перегрупуванню та повторній взаємодії з аміногрупами, внаслідок чого утворюються стабільні кінцеві продукти глікації (КПГ) [16, 17]. Прикладом КПГ є пентозидин, що бере участь у формуванні внутрішньомолекулярних та міжмолекулярних перехресних зв'язок [18, 19]. Утворення КПГ і КПЛ під впливом вказаних активних альдегідів супроводжується інтенсивним генеруванням АФК, що призводить до самоприскорювання цього процесу [20]. КПГ і КПЛ прямо або через специфічні рецептори впливають на сигнальну трансдукцію, змінюють структуру і функції протеїнів (як рецепторних, так і позаклітинного матриксу), ензимів метаболічних перетворень та антиоксидантного захисту; викликають запалення й апоптоз; відіграють провідну роль у патогенезі низки хронічних захворювань, у тому числі онкологічних [21–23]. Безпосередні токсичні ефекти КПГ зумовлені зміною структури та функції протеїнів плазми крові (зокрема альбуміну) та позаклітинного матриксу шляхом глікування та зшивання. Глікування протеїнів порушує їх молекулярну конформацію, втручається в рецепторну і транспортну функції, механізм передачі сигналів та змінює активність ензимів. КПГ зшиваються не тільки з протеїнами, але й з іншими внутрішньоклітинними та позаклітинними молекулами, такими як ліпіди та нуклеїнові кислоти, що призводить до структурних та функціональних порушень [24].

Таким чином, внаслідок ПОЛ і неферментативного глікування протеїнів відбувається гіперпродукування альдегідів, що індукує розвиток карбонільного стресу, який супроводжується накопиченням активних карбонільних сполук. Це призводить до порушення метаболізму клітини і ушкодження її компонентів [25]. Обидва типи стресів (окисний та карбонільний) пов'язані між собою і підсилюють один одного, формуючи так зване хибне коло порушень метаболізму, коли АФК і активні карбонільні сполуки можуть ініціювати глікооксидацию та ПОЛ, а також бути проміжними продуктами цих процесів. Тому було запропоновано термін «окисно-карбонільний стрес» [26, 27].

Розвиток окисно-карбонільного стресу призводить до значних метаболічних та морфологічних змін, що викликають структурно-функціональні порушення, зокрема і в молекулах альбуміну плазми крові як важливого компонента, функціями якого є регуляція онкотичного тиску, контроль рН, антиоксидантна дія, зв'язування і транспорт ряду низькомолекулярних малорозчинних агентів (білірубін, жирні кислоти, холестерин), у тому числі пухлинних медіаторів, фармакологічних препаратів.

Метою роботи було дослідити на моделі карциноми Герена зміни маркерів окисно-карбонільного стресу в процесі росту пухлин з різною чутливістю до цисплатину та встановити зв'язок таких маркерів з молекулярно-структурними змінами альбуміну в плазмі крові.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження проводили на щурах лінії Wistar (самки віком 2,5 міс з масою 180–200 г) розведення віварію Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України. Під час проведення експерименту щури перебували в стандартних умовах віварію з природним режимом освітлення, на повноцінному раціоні харчування. Утримання тварин і роботу з ними здійснювали відповідно до загальноприйнятих міжнародних правил проведення досліджень на експериментальних тваринах.

У якості моделі пухлинного росту було використано карциному Герена (штам, отриманий зі спонтанної аденокарциноми матки щурів) — класична модель низько диференційованої неметастатичної солідної пухлини, яка в короткі терміни прогресує і призводить до значного рівня смертності експериментальних тварин. Дослідження проведені з використанням двох штамів карциноми Герена: чутливого (вихідний) та резистентного до дії цисплатину. Пухлинні клітини обох штамів одержували з Банку клітинних ліній з тканин людини та тварин Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України. Перещеплення пухлинних клітин проводили підшкірно у пахову зону правої нижньої кінцівки у кількості $2,5 \cdot 10^6$ клітин на тварину в фізіологічному розчи-

ні NaCl. Загальним контролем слугували інтактні щури того ж віку і статі.

Периферичну кров для аналізу відбирали на 3-тю, 5-ту, 7-му, 9-, 14-, 18-ту та 21-шу доби після імплантації. Тварин піддавали декапітації під легким ефірним наркозом та відбирали кров у пробірки з гепарином чи етилендіамінтетраоцтовою кислотою (ЕДТА). Зразки крові до отримання плазми і лімфоцитів зберігали за 3–5 °С. Для отримання гемолізатів кров розводили в 400 або 800 разів дистильованою водою, після чого зберігали за 3–5 °С. Плазму крові отримували центрифугуванням упродовж 15 хв за 3000 об/хв.

Ріст пухлини оцінювали за об'ємом (V , cm^3), який розраховували за формулою [28]:

$$V = 3,14 \cdot D_1 \cdot D_2 \cdot D_3 / 6$$

де D_1 — довжина, D_2 — ширина, D_3 — висота пухлини в сантиметрах.

Інтенсивність вільнорадикальних процесів вивчали за прооксидантно-антиоксидантним співвідношенням у крові методом індукованої пероксидом водню хемілюмінісценції з модифікаціями [29, 30]. Кінетику світіння проб фіксували на приладі AutoLumat LB 953 (Germany). Дані виражали в імпульсах (імп) за 180 с (імп/180 с). Активність катализи визначали в гемолізаті крові дослідних щурів за методом [31], в основі якого лежить властивість пероксиду водню утворювати з солями молібдену стійкий забарвлений комплекс. Метод модифікували для проведення визначень на планшетному рідері Synergy (США). Реакцію проводили в пробірках, що містили 0,8 мл 20 мМ перекису водню та 40 мкл проби (кров, розведена дистильованою водою в 800 разів). Через 10 хв реакцію зупиняли додаванням 0,4 мл 4% молібдату амонію ($(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$) і проводили вимірювання (0,25 мл зразка на лунку) за довжини хвилі 410 нм. Частину утилізованого H_2O_2 визначали за калібрувальною кривою (0; 5; 10 та 20 мМ H_2O_2) та перераховували активність катализи у мМ H_2O_2 на 1 мл крові за хвилину (мМ/мл/хв). Рівень ПОЛ оцінювали за вмістом МДА в плазмі крові за методом [32], в основі якого лежить здатність МДА утворювати з 2-тіобарбітуровою кислотою стійкий забарвлений триметиновий комплекс. Визначення рівня окисної модифікації тиолових (-SH)-груп проводили за допомогою 5,5'-дітіобіс(2-нітробензойною кислотою) [33]. Рівень окиснення білків за вмістом альдегіддинітрофенілгідразонів (АДНФГ) оцінювали методом R.L. Levine [34] у модифікації О.Ю. Дубініної [35]. Рівень фруктозаміну в зразках визначали за допомогою аналізу NBT (nitro blue tetrazolium dye) на спектрофотометрі Beckman DU (США) за довжини хвилі 525 нм [36]. Утворення Амадори аддукту кількісно визначали з використанням коефіцієнту екстинкції $12640 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mole}^{-1}$ моноформазону [37]. Оцінку конформаційних змін, що відбуваються в молекулі альбуміну плазми крові інтактних щурів та щурів з пухлинами, проводили методом абсорбційної та флуоресцентної спектро-

скопії з використанням автоматичного планшетного рідера Synergy (США) і Thermo Scientific NanoDrop (Spectrophotometer and Spectrofluorimeter, США).

Статистичну обробку даних проведено з використанням програм MS Excel 2003. Достовірність розбіжностей оцінювали за *t*-критерієм Стьюдента. Різницю між одержаними показниками вважали достовірною за $p \leq 0,05$ [38].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Перші ознаки формування пухлин у підослідних тварин були зафіксовані на 7-му та 9-ту доби після перещеплення чутливого та резистентного до цисплатину штамів карциноми Герена. Середній об'єм пухлин у ці терміни не перевищував $0,5 \pm 0,1 \text{ см}^3$ (рис. 1). Дослідження показали, що для резистентного штаму характерним був уповільнений ріст карциноми, проте на 21-шу добу після перещеплення об'єм пухлин у тварин цієї групи ($28,0 \pm 0,3 \text{ см}^3$) на 11% перевищував такий у щурів із чутливим штамом.

Вважається, що одним із визначальних пускових факторів розвитку злоякісних пухлин є окисний стрес, який виникає внаслідок активації вільнорадикальних процесів і дисбалансу у співвідношенні швидкостей утворення речовин з анти- і прооксидантними властивостями. Саме тому під час оцінки поширення пухлинного процесу інформативними є показники стану системи антиоксидантного захисту організму і рівня продуктів окисної модифікації ліпідів і білків. Отримані результати щодо про-антиоксидантного співвідношення (рис. 2) свідчать про зростання загальної інтенсивності процесів вільнорадикального окиснення у крові щурів із чутливою та резистентною до цисплатину карциномою Герена впродовж усього терміну спостереження. У дослідженні цих процесів у динаміці росту пухлин обох штамів виявлено певну різницю у їх розвитку.

Максимальне достовірне збільшення про-антиоксидантного співвідношення у тварин із чутливим штамом спостерігали на 5- та 18-ту доби росту пухлини. У щурів з резистентною карциномою максимум зростання припадав на 9-ту, менш виражене підвищення показника — на 3-тю та 21-шу доби після перещеплення. Слід зазначити, що підвищення показника прооксидантно-антиоксидантного співвідношення в процесі розвитку карциноми Герена свідчить про певний дисбаланс у про-антиоксидантній рівновазі та перевагу першої складової. Більш значні зміни співвідношення спостерігали у тварин із чутливим штамом карциноми Герена. На 7-му добу відмічали зниження показника про-антиоксидантного співвідношення, що, вірогідно, є наслідком активації ферментів антиоксидантного захисту в крові у відповідь на інтенсифікацію вільнорадикальних процесів на початкових етапах розвитку карциноми. У фазі інтенсивного росту, можливо, відбувається акцепція ферментів пухлиною з метою самозахисту від нега-

тивного впливу АФК та адаптації. Саме тому, починаючи з 9-ї доби розвитку пухлини, відмічається достовірне збільшення вмісту речовин з прооксидантними властивостями.

Таким чином, у щурів із перещепленою карциномою Герена формування і ріст пухлини супроводжувалися підвищенням інтенсивності окисного стресу на тлі підвищення прооксидантних процесів, що виявилось більш вираженим у групі щурів із чутливим до цисплатину штамом карциноми Герена.

Окисний метаболізм є важливою ланкою біохімічних процесів, які забезпечують ключові параметри гомеостазу. Надлишок кисню при окисному стресі призводить до суттєвих порушень метаболізму, на фоні яких формуються патологічні стани, включаючи і злоякісну трансформацію клітин. Слід відмітити, що рівень ПОЛ у плазмі крові щурів з різними штамми карциноми Герена порівняно з показниками інтактного контролю залишався підвищеним протягом усього експерименту (рис. 3). У тварин із чутливим штамом максимальне значення цього показника спостерігали на 7-му добу після перещеплення, що відповідає періоду формування пухлини. Показники рівня ПОЛ у щурів з резистентним до цисплатину штамом карциноми Герена в цей

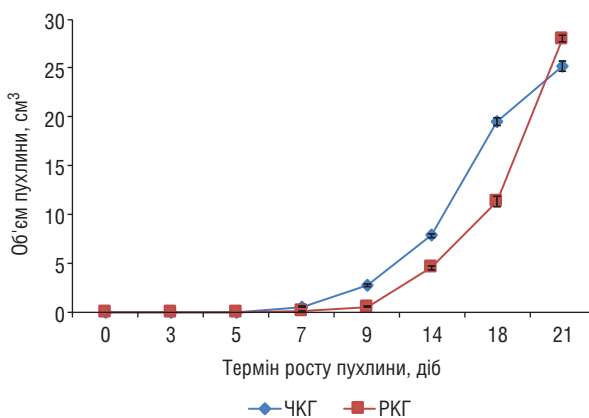


Рис. 1. Динаміка об'єму пухлин щурів з чутливим (ЧКГ) та резистентним (РКГ) до цисплатину штамми карциноми Герена

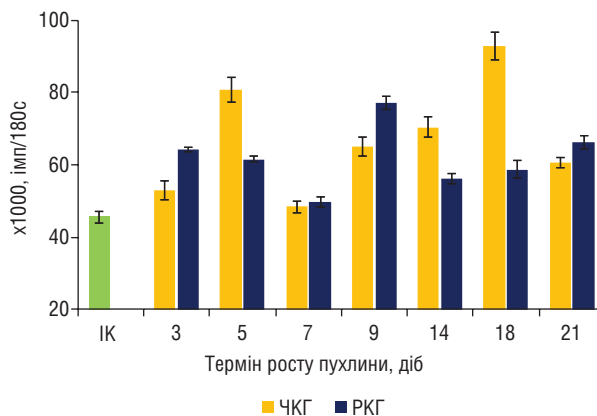


Рис. 2. Проксидантно-антиоксидантне співвідношення в гемолізаті периферичної крові щурів з чутливим (ЧКГ) та резистентним (РКГ) до цисплатину штамми карциноми Герена в динаміці пухлинного росту

період були дещо нижчими. Починаючи з 9-ї доби (період інтенсивного росту пухлин), у крові тварин з резистентним штамом відмічалася різке підвищення вмісту МДА, показники якого перевищували такі у щурів із чутливим штамом карциноми та інтактних щурів відповідно у $1,8 \pm 0,2$ та $3,3 \pm 0,3$ рази.

Зростання ПОЛ відбувалося на тлі поступового зниження показника антиоксидантного захисту (каталазної активності), який досягав свого мінімального рівня на 21-шу добу після перещеплення і був нижчим за показники інтактного контролю на 30,2 і 34,78% у групах тварин із чутливою і резистентною карциномами Герена відповідно (рис. 4). При цьому відмічено антибатну залежність із показниками про-антиоксидантного співвідношення в гемолізаті (див. рис. 2). Мінімальне значення про-антиоксидантного співвідношення на 7-му добу після перещеплення відповідало максимальним значенням каталазної активності порівняно з іншими термінами дослідження, що вказує на прогресування окисного стресу. Останній виникає внаслідок активації вільнорадикальних процесів і дисбалансу в співвідношенні швидкостей утворення речовин з анти- і прооксидантними властивостями.

Вільнорадикальне пероксидне окиснення практично на всіх етапах утворює ряд продуктів, які є

результатом взаємодії вільних радикалів як між собою, так і з біологічними макромолекулами. Внаслідок таких взаємодій утворюються активні сполуки, що призводять до окиснення білків. Окиснені білки в більшості своїй функціонально неактивні, краще піддаються протеолізу, здатні накопичуватися в різних тканинах, опосередковують окисне пошкодження ДНК, а також можуть самі виступати в якості джерела вільних радикалів, виснажуючи запаси клітинних антиоксидантів.

На сьогодні найбільш вивченим варіантом окисної модифікації білків є формування карбонільних похідних внаслідок окиснення амінокислотних залишків поліпептидного ланцюга [39, 40]. При цьому окиснення залишків лізину, аргініну, гістидину, проліну призводить до формування альдо- або кетопохідних, а за окиснення залишків глутамінової та аспарагінової кислот відбувається розщеплення пептидного зв'язку з утворенням пірувільної групи на N-кінці поліпептидного ланцюга [41]. За даними літератури, альдегідні похідні (АДНФГ) прийнято вважати ранніми, а кетопохідні — пізніми маркерами окиснення білків [42]. Описані вище типи карбонілювання відносять до первинних.

Активну участь в антиоксидантному захисті організму бере основний білок плазми крові — альбумін. Незважаючи на те що гідроксильні радикали, атакуючи, порушують молекулярну структуру альбумінової молекули, вони захоплюються нею і міцно утримуються в безпечному зв'язаному стані. При цьому сам пошкоджений альбумін піддається деградації протеолітичними ферментами, а його втрата швидко компенсується *de novo* синтезованою порцією.

Потенційною мішенню для оксидантів в альбуміні є його вільна SH-група, що знаходиться у положенні Cys 34 (рис. 5). Процес карбонілювання альбуміну викликає її втрату, що було відмічено при дослідженні його окисних пошкоджень впродовж усього терміну спостережень (рис. 6). Максимальне зниження SH-груп спостерігали на 9-ту і 21-шу добу після перещеплення чутливого штаму карциноми Герена, в групі з резистентною карциномою різке зменшення кількості SH-груп спостерігалося на 7-му і 18-ту доби. Зменшення кількості SH-груп альбуміну свідчить про його активну антиоксидантну дію, яка спрямована на інактивацію АФК та активних карбонільних сполук.

Втрата вільних сульфгідрильних груп викликала поступове зростання АДНФГ на тлі розвитку пухлин в обох групах експериментальних тварин (рис. 7) і ініціювала процес полімеризації пошкодженої в процесі карбонільного стресу молекули альбуміну. Утворення полімерних форм альбуміну було підтверджено барвником Конго червоним, який використовують для визначення перехресно зшитих β -структур та тіофлавіном — для ідентифікації білкових агрегатів та амлоїдних перехресно зшитих структур. Результати виявили тотожне зростання обох видів структур з максимумами на 5-ту і

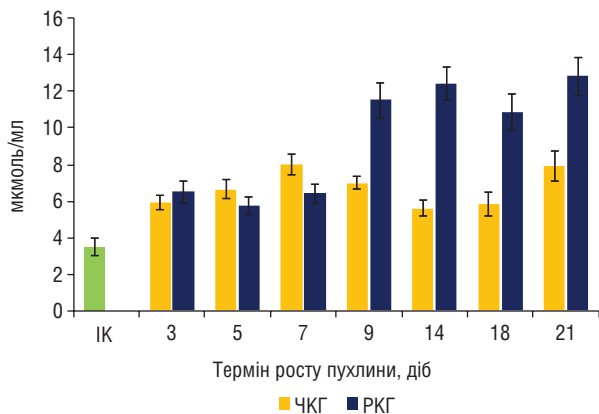


Рис. 3. Зміни вмісту МДА у плазмі крові щурів з чутливим (ЧКГ) та резистентним (ПКГ) до цисплатину штамми карциноми Герена в динаміці пухлинного росту

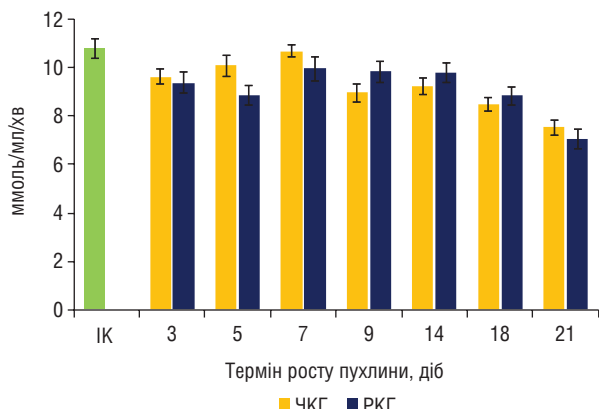


Рис. 4. Каталазна активність у гемолізатах крові щурів із чутливим (ЧКГ) та резистентним (ПКГ) до цисплатину штамми карциноми Герена в динаміці пухлинного росту

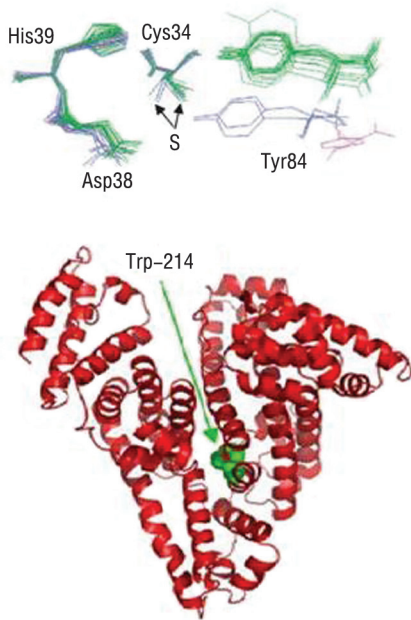


Рис. 5. Структурні особливості молекули альбуміну [43]

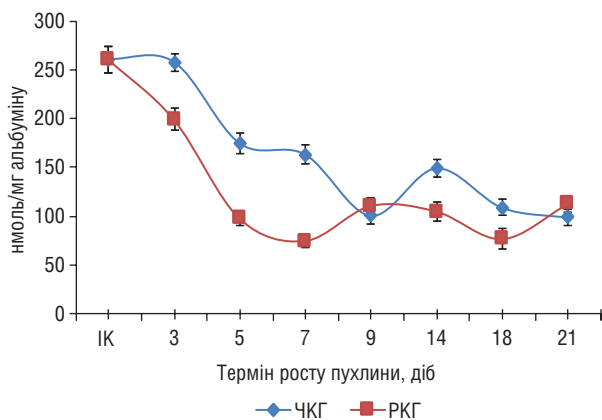


Рис. 6. Вміст вільних SH-груп у молекулі альбуміну плазми крові щурів з чутливим (ЧКГ) та резистентним (РКГ) до цисплатину штамами карциноми Герена в динаміці пухлинного росту

3-тю доби після перещеплення відповідно чутливого і резистентного штамів карциноми Герена зі зниженням до рівня інтактного контролю лише на 21-шу добу.

Окисна модифікація альбуміну характеризується зміною його кислотно-основних характеристик, зсувом ізоелектричної точки в бік нейтральних рН, зміною заряду білка, який стає більш негативним, та зміною молекулярної конформації протеїну. Структурні переходи в альбуміні, що супроводжують процес розвитку пухлин, було зафіксовано методами абсорбційної спектроскопії і флуоресцентного аналізу. Аналізуючи спектри абсорбції альбуміну плазми крові експериментальних тварин, можна стверджувати, що молекула альбуміну змінила свою конформацію вже на 3-тю добу в обох групах, на що вказує зниження світлопоглинання при довжині хвилі $\lambda = 278$ нм (рис. 8а). У цьому інтервалі за поглинання відповідає насамперед триптофановий залишок, розташований у другому домені молекули білку (див.

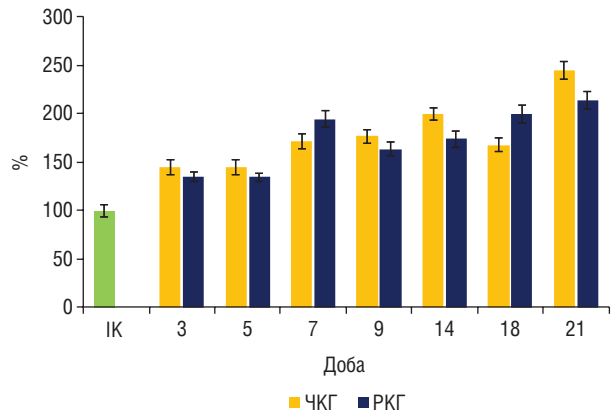


Рис. 7. Концентрація АДНФГ (%) в альбумінових фракціях плазми крові щурів з чутливим (ЧКГ) та резистентним (РКГ) до цисплатину штамами карциноми Герена на різні доби росту пухлини

рис. 5). Зміна величини поглинання (підвищення або зниження) свідчить про зміну доступності триптофанового залишку для джерела світла, який, внаслідок зміни конформації альбуміну, може знаходитися над поверхнею молекули, або занурюватися всередину. З рис. 8а видно, що в групі щурів з чутливою карциномою Герена спостерігається хвилеподібний характер зміни величини поглинання в період з 3- до 7-ї доби після перещеплення, після чого до 21-ї доби конформація практично не змінювалася, але відрізнялася від такої для альбуміну плазми крові інтактних щурів. У щурів з резистентною до цисплатину карциномою Герена конформація альбуміну в плазми крові залишалася зміненою з 3- до 21-ї доби пухлинного росту. Аналогічні зміни відображені на рис. 8б, на якому продемонстровано світлопоглинання не лише триптофановими, а й тирозиновими залишками альбуміну. У групі щурів з резистентним штамом карциноми, завдяки тирозиновим залишкам, зафіксовано підвищення величини абсорбції на 9-ту добу після перещеплення, а саме в період росту пухлин.

Кінцевим продуктом окиснення тирозину є бітирозин. Утворення бітирозинових зшивок між окремими молекулами білків вважається однією з головних причин агрегації білків [44–46]. Формування ковалентних зшивок викликає фізико-хімічні зміни властивостей білків, а саме — зниження їх розчинності за рахунок збільшення гідрофобності. Такі зшивки стійкіші до протеолізу, а білкові фрагменти, що накопичуються в клітині, мають токсичну дію, призводячи до апоптозу або некрозу клітини [47]. Ще одним доказом окисної модифікації триптофану та тирозину є зміни їх флуоресценції: у похідних триптофану рівень знижується, а формування бітирозинових зшивок призводить до підвищення інтенсивності флуоресценції [39].

Виявлено зниження інтенсивності власної флуоресценції триптофанових залишків альбуміну щурів із чутливим штамом карциноми Герена з 3- до 7-ї доби з подальшим поступовим її підвищенням

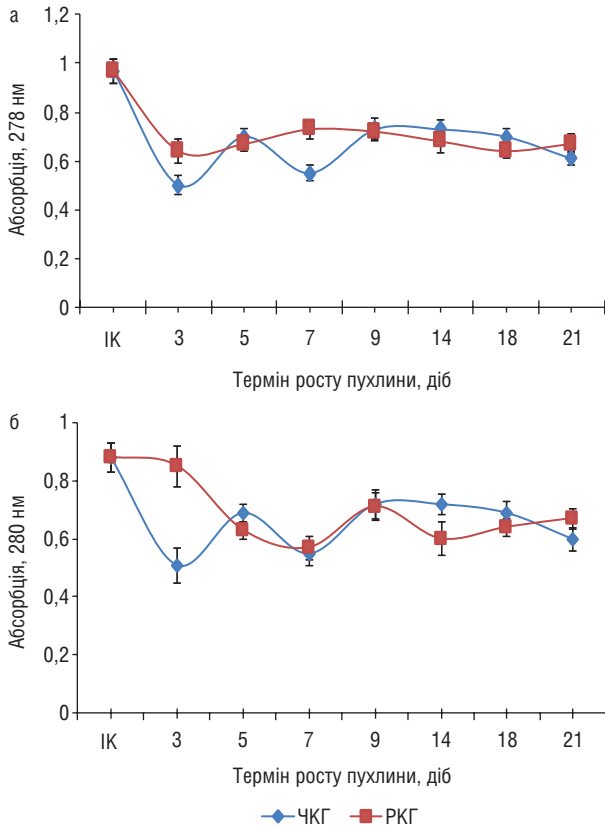


Рис. 8. Спектри абсорбції альбуміну (*a* — триптофанові залишки, *б* — тирозинові залишки) шурів із чутливим (ЧКГ) та резистентним (РКГ) до цисплатину штамом карциноми Герена в динаміці росту пухлини

до 21-ї доби після перещеплення (рис. 9*a*). Щодо альбуміну шурів з резистентною карциною Герена, з 3- до 7-ї доби спостерігали підвищення інтенсивності флуоресценції, на 9-ту — зниження, а з 9-ї до 21-ї — знову зростання.

Тирозинові залишки альбуміну плазми крові шурів з чутливою карциною Герена демонструють поступове зниження інтенсивності флуоресценції з 3- до 7-ї доби з подальшим майже двократним її підвищенням (з 4635 до 9606 у.о.) на 9-ту добу (рис. 9*б*). У групі з резистентною карциною Герена протягом усього періоду спостереження відмічали поступове зростання інтенсивності флуоресценції (з 6110 до 10658 у.о.).

Зміна конформації альбуміну плазми крові шурів з карциною Герена може бути пов'язана також із процесами неферментативного глікозилювання (рис. 10 і 11), оскільки, як зазначалося вище, альдегіди, що утворюються в процесі активації ПОЛ, здатні неензиматично реагувати з SH- та NH₂-групами протеїнів, ліпідів і нуклеїнових кислот, запускаючи реакції глікування. В альбумінових фракціях плазми крові шурів обох експериментальних груп впродовж усього терміну спостереження виявлено збільшення вмісту фруктозаміну — раннього продукту глікації. Отримані показники суттєво перевищували такі

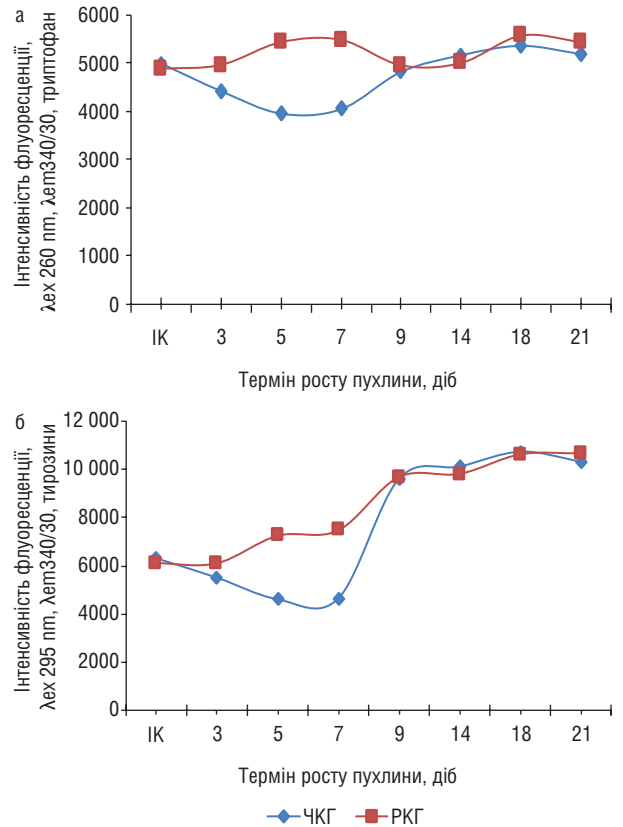


Рис. 9. Спектри флуоресценції альбуміну шурів з чутливим (ЧКГ) та резистентним (РКГ) до цисплатину штамом карциноми Герена в динаміці росту пухлин: *a* — триптофанові залишки, *б* — тирозинові залишки

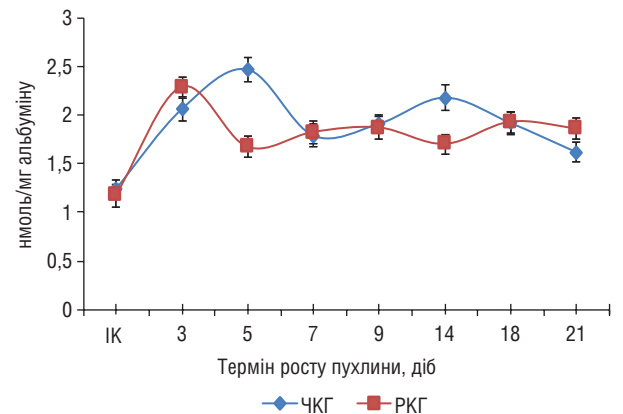


Рис. 10. Вміст фруктозаміну в альбуміні плазми крові шурів з чутливим (ЧКГ) та резистентним (РКГ) до цисплатину штамом карциноми Герена в динаміці росту пухлин

у інтактних тварин, особливо на початкових етапах після перещеплення пухлин (рис. 10).

Максимуми інтенсивності флуоресценції пентозидину, кінцевого продукту глікозилювання, що на 90% зв'язаний з альбуміном плазми крові, зростає на 3-ю і 18-ту доби після перещеплення чутливого до цисплатину штаму карциноми Герена (рис. 11). У групі шурів з резистентним штамом — основний максимум припадає на 7-му добу, у подальшому інтенсивність поступово знижується на тлі зростання пухлини.

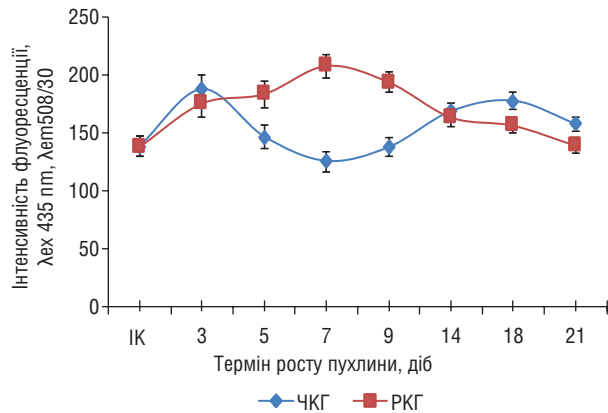


Рис. 11. Інтенсивність флуоресценції пентозидину в альбуміні плазми крові щурів з чутливим (ЧКГ) та резистентним (РКГ) до цисплатину штамами карциноми Герена в динаміці росту пухлин

Тобто, альбумінова молекула активно реагує на розвиток пухлинного процесу, демонструючи конформаційні зміни, які суттєво відрізняються в групах щурів з різними за чутливістю до цитостатику штамами карциноми Герена, особливо на початкових етапах росту пухлин на тлі розвитку окисно-карбонільного стресу.

Отримані дані дозволяють стверджувати про наявність окисно-карбонільного стресу, який прогресує, у щурів з карциною Герена, що може розглядатися в якості пускового механізму розвитку пухлин і набуття неопластичними клітинами високої злоякісності на тлі молекулярно-структурних змін альбуміну плазми крові. Результати роботи можуть бути використані для покращення диференційної діагностики новоутворень, а досліджені показники — поповнити панель позапухлинних маркерів розвитку і перебігу пухлинного процесу.

ВИСНОВКИ

1. Встановлено значне підвищення прооксидантних процесів з більшою їх вираженістю у щурів з вихідним (чутливим) до цисплатину штамом карциноми Герена. Відмічено збільшення проантиоксидантного співвідношення в динаміці росту карциноми з двома піками, що у тварин із резистентним штамом відтерміновані у часі і пов'язані з початком активного росту пухлини.

2. Виявлено підвищення інтенсифікації ПОЛ в плазмі крові щурів з різними штамами карциноми Герена впродовж усього експерименту на тлі поступового зниження каталазної активності в гемолізатах, що досягала свого мінімального рівня на 21-шу добу після перещеплення. Максимально високі значення вмісту МДА були відмічені в групі щурів з резистентним до цисплатину штамом і припадали на період з 9- до 21-ї доби після перещеплення пухлин, тобто на період їх виникнення і активного росту.

3. Встановлено зниження вільних сульфгідрильних груп, зростання окисної модифікації, кінцевих

продуктів глікооксидації і полімерних поперечно-зшитих β-структур амліоїдного типу в альбуміновому пулі плазми крові щурів залежно від стадії розвитку і типу перещепленого тваринам штаму карциноми Герена.

4. Виявлено суттєві зміни молекулярної конформації альбуміну в плазмі крові щурів залежно від зовнішнього мікрооточення, сформованого в плазмі крові і характерного для певних періодів після перещеплення чутливого і резистентного до цисплатину штамів карциноми Герена, а саме початку формування і поступового зростання злоякісних новоутворень.

Робота виконувалася в рамках НДР «Молекулярно-біологічні фактори гетерогенності злоякісних клітин та варіабельність клінічного перебігу гормонозалежних пухлин» (0117U002034) за фінансової підтримки Цільової програми наукових досліджень Відділення біохімії, фізіології і молекулярної біології Національної академії наук України «Молекулярно-генетичні і біохімічні механізми регуляції клітинних та системних взаємодій за фізіологічних та патологічних станів» (2017–2021).

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Fedorenko ZP, Mykhalovych YuY, Hulak LO, *et al.* Cancer in Ukraine, 2019–2020. Bulletin of the National Cancer Registry of Ukraine. Kyiv: National Cancer Institute, 2021; 22: 145 p. (in Ukrainian).
2. Colombo N, Creutzberg C, Amant F, *et al.* ESMO-ESGO-ESTRO Consensus conference on endometrial cancer: diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol 2016; 27: 16–41.
3. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin 2018; 68: 394–424.
4. Fulda S. Evasion of apoptosis as a cellular stress response in cancer. Int J Biochem Cell Biol 2010; 2010: 1–6.
5. Elstrom RL, Bauer DE, Buzzai M, *et al.* Act stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. Cancer Res 2004; 64: 3892–9.
6. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int J Biochem Cell Biol 2007; 39 (1): 44–84.
7. Goroshinskaya IA, Medvedeva DE, Surikova EI, *et al.* The state of oxidative metabolism in the blood of gastric cancer patients with various tumor histotypes. Modern problems of science and education 2019; 1: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=28440> (in Russian).
8. Muravleva LYe, Sirota VB, Zhumakaeva SS, *et al.* Oxidative stress in breast cancer. Modern problems of science and education 2019; 1: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=28590> (in Russian).
9. Breusing N, Grune T, Andrisic L, *et al.* An interlaboratory validation of methods of lipid peroxidation measurement in UVA-treated human plasma samples. Free Radical Research 2010; 44 (10): 1203–15.
10. Grimsrud PA, Hongwei X, Griffin TJ, Bernlohr DA. Oxidative stress and covalent modification of protein with bioactive aldehydes. J Biol Chem 2008; 283 (32): 21837–41.
11. Singh R, Barben F, Mori T, Beilin L. Advanced glycation end-products: a review. Diabetologia 2001; 44 (2): 129–46.
12. Baynes JW. From life to death — the struggle between chemistry and biology during aging: the Maillard reaction as an amplifier of genomic damage. Biogerontology 2000; 1 (3): 235–46.

13. Schalkwijk CG, Stehouwer CDA, Hinsbergh VWM. Fructose-mediated non-enzymatic glycation: sweet coupling or bad modification. *Diabetes Metab Res Rev* 2004; **20** (5): 369–82.
14. Mossine VV, Mawhinney TP. 1-Amino-1-deoxy-D-fructose («fructosamine») and its derivatives. *Adv Carbohydr Chem Biochem* 2010; **64**: 291–402.
15. Cho S-J, Roman G, Yeboah F, *et al.* The road to advanced glycation end products: a mechanistic perspective. *Curr Med Chem* 2007; **14** (15): 1653–71.
16. Krautwald M, Münch G. Advanced glycation end products as biomarkers and gerontotoxins — A basis to explore methylglyoxal-lowering agents for Alzheimer's disease? *Experimental Gerontology* 2010; **45** (10): 744–51.
17. Monnier VM. Intervention against the Maillard reaction *in vivo*. *Arch Biochem Biophys* 2003; **419** (1): 1–15.
18. Shaikh S, Nicholson LF. Advanced glycation end products induce *in vitro* cross-linking of alpha-synuclein and accelerate the process of intracellular inclusion body formation. *J Neurosci Res* 2008; **86** (9): 2071–82.
19. Fuentealba D, Friguet B, Silva E. Advanced Glycation Endproducts Induce Photocrosslinking and Oxidation of Bovine Lens Proteins Through Type-I Mechanism. *Photochem Photobiol* 2009; **85** (1): 185–94.
20. Li W, Gao H, Mu H, *et al.* Three different active aldehydes induce the production of advanced lipoxidation end products upon incubation with bovine serum albumin. *Europ. J of Lipid Scien Techn* 2015; **17** (9): 1432–43.
21. Kuhla B, Luth HJ, Haferburg D, *et al.* Methylglyoxal, glyoxal, and their detoxification in Alzheimer's disease. *Ann NY Acad Sci* 2005; **1043** (1): 211–16.
22. Glenn J, Stitt A. The role of advanced glycation end products in retinal ageing and disease. *Biochim Biophys Acta* 2009; **1790** (10): 1109–16.
23. Kalousova M, Zima T, Tesar V, *et al.* Soluble Receptor for advanced glycation end products in patients with decreased renal function. *Mutation Research. Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 2005; **579** (1–2): 37–46.
24. Singh VP, Bali A, Singh N, Jaggi AS. Advanced glycation end products and diabetic complications. *Korean J Physiol Pharmacol* 2014; **18** (1): 14.
25. Lozinska LM, Semchishyn GM. Biological aspects of non-enzymatic glycosylation. *Ukr biochemistry Journal* 2012; **84** (5): 16–37 (in Ukrainian).
26. Turpaev KT. Signal system Keap1-Nrf2. Regulation mechanism and importance for the protection of cells from the toxic effects of xenobiotics and electrophilic compounds. *Biochemistry* 2013; **78** (2): 147–66 (in Russian).
27. Nishizawa Y, Koyama H. Endogenous secretory receptor for advanced glycation endproducts and cardiovascular disease in end-stage renal disease. *J Ren Nutr* 2008; **18** (1): 76–82.
28. Sofyina ZP, Syrkina AB, Goldina A, Kleina A. Experimental evaluation of anticancer drugs in the USSR and the USA. *Moscow: Medicine*, 1980. 296 p. (in Russian).
29. Serkiz II, Druzhina NA, Khrienko AP, *et al.* Chemiluminescence of blood under radiation exposure. *Kyiv: Naukova Dumka*, 1989. 176 p. (in Russian).
30. Druzhyna MO, Makovetska LI, Glavin OA, *et al.* The freeradical processes in peripheral blood of patients with benign breast disease. *Oncology* 2018; **78** (4): 250–4 (in Ukrainian).
31. Korolyuk MA, Ivanova LI, Mayorova IG. Method for determining the activity of catalase. *Laboratory work* 1988; **1**: 16–9 (in Russian).
32. Stal'naya ID, Garishvili TG. Method for determination of malondialdehyde using thiobarbituric acid. In: *Modern methods in biochemistry. Orekhovich VN (ed)*. Moscow: Meditsina, 1997: 66–8 (in Russian).
33. Haynes R, Osuga DT, Feeney RE. Modification of amino groups in inhibitors of proteolytic enzymes. *Biochemistry* 1967; **6** (2): 541–7.
34. Levine RL, Garland D, Oliver CN, *et al.* Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Meth Enzymol* 1990; **186**: 464–78.
35. Dubinina EE, Burmistrov SO, Khodov DA, Porotov IG. Oxidative modification of human blood serum proteins, a method for its determination. *Questions of medicinal chemistry* 1995; **41** (1): 24–6 (in Russian).
36. Johnson RN, Mercalf PA, Baker JR. Fructosamine: a new approach to the estimation of serum glycosyl protein. *Clin Chem Acta* 1982; **137**: 87–9.
37. Alok R, Sidra I, Brijesh KM, *et al.* Optical screening of glycation-induced structural alterations in serum proteins of diabetes patients using spectroscopic techniques. *IJNTR* 2016; **5**: 44–8.
38. Lakin GF. *Biometry*. Moscow: Vyschaya Shkola, 1990. 352 p. (in Russian)
39. Dubinina EE, Pustygina AV. Oxidative modification of proteins, its role in pathological conditions. *Ukrbiochem journal* 2008; **80** (6): 5–18
40. Hauck AK, Bernlohr DA. Oxidative stress and lipotoxicity. *J Lipid Res* 2016; **57** (11): 1976–86.
41. Plowman JE, Deb-Choudhury S, Grosvenor AJ, Dyer JM. Protein oxidation: Identification and utilisation of molecular markers to differentiate singlet oxygen and hydroxyl radical-mediated oxidative pathways. *Photochem Photobiol Sci* 2013; **12** (11): 1960–7.
42. Gubsky YuI, *et al.* Toxicological consequences of oxidative modification of proteins in various pathological conditions. *Modern problems of toxicology* 2005; **8** (3): 20–7 (in Russian)
43. Turell L, Radi R, Alvarez B. The thiol pool in human plasma: the central contribution of albumin to redox processes. *Free Radic Biol Med* 2013; **65**: 244–53.
44. Dubinina EE. Oxygen metabolism products in the functional cell activity (life and death, creation and destruction). *Physiological and clinical and biochemical aspects*. SPb: Publishing house «Medical Press», 2006. 400 p. (in Russian)
45. Feeney MB, Schweich C. Tyrosine modifications in aging. *Antioxid Redox Signal* 2012; **7** (1): 1571–9.
46. Kay P, Wagner JR, Gagnon H, *et al.* Modification of peptide and protein cysteine thiol groups by conjugation with a degradation product of ascorbate. *Chem Res Toxicol* 2013; **26** (9): 1333–9.
47. Kurian GA, Rajagopal R, Vedantham S, Rajesh M. The role of oxidative stress in myocardial ischemia and reperfusion injury and remodeling: revisited. *Oxid Med Cell Longev* 2016; **2016**: 1656450.

BIOMARKERS OF OXIDE-CARBONYL STRESS IN RATS WITH GUERIN'S CARCINOMA DURING THE TUMORS PROGRESSION DEPENDING ON SENSITIVITY TO CISPLATIN

L.I. Makovetska, V.V. Sarnatska

RE Kavetsky Institute of Experimental Pathology,
Oncology and Radiobiology, NAS of Ukraine,
Kyiv, Ukraine

Summary. *Aim:* to investigate changes in markers of oxidative-carbonyl stress during the progression of Guerin's carcinoma with different sensitivity to cisplatin and to establish their relation with molecular-structural changes of blood plasma albumin. **Object and methods:** the work was performed on Wistar rats (females aged 2.5 months and weighing 180–200 g) with transplanted cisplatin-sensitive or -resistant strains of Guerin's carcinoma. The biological material for the analysis was taken on days 3, 5, 7, 9, 14, 18 and 21 after the implantation.

In the research, there were determined prooxidant-antioxidant ratio and catalase activity in the hemolysate, the content of malonic dialdehyde (MDA) in the blood plasma, the content of free SH groups and fructosamine in the albumin molecule and the concentration of aldehyde dinitrophenylhydrazones in the blood plasma albumin fractions. Conformational changes occurring in the plasma albumin molecule were evaluated by absorption and fluorescence spectroscopy. **Results:** in the dynamics of carcinoma growth, there was detected an increase (compared with the intact control) in the pro-antioxidant ratio which had two peaks that were associated with the onset of active tumor growth on days 5, 18 (sensitive strain) and 9, 21 (cisplatin-resistant strain) after the transplantation. Throughout the experiment, an intensification of lipid peroxidation in the blood plasma of the tumor-bearing rats against gradual decrease in the catalase activity of the hemolysates was observed. The highest values of MDA were registered since day 9 until 21 after the tumor transplantation in the group of rats bearing cisplatin-resistant strain. There was shown a decrease in free sulfhydryl groups alongside with an increase in oxidative modification, glyoxidation end products and polymer cross-linked amyloid-type β -structures

in the albumin pool of the rat blood plasma depending on the stage of development and the type of Guerin's carcinoma strain. Significant changes in the molecular conformation of the albumin of the rat's blood plasma in accordance with the external microenvironment formed in the blood plasma were observed. **Conclusions:** the obtained data suggest the presence of progressive oxidative carbonyl stress in rats with Guerin's carcinoma which can be considered both as a trigger of tumor development and as an acquisition of high malignancy by neoplastic cells. The relation between oxidative carbonyl stress and molecular and structural changes of blood plasma albumin was demonstrated. The results can be used to improve the differential diagnosis of tumors, and the studied indicators can enrich the panel of non-tumor markers of the tumor development and the disease course.

Key words: oxidative-carbonyl stress, markers, Guerin's carcinoma, sensitivity to cisplatin, albumin

Адреса для листування:

Маковецька Л.І.
03022, Київ, вул. Васильківська, 45
Інститут експериментальної патології,
онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького