

УДК 591.111.1:612.111:618.11-006.6

ИЗУЧЕНИЕ ПРО- И АНТИОКСИДАНТНОГО СТАТУСА ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ПРОГРЕССИРОВАНИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО РАКА ЯИЧНИКОВ

Тузеева А.Ю., Долгова Д.Р., Абакумова Т.В., Сенина Д.Н.

ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный университет», Ульяновск, e-mail: contact@ulsu.ru

Экспериментальные исследования проведены на белых крысах с перевиваемой асцитной опухолью яичников. Объектом исследования послужили эритроциты крыс в стационарную ($n = 22$) и в терминальную фазу роста опухоли ($n = 22$). (Контрольную группу составили здоровые половозрелые крысы ($n = 22$)). Изучены редокс-зависимые процессы в эритроцитах в динамике экспериментального канцерогенеза. Установлено значимое увеличение продуктов перекисного окисления липидов (диеновые конъюгаты, кетодиены, шиффовы основания, малоновый диальдегид) в эритроцитах в динамике роста опухоли в стационарную и терминальную фазу. При этом также отмечено повышение уровня активности ферментов – супероксид-дисмутазы, каталазы, глутатион-трансферазы у животных в стационарную и терминальную фазу роста асцитной опухоли яичников. Методом атомно-силовой микроскопии изучена цитоархитектоника эритроцитов и преобладание эхиноцитов в стационарную фазу и сфероциты в терминальную фазу. Таким образом, увеличение уровня липопероксидации и изменение топологии эритроцитов может свидетельствовать об усилении паранеопластических процессов.

Ключевые слова: антиоксидантная система, перекисное окисление липидов, атомно-силовая микроскопия, асцитная опухоль яичников

STUDY PRO AND ANTIOXIDANT STATUS OF ERYTHROCYTES IN THE PROGRESSION OF EXPERIMENTAL OVARIAN CANCER

Tuzeeva A.Y., Dolgova D.R., Abakumova T.V., Senina D.N.

Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, e-mail: contact@ulsu.ru

Experimental studies conducted on white rats with transplanted ascitic ovarian tumors. The object of the study were fixed erythrocytes rats ($n = 22$) and in the terminal phase of tumor growth ($n = 22$). (Control group consisted of healthy adult rats ($n = 24$)). Studied redox-dependent processes in erythrocytes in the dynamics of experimental carcinogenesis. Established significant increase in products of lipid peroxidation (diene conjugates, kettani, chiffony foundation, malonic dialdehyde) in erythrocytes in the dynamics of tumor growth in stationary and the terminal phase. It also noted the increased activity of the enzymes superoxide dismutase, catalase, glutathione-transferase animals in stationary and terminal growth phase ascitic ovarian cancer. By the method of atomic force microscopy were used to study cytoarchitectonic of erythrocytes and a predominance of echinocytes in the stationary phase and ferocity in the terminal phase. Thus, the increase in the level of lipoperoxidation and topology changes of erythrocytes may indicate a strengthening of paraneoplastic processes.

Keywords: antioxidant system, lipid peroxidation, atomic force microscopy, ascitic tumor of the ovaries

Одной из наиболее древних, эволюционно сложившихся и сложноустроенных биологических систем у человека является система редокс-гомеостаза, главным компонентом которой является сеть ферментов антиоксидантной защиты (АОЗ), контролирующих течение, направленность и интенсивность процессов свободнорадикального окисления (СРО) в органах и тканях и обеспечивающих приспособление организма к изменяющимся условиям внешней среды [1]. Около 90% потребляемого человеком молекулярного кислорода вовлекаются в реакции окислительного фосфорилирования, при этом образуются в небольших концентрациях свободные радикалы, которые участвуют в регуляции роста и дифференцировки клеток [2; 5]. Повышение уровня свободнорадикального окисления приводит к быстрому разрушению клеточных структур в результате их повреждения; происходит нарушение окислительно-восстановительного статуса

клеток, получивший название окислительный стресс, который выступает как одно из патогенетических звеньев канцерогенеза [8]. Эритроцит – один из важнейших носителей информации о процессах, протекающих в тканевых структурах. Его мембрана контактирует с опухолевой тканью, что приводит к нарушению метаболизма эритроцитов, в результате чего снижается их жизнеспособность, изменяется морфофункциональное состояние [3]. Использование перевиваемых опухолей, в частности асцитной опухоли яичников крыс (АОЯ), позволяет четко отслеживать стадии канцерогенеза. Целью исследования явилось изучение про- и антиоксидантного статуса эритроцитов при прогрессировании экспериментального рака яичников.

Материалы и методы исследования

Экспериментальные исследования проведены на белых беспородных крысах массой 180–200 г. с перевиваемой асцитной опухолью (штамм РЯ, РОНЦ им. Н.Н. Блохина, г. Москва). Прогрессирование

данного типа опухоли проходит в 3 фазы: логарифмическая (с 4-суток после перевивки), стационарная (с 8-суток после перевивки), терминальная стадия (с 13 суток после перевивки). Материалом для исследований послужили эритроциты крыс в стационарную ($n = 22$) и в терминальную фазу роста опухоли ($n = 22$). Контрольную группу составили здоровые половозрелые крысы ($n = 24$). Для оценки продуктов липопероксидации ЛПО в гемолизате эритроцитов (1:10) оценивали уровень диеновых конъюгатов (ДК) – при $E_{232/220 \text{ нм}}$, кетодиенов (КД) – при $E_{278/220 \text{ нм}}$, шиффовых оснований (ШО) – при $E_{400/220 \text{ нм}}$ по методу Волчегорского И.А. (1989). Содержание ТБК-активного продукта перекисного окисления липидов (ПОЛ) – малонового диальдегида (МДА) оценивали в тесте с тиобарбитуровой кислотой по методу Андреевой Л.И. (1988). Для оценки ферментативного звена антиоксидантной системы (АОЗ) изучали активность супероксиддисмутазы (СОД) по методу Nishikimi M. (1972), каталазы и глутатион-S-трансферазы (ГТ) по методу Карпищенко А.И. (1999). Исследования форм и размеров эритроцитов проводилось методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) Solver Pro (NT-MDT,

Зеленоград, Россия) в полуконтактном режиме, использовались фирменные кремниевые зонды с жесткостью 0,2 N/m, радиус закругления кончика зонда примерно 50 нм. Поскольку распределение в выборках отличалось от нормального, для оценки достоверности различий между группами использовали непараметрический критерий Манна-Уитни (Statav.6.0). Различия считались статистически значимыми при $p \leq 0,05$ от уровня контрольной группы.

Результаты исследования и их обсуждение

Известна роль СОД в поддержании уровня активных форм кислорода (АФК) в клетке. СОД в качестве начального звена защиты от супероксиданионов ускоряет реакции превращения кислородного радикала (супероксид OO) в перекись водорода и молекулярный кислород [4]. В нашем исследовании установлена тенденция к повышению СОД как в стационарную, так и в терминальную фазу (табл. 1).

Таблица 1

Активность ферментов АОЗ в эритроцитах при экспериментальном РЯ ($M \pm m$)

Ферменты АОЗ	Контроль $n = 24$	Стац. фаза $n = 22$	Терм. фаза $n = 22$
СОД, усл.ед./гр Нб	$1,178 \pm 0,064$	$1,245 \pm 0,075$	$1,372 \pm 0,122$
Каталаза, ммоль/мин/гр Нб	$10,37 \pm 0,890$	$16,13 \pm 1,140^*$	$13,16 \pm 1,242^*$
ГТ, ммоль/мин/гр Нб	$0,063 \pm 0,003$	$0,087 \pm 0,005^*$	$0,076 \pm 0,007^*$

Примечание: * – $p \leq 0,05$; данные, статистически значимо отличающиеся от контроля.

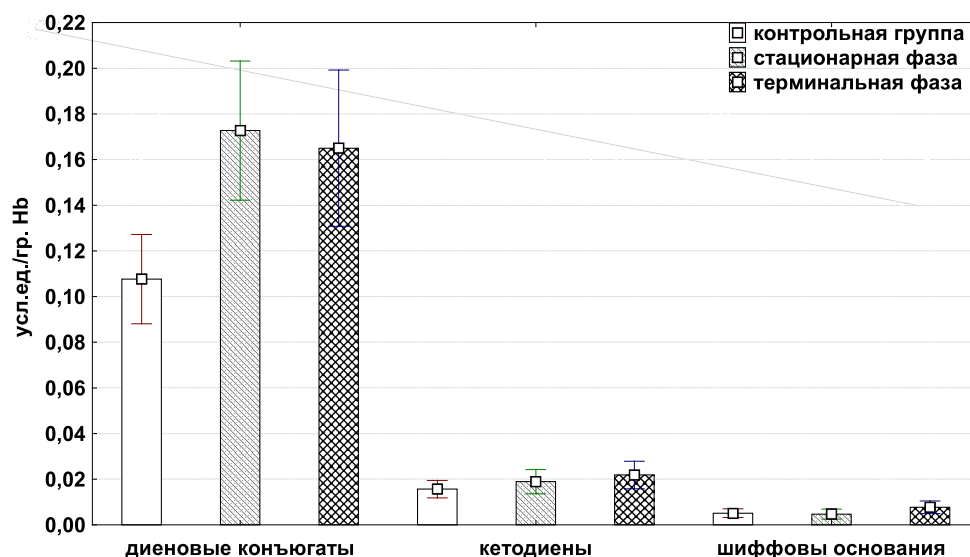


Рис. 1. Содержание продуктов ЛПО при прогрессировании экспериментального РЯ: ДК-диеновые конъюгаты; КД-кетодиены; ШО-шиффовы основания

Нами установлено статистически значимое увеличение уровня каталазы и ГТ в эритроцитах в стационарную фазу и незначительное снижение их активности в терминальную фазу (табл. 1). Однако име-

ющие более высокие значения, чем в контрольной группе.

Диеновые конъюгаты (ДК) являются первичными продуктами ПОЛ. При свободнорадикальном окислении арахидоновой

кислоты происходит отрыв водорода в α -положении по отношению к двойной связи, что приводит к перемещению этой двойной связи с образованием ДК [7]. Диеновые конъюгаты, являющиеся первичными продуктами ПОЛ, относятся к токсическим метаболитам, которые оказывают повреждающее действие на липопротеиды, белки, ферменты и нуклеиновые кислоты. Шиффовы основания (ШО) образуются в результате обратимой реакции между карбонильной группой альдегида или кетона со свободной аминогруппой. Непрерывное накопление оснований Шиффа дестабилизирует мембраны и способствует разрушению клеток [6]. Изучение уровня продуктов ЛПО в эритроцитах интактных животных показало, что в стационарную и терминальную фазы роста опухоли выявлены изменения концентраций ДК, КД, ШО (рис. 1).

Наиболее выраженное увеличение в динамике роста асцитной опухоли яичников отмечается в группе первичных продуктов ДК. Малоновый диальдегид является вторичным продуктом перекисного окисления липидов, увеличение которого провоцирует синдром интоксикации, он сшивает молекулы липидов и понижает текучесть мембраны (вследствие этого мембрана становится более хрупкой, нарушаются процессы, связанные с изменением поверхности мембраны: фагоцитоз, пиноцитоз, клеточная миграция [6]. Нами установлено повышение уровня МДА в эритроцитах в стационарную фазу роста опухоли до $6,696 \pm 0,801$ мкмоль/гр Нб в сравнении с контролем $4,379 \pm 0,611$ мкмоль/гр Нб. В терминальную фазу уровень МДА в эритроцитах также увеличен и составляет $7,197 \pm 0,501$ мкмоль/гр Нб. (рис. 2).

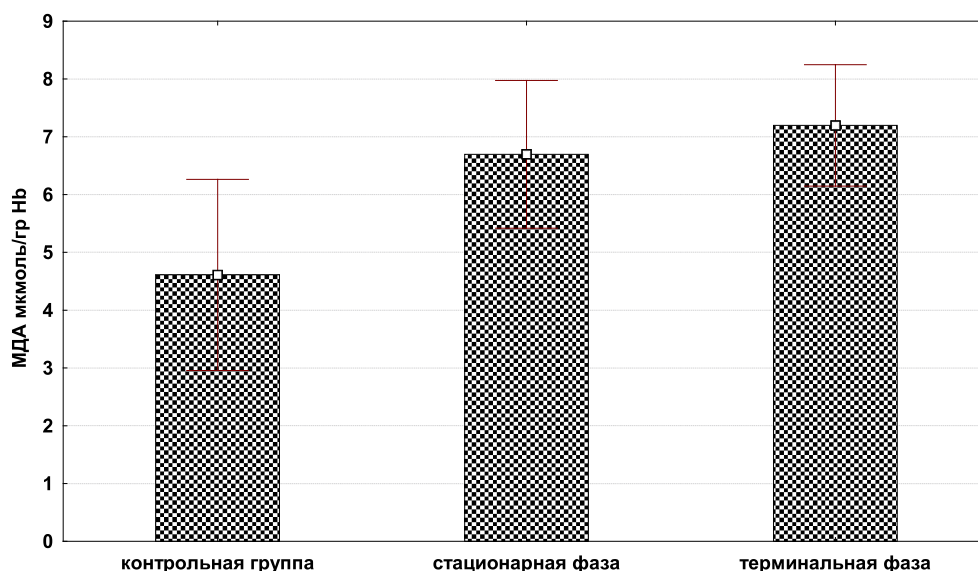


Рис. 2. Концентрация продукта МДА при прогрессировании экспериментального РЯ

Метод АСМ предоставляет возможность изучать параметры клеток, не прибегая к длительной и сложной фиксации, тем самым минимально искажая получаемую информацию. АСМ позволяет измерять упругие свойства поверхности клеток [9]. Также АСМ обеспечивает получение пространственного изображения поверхности. На рис. 3–5 представлены топография, боковое сечение профиля и изображение в 3D эритроцитов здорового животного и животных-опухоленосителей. При сканировании образцов интактных эритроцитов методом АСМ в основном обнаруживается с типичной дисковидной формой нормоциты (рис. 3). В стационарную фазу цитоархитектоники эритроцитов меняется. На сканиро-

ванном снимке появляются обратимо деформированные формы – эхиноциты (рис. 4). Их появление в физиологических условиях связано с изменением ионной проницаемости мембраны, с нарушением работы каналов. В терминальную фазу у животных-опухоленосителей практически все эритроциты представляют собой сфероциты. Они могут быть неправильной формы с измененными линейными размерами (рис. 5). Таким образом, в стационарную и терминальную фазу у животных-опухоленосителей изменяется содержание обратимо и необратимо измененных форм эритроцитов. Эритроциты увеличивает гемолиз, что снижает дыхательную функцию крови и усугубляет гипоксию у животных-опухоленосителей.

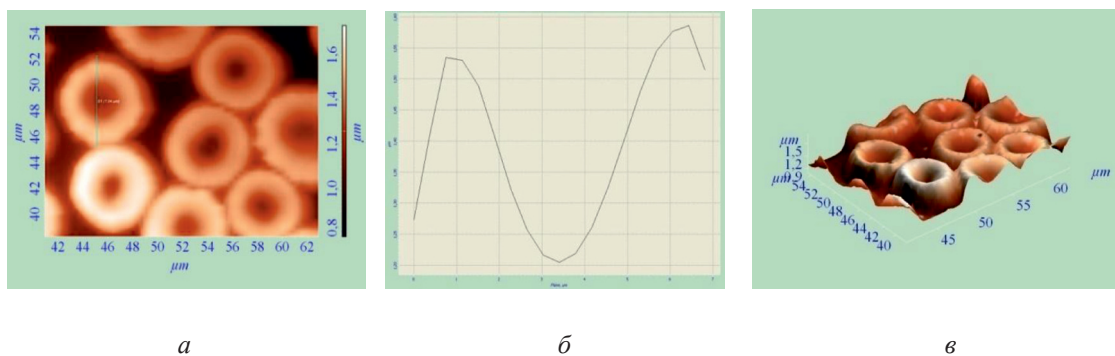


Рис. 3. Топология (а), боковое сечение профиля (б) и изображение в 3D (в) интактных эритроцитов

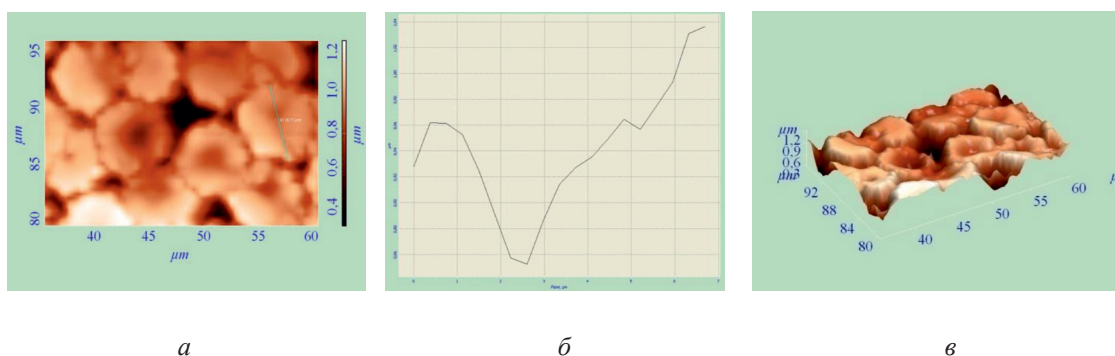


Рис. 4. Топология (а), боковое сечение профиля (б) и изображение в 3D (в) эритроцитов в стационарную фазу

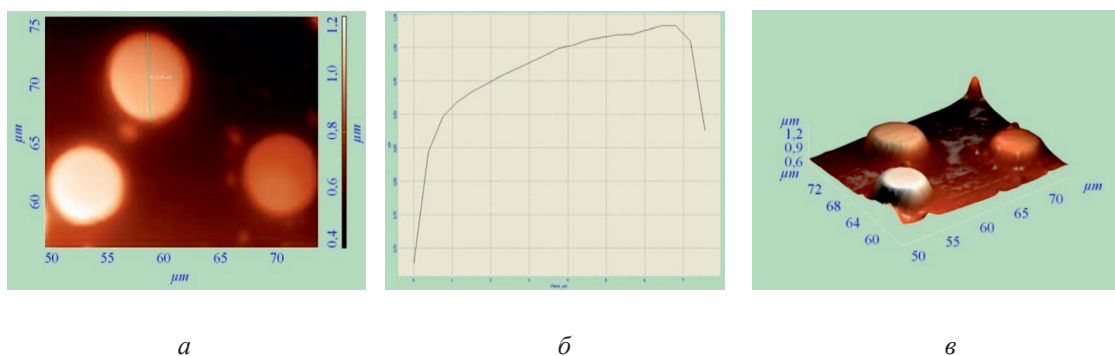


Рис. 5. Топология (а), боковое сечение профиля (б) и изображение в 3D (в) эритроцитов в терминальную фазу

Заключение

Таким образом, в стационарную фазу роста АОЯ на фоне увеличения липопероксидации и активности ферментов АОЗ система редокс-гомеостаза переходит на более высокий уровень функционирования. В терминальную фазу при продолжающемся накоплении продуктов окисления липидов наблюдается некоторое угнетение активности каталазы и ГТ, что может свидетельствовать о снижении адаптивных реакций антиоксидантного статуса эритроцитов

и развитии окислительного стресса. Методом АСМ показано изменение цитоархитектоники эритроцитов и преобладание эхиноцитов в стационарную фазу и сфероцитов в терминальную фазу. Все эти морфофункциональные изменения эритроцитов в динамике экспериментального канцерогенеза приводят к гипоксии в организме для опухоленосителя и усилению паранеопластических процессов.

Работа выполнена в рамках гос. задания МИНОБРНАУКИ России.

Список литературы

1. Величковский Б. Т. Свободнорадикальное окисление как звено срочной и долговременной адаптации организма к факторам окружающей среды // Вестник РАМН. – 2001. – № 6. – С. 45–52.
2. Владимиров Ю.А. Свободные радикалы в биологических системах //Соросовский Образовательный Журнал. – 2000. – Т. 6, № 12. – С. 13–19.
3. Луговская С.А. Лабораторная гематология / С.А. Луговская, В.Т. Морозова, М.Е. Почтарь и др. – М., 2002. – 120 с.
4. Логинов А.С. Внутриклеточная активация кислорода и молекулярные механизмы автоокислительного повреждения печени / А.С. Логинов, Б.Н. Матюшин // Вестн.АМН СССР. – 1994. – № 5. – С. 3–7.
5. Лю Б.Н., Лю М.Б., Исмаилов Б.И. Роль митохондрий в развитии и регуляции уровня окислительного стресса в норме, при клеточных патологиях и реверсии опухолевых клеток. Успехи современной биологии 2006; 126 (4): С. 388–398.
6. Тарасов Н.И., Тепляков А.Т., Малахович Е.В. и др. Состояние перекисного окисления липидов, антиоксидантной защиты крови у больных инфарктом миокарда, отягощенным недостаточностью кровообращения // Тер. архив. – 2002. – № 12. – С. 12–15.
7. Чеснокова Н.П. Типовые патологические процессы. Саратов: Изд-во Саратовского Медицинского Университета, 2004. – 400 с.
8. Gedik C. M. Oxidative stress in humans validation of biomarkers of DNA damage. / Gedick C.M., Boyle S.P., Wood S.G. at al. // Carcinogenesis. – 2002. – V.23. – P. 1441–1446.
9. Pleskova S.N. Research of neutrophils reaction on the lipopolisaccharides by atomic force microscopy / S.N. Pleskova, Yu.Yu. Guschina, M.B. Zvonkova // The FEBS Journal. – 2006. – V. 273. – P. 110.

References

1. Velichkovskij B.T. *Vestn. RAMN*, 2001, no.6, pp. 45–52.

2. Vladimirov Ju.A. *Sorosovskij Obrazovatel'nyj Zhurnal*, 2000, T. 6, no 12. pp. 13–19.
3. Lugovskaja S.A., Morozova, V.T., Pochtar' M.E. *Laboratornaja gematologija* [laboratory hematology]. Moscow, 2002. 120 p.
4. Loginov A.S., Matjushin B.N. *Vestn.AMN SSSR*, 1994, no.5, pp. 3–7.
5. Lju B.N., Lju M.B., Ismailov B.I. *Uspehi sovremennoj biologii*, 2006, 126 (4), pp. 388–398.
6. Tarasov N.I., Tepljakov A.T., Malahovich E.V. *Ter. arhiv*, 2002, no 12, pp. 12–15.
7. Chesnokova N.P., Tipovye patologicheskie processy [Typical pathological processes]. Saratov, 2004. 400 p.
8. Gedik C.M. Oxidative stress in humans validation of biomarkers of DNA damage. / Gedick C.M., Boyle S.P., Wood S.G. at al. // *Carcinogenesis*. 2002. V.23. pp. 1441–1446.
9. Pleskova S.N. Research of neutrophils reaction on the lipopolisaccharides by atomic force microscopy / S.N. Pleskova, Yu.Yu. Guschina, M.B. Zvonkova // *The FEBS Journal*. 2006. V. 273, p. 110.

Рецензенты:

Каталымов Л.Л., д.б.н., профессор кафедры анатомии, физиологии и гигиены человека и животных ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный педагогический университет им. И.Н. Ульянова», г. Ульяновск;

Любин Н.А., д.б.н. профессор, заведующий кафедрой морфологии, физиологии и патологии животных ФГБОУ ВПО «Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии имени П.А. Столыпина», г. Ульяновск.

Работа поступила в редакцию 05.12.2014.