

УДК 616.351-006-089

В.И. Жуков, С.В. Перепадя, Ю.А. Винник, О.В. Зайцева, А.С. Моисеенко

## ОКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ И СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАН У БОЛЬНЫХ РАКОМ ПРЯМОЙ КИШКИ

Харьковский национальный медицинский университет (г. Харьков)

Исследование выполнено в рамках приоритетной научно-технической темы МОЗ Украины «Розробка технології хромомодульованої радіохемотерапії іноперабельних хворих на рак шийки матки і прямої кишки» (№ держреєстрації 0104U000166 від 2008 р.) и является фрагментом диссертационной работы.

**Вступление.** Трансформация нормальной клетки в злокачественную сопровождается нарушением структурно-функционального состояния ее мембран и всех видов обмена веществ – жирового, водно-солевого, углеводного, белкового и нуклеинового, то есть нарушается баланс в системе структурно-метаболические процессы - функция биологических мембран. Важную роль в формировании физико-химических представлений о механизмах данной трансформации сыграла гипотеза академика Н.М. Эммануэля о свободнорадикальной природе процессов, лежащих в основе развития канцерогенеза [14]. В настоящее время подробно изучены вопросы состояния перекисного окисления липидов (ПОЛ) и антиоксидантной системы (АОС) в опухолевых и немалигнизированных тканях на различных моделях, показано значение свободных радикалов и продуктов ПОЛ в развитии мембранной патологии [3,5,8,13].

Актуальным представляется определение вклада разных видов реакций свободно радикального окисления (СРО) в этиологию наиболее распространенных и опасных заболеваний, в том числе онкологических, а также установление основных механизмов защитного действия антиоксидантных систем организма на различные звенья патологического процесса (этапы, стадии, фазы) и доказательство существования определенной направленности защитного влияния АОС на определенные молекулярные биоструктуры, в первую очередь, на главные из них – ядерный геном и биомембраны [1].

**Целью работы** явилось изучение свободнорадикальных процессов, ПОЛ и состояния АОС у больных колоректальным раком, а

также выявление особенностей структурно-функционального состояния мембран клеток крови для возможного использования в прогнозировании степени тяжести заболевания и эффективности адекватного лечения.

**Объект и методы исследования.** Изучены реакции свободнорадикальных процессов, перекисного окисления липидов, окислительной модификации белков и структурно-функциональное состояние мембран эритроцитов и лимфоцитов у больных (n=68) раком прямой кишки (РПК) в возрасте 35-78 лет с различными стадиями развития опухолевого процесса, что подтверждено клиническими и гистоморфологическими методами. В зависимости от стадии заболевания распределение больных было следующим: первая (I) стадия выявлена у 6 пациентов (4 мужчины, 2 женщины), вторая (II) – у 12 (7 мужчин, 5 женщин), третья (III) – у 33 (19 мужчин, 14 женщин) и четвертая (IV) – у 17 онкологических больных (11 мужчин, 6 женщин). Группу сравнения (n=21) представляли условно здоровые доноры аналогичного возраста и пола (12 мужчин, 9 женщин). Все больные находились на стационарном лечении в отделениях Харьковского областного онкологического центра. Реакции СРО, ПОЛ, компоненты АОС и структурно-функциональное состояние мембран изучали при поступлении больных в отделение перед проведением соответствующего лечения. О реакциях СРО в плазме крови судили по  $H_2O_2$  индуцируемой люминол-усиленной биохимилуминесценции сыворотки крови с использованием хемилуминометра ХЛМЦ 1-01. Содержание молекулярного продукта ПОЛ - малонового диальдегида (МДА) в сыворотке крови определяли флуориметрическим методом по реакции с тиобарбитуровой кислотой [13]. Диеновые конъюгаты (ДК) исследовали спектрофотометрическим методом [8]. Активность каталазы определяли спектрофотометрическим методом по скорости утилизации  $H_2O_2$  из инкубационной среды в цветной реакции с молибдатом аммония [5]. Пероксидазная активность исследовалась по

скорости окисления п-фенилендиамина перекисью водорода [9,10]. Активность супероксиддисмутазы (СОД) крови изучалась спектрофотометрическим методом по степени ингибирования восстановления нитросинего тетразолия (НСТ) [4]. Оксидазная активность церулоплазмينا (ЦП) определялась по методу Равина, сущность которого заключается в том, что бесцветная форма хромогена парафенилендиамина окисляется в окрашенную сине-фиолетовую форму ( $\lambda_{\max} = 530$  нм) [11]. Содержание в крови восстановленного глутатиона (Г-SH) и сульфгидрильных групп (SH-группы) определялось спектрофотометрическим методом с реактивом Элмана. Сущность данного метода основана на применении специфического тиолового реагента – 5,5-дитиобиснитробензойной кислоты (реактив Элмана), которая в реакции тиолдисульфидного обмена легко восстанавливается SH-веществом, образуя окрашенный в желтый цвет продукт тионитробензоат,  $\lambda_{\max} = 412$  нм [12].

Структурно-функциональное состояние мембран – полярность микроокружения, текучесть, погруженность белков в липидный матрикс изучали по методу Ю.А. Владимирова и Г.Е. Добрецова [2,6,7]. О текучести плазматических мембран лимфоцитов и эритроцитов судили по коэффициенту эксимеризации пирена, представляющего собой отношение количества эксимеров пирена ( $\lambda_{\text{исп}} = 470$  нм) к количеству его мономеров ( $\lambda_{\text{исп}} = 393$  нм). Коэффициент эксимеризации пирена, изменяющийся пропорционально текучести, изучали в зоне белок-липидных контактов ( $\lambda_{\text{возб}} = 287$  нм) и в липидном бислое ( $\lambda_{\text{возб}} = 334$  нм). Интенсивность флуоресценции 1,8-АНС, изменяющейся обратно пропорционально поверхностному заряду мембраны лимфоцита, изучали с помощью микроскопа ЛЮМАМ-ИЗ ( $\lambda_{\text{исп}} = 360$  нм,  $\lambda_{\text{исп}} = 490$  нм). Полярность микроокружения зонда в мембране ( $\lambda_{\text{возб}} = 334$  нм) оценивали по отношению флуоресценции зонда при  $\lambda_{\text{исп}} = 372$  нм к флуоресценции при  $\lambda_{\text{исп}} = 393$  нм. О степени погруженности белков в липидный бислой судили по тушению флуоресценции ароматических аминокислот (тирозина и триптофана) в результате безизлучательного переноса энергии на молекулу пирена при  $\lambda_{\text{возб}} = 282$  нм [2].

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием методов вариаци-

онной статистики с оценкой достоверности различий по Стьюденту-Фишеру.

#### Результаты исследований и их обсуждение.

Результаты изучения состояния оксидантно-антиоксидантных процессов у больных раком прямой кишки в зависимости от стадии заболевания отражены в табл.1. Выявлено существенное увеличение в сыворотке крови количества первичных продуктов СРО липидов, имеющих в структуре сопряженные диены, по сравнению с показателем референтной группы. При всех стадиях заболевания отмечалась прямая зависимость между тяжестью патологического процесса и содержанием в сыворотке крови ДК: при I, II, III и IV стадиях развития опухолевого процесса уровни ДК увеличены в 2,4; 2,8; 3,3 и 4,06 раза, соответственно. Сходная динамика содержания в сыворотке крови была присуща и конечному продукту ПОЛ – малоновому диальдегиду: наблюдалось увеличение концентрации в 2,6; 3,1; 3,3 и 3,6 раза.

Активация свободнорадикальных процессов и ПОЛ у больных с онкопатологией сопровождалась усилением ферментативной активности АОС защиты организма. Это подтверждалось повышением активности каталазы, пероксидазы, супероксиддисмутазы и церулоплазмينا, действие которых направлено на предотвращение повреждающего эффекта реакционноспособных форм кислорода (супероксидный анион-радикал ( $O_2^{\cdot-}$ ), гидроксильный ( $\cdot OH$ ), алкоксильный ( $RO^{\cdot}$ ), пероксидный радикал ( $ROO^{\cdot}$ ), перекись водорода ( $H_2O_2$ ), синглетный кислород ( $^1O_2$ ), гипохлорная кислота ( $HOCl$ ), оксид азота ( $\cdot NO$ ), пероксинитрит ( $ONOO^{\cdot}$ ) и др.) [12,13].

Среди низкомолекулярных антиоксидантов наблюдалось снижение восстановленного глутатиона (Г-SH) в сыворотке крови в 1,3; 1,6; 2,2 и 2,6 раза соответственно при I; II; III и IV стадиях развития опухолевого процесса, что свидетельствует об ингибировании системы детоксикации цитотоксических радикалов у больных раком прямой кишки. Необходимо подчеркнуть, что от действия наиболее опасных гено- и цитотоксических радикалов  $\cdot OH$  в организме нет ферментной защиты, и все функции по обезвреживанию этих частиц осуществляют низкомолекулярные антиоксиданты, среди которых ключевую роль играет глутатион [2,6,7].

Таблиця 1

Состояние оксидантно-антиоксидантного гомеостаза у больных раком прямой кишки в зависимости от стадии заболевания

Показатели	Группа наблюдения, М±m				
	Условно здоровые (n = 21)	Больные РПК, стадия заболевания			
		I n=6	II n=12	III n=33	IV n=17
ДК (мкмоль/л)	50,4±9,7	120,3±10,8*	144,8±15,9*	163,7±12,5*	205,2±18,3*
МДА (мкмоль/л)	12,3±3,6	32,4±4,2*	38,6±5,3*	40,5±6,4*	44,6±5,7*
Каталаза (мкат/гНв)	4,5±1,2	8,3±0,9*	9,6±0,7*	10,3±1,4*	12,7±2,6*
Пероксидаза (мкат/гНв)	12,5±2,8	17,2±1,4*	21,6±1,8*	23,5±2,3*	28,3±3,5*
Глутатионпероксидаза (мкат/гНв)	6,2±0,5	4,3±0,4*	4,1±0,4*	3,4±0,5*	2,6±0,3*
СОД (мкат/мгНв)	0,37±0,1	0,88±0,1*	0,94±0,2*	1,15±0,2*	1,23±0,3*
ЦП (мкмоль/л)	2,6±0,8	4,7±0,5*	5,3±0,5*	6,1±0,5*	6,4±0,6*
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -индуцир. люминол-усиленная БХЛ (J имп/сек)	768,3±147,6	549,7±48,4*	462,3±50,4*	345,6±52,3*	270,4±38,2*
Г-SH (моль/л)	2,2±0,4	1,7±0,2*	1,4±0,2*	1,2±0,3*	0,9±0,2*
SH-группы (ммоль/л)	14,5±2,7	15,9±1,3	22,6±1,8*	25,4±2,1*	28,3±2,5*

**Примечание:** \* - различия с референтной группой «условно здоровые» достоверные,  $p < 0,05$ .

На фоне снижения содержания в сыворотке крови глутатиона наблюдалось ингибирование активности фермента глутатионпероксидазы. Так, при I, II, III и IV стадиях заболевания активность фермента снижалась соответственно в 1,4; 1,5; 1,8 и 2,4 раза по сравнению с группой условно здоровых пациентов, что неизбежно может приводить к образованию активных форм кислорода и развитию гипоксии тканей [6,7]. Концентрация свободных сульфгидрильных групп (SH-) существенно повышалась в сыворотке крови при II, III и IV стадиях онкопроцесса. По мнению многих авторов, это является следствием нарушения структурно-функционального состояния биомембран и тиолсодержащих макромолекул [2,6,7]. Выход в сыворотку крови свободных сульфгидрильных групп при деструктивных процессах, по всей видимости, является фактором гашения электронных возбужденных состояний и одной из ведущих причин снижения интенсивности H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-индуцированной люминол-усиленной биохимиллюминесценции. Ингибирование интенсивности сверхслабого свечения было наиболее высоким при IV стадии канцерогенеза – в 2,8 раза по сравнению с контролем. При этом отмечалось и увеличение

концентрации SH-групп в сыворотке крови более чем в 1,9 раза.

Изучение структурно-функционального состояния плазматических мембран клеток крови (лимфоциты, эритроциты) выявило значительное снижение их текучести в зонах белок-липидных контактов и липидном бислое у больных раком прямой кишки по сравнению с референтной группой условно здоровых (табл.2). Степень выраженности изменений текучести плазматических мембран клеток крови была взаимосвязана с тяжестью течения заболевания. Максимальное снижение текучести наблюдалось при IV стадии патологического процесса: у мембран лимфоцитов – в 1,91 раза; эритроцитов – в 1,93 раза. Интенсивность флуоресценции 1,8 АНС в лимфоцитах, отражающая изменение поверхностного заряда плазматических мембран этих клеток, существенно уменьшалась у онкологических больных, что свидетельствует об гиперполяризации мембран и повышении отрицательного поверхностного заряда. В зависимости от стадии и тяжести развития канцерогенеза наблюдалось следующее снижение интенсивности флуоресценции: при I стадии – на 28%, III стадии – на 35%, IV стадии – на 47%.

Таблица 2

## Текучесть плазматических мембран лимфоцитов и эритроцитов крови больных раком прямой кишки (M±m)

Группа наблюдения	Лимфоциты		Эритроциты	
	Белок-липидные контакты	Липидный бислой	Белок-липидные контакты	Липидный бислой
Условно здоровые	3,18±0,12	3,26±0,08	2,98±0,12	2,89±0,13
Больные: I стадия	2,23±0,16*	2,40±0,14*	2,15±0,17*	2,30±0,22*
II стадия	1,84±0,11*	2,08±0,17*	1,86±0,14*	1,75±0,16*
III стадия	1,73±0,06*	1,74±0,07*	1,62±0,13*	1,68±0,11*
IV стадия	1,67±0,09*	1,64±0,08*	1,54±0,09*	1,56±0,07*

**Примечание:** \* - различия с группой «условно здоровые» достоверные,  $p < 0,05$ .

Изучение многими авторами структурно-функционального состояния мембран клеток крови выявило снижение их текучести при ишемической болезни сердца, атеросклерозе, инфаркте миокарда, сахарном диабете, термической травме, интоксикациях и др. [2,6,7]. Это дает основание полагать, что обнаруженные нами изменения текучести плазматических мембран отражают неспецифическую компоненту патогенеза опухолевого роста. Анализ изменения структурных показателей мембран свидетельствует об увеличении их жесткости, повышении ригидности и отрицательного заряда на поверхности плазматической мембраны, что препятствует адсорбции на ней анионного зонда 1,8АНС. Структурное состояние липидного бислоя определяет процессы формирования мембран, гемолиз эритроцитов и разрушение плазматических мембран других клеток. Такое изменение динамического состояния мембран может повлечь за собой изменение активности мембрано-связанных ферментов, нарушить функционирование мембранных транспортных и сигнальных систем, рецепцию различных соединений, межклеточные и адгезивные взаимодействия. Выявленное нами изменение физико-химического состояния липидного матрикса обуславливает переход клетки на новый метаболический уровень и отражает дефектность иммунной системы у онкологических больных, что является одной из характерных черт данной патологии. Значительное повышение вязкости плазматической мембраны приводит к нарушению связей между клетками, развитию микроциркуляторной и иммунной деструкции, утяжеляющих состояние больных [2].

**Выводы.** Таким образом, результаты исследования обнаружили нарушение кооперативного взаимодействия оксидантно-антиоксидантного гомеостаза у больных раком прямой кишки, а также физико-химических свойств плазматических мембран, которые являются важным

патогенетическим фактором развития канцерогенеза. Прогностически неблагоприятными показателями при оценке степени тяжести заболевания и эффективности лечения являются снижение интенсивности  $H_2O_2$ -индуцированной люминол-усиленной биохемилюминесценции сыворотки крови и повышение концентрации свободных сульфгидрильных групп. Оптимизация комплексного патогенетического лечения больных раком прямой кишки должна быть направлена на нормализацию оксидантно-антиоксидантного гомеостаза и физико-химических свойств цитоплазматических мембран.

**Перспективы дальнейших исследований.** Предполагается изучить интенсивность свободнорадикальных процессов, перекисного окисления липидов и окислительной модификации белков с использованием  $H_2O_2$ -индуцированной  $FeCl_3$ - и люминол-усиленной биохемилюминесценции и фосфоресценции сыворотки крови у больных раком толстого кишечника.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Беленічев І.Ф. Антиоксидантна система захисту організму (огляд) / І.Ф. Беленічев, Є.Л. Левицький, Ю.І. Губський [та ін.] // Сучасні проблеми токсикології. – 2002. – №3. – С. 24-31.
2. Владимиров Ю.А. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран / Ю.А. Владимиров, Г.Е. Добрецов. – М.: Наука, 1980. – 320 с.
3. Гаврилов Б.В. СФ-метрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови / Б.В. Гаврилов, М.И. Мишкорудная // Лаб. дело. – 1983. – №3. – С. 33-36.
4. Гуревич В.С. Сравнительный анализ двух методов определения СОД / В.С. Гуревич, К.Н. Конторщиков, Л.В. Шатилина // Лаб. дело. – 1990. – №4. – С. 44-47.
5. Дубинина Е.Е. Методы определения активности каталазы / Е.Е. Дубинина, Л.Ф. Ефимова, Л.Н. Сафронова // Лаб. дело. – 1988. – №8. – С. 16-19.
6. Зайцева О.В. Состояние свободнорадикальных процессов, перекисного окисления липидов и белков при псориазе / О.В. Зайцева, В.И. Жуков, Е.А. Броше // Эксперим. і клін. медицина. – 2002. – №4. – С. 86-89.
7. Зайцева О.В. Структурно-функциональное состояние цитоплазматических мембран при субхроническом токсическом воздействии на организм теплокровных жи-

- вотных оксигетилированного ксилита Л-655-2-100 / О.В. Зайцева, В.А. Телегин, В.И. Жуков и др. // Экспериментальная и клиническая медицина. — 2007.—№3. — С. 65-68.
8. Косухин А.Б. Экстракция липидов смесью гептан-изопропанол для определения диеновых конъюгатов / А.Б. Косухин, Б.С. Ахметова // Лаб. дело. — 1987.—№5. — С. 335-337.
  9. Ломинский А.В. Определение активности ферментов фибринолитической системы с использованием фибриногена, конъюгированного с пероксидазой / А.В. Ломинский, Г.А. Афанасенко, Е.В. Гудкова // Лаб. дело. — 1991.—№11. — С. 27-31.
  10. Меин В.М. Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах / В.М. Меин // Лаб. дело. — 1986.—№12. — С. 724-727.
  11. Мошков К.А. Определение ферментативной активности и иммунореактивности церулоплазмينا в сыворотке крови человека / К.А. Мошков // Лаб. дело. — 1985.—№7. — С. 390-395.
  12. Практикум по биохимии / Под. ред. С.Е. Северина. Т.А. Соловьевой. — М.: Изд-во МГУ, 1989. — С. 160-161.
  13. Федорова Т.К. Реакция с тиобарбитуровой кислотой для определения малонового диальдегида в крови методом флюориметрии / Т.К. Федорова, Т.С. Коршунова, Э.Т. Ларская // Лаб. дело. — 1983.—№3. — С. 25-28.
  14. Эммануэль Н.М., Цепные реакции./ Н.М. Эммануэль, Г.Е. Заиков, В.А. Крицман. — М.: Наука, 1989. — 328 с.

**УДК 616.351-006-089**

**ОКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНІ ВЗАЄМОДІЇ ТА СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН ПЛАЗМАТИЧНИХ МЕМБРАН У ХВОРИХ НА РАК ПРЯМОЇ КИШКИ**

**Жуков В.І., Перепадя С.В., Віннік Ю.О., Зайцева О.В., Моїсеєнко А.С.**

**Резюме.** У хворих (n=68) на рак прямої кишки з різними стадіями (I-IV) розвитку пухлинного процесу проведено дослідження реакцій вільно радикальних процесів, перекисного окиснення ліпідів, окиснювальної модифікації білків та структурно-функціонального стану мембран еритроцитів і лімфоцитів. Встановлено порушення кооперативної взаємодії оксидантно-антиоксидантного гомеостазу, а також фізико-хімічних властивостей плазматичних мембран. Прогностично несприятливими показниками при оцінці ступеня важкості захворювання і ефективності лікування є зниження інтенсивності H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-індукованої люмінал-підсиленої біохемілюмінесценції сироватки крові й зріст концентрації вільних сульфгідрильних груп.

**Ключові слова:** рак прямої кишки, оксидантно-антиоксидантний гомеостаз, мембрани еритроцитів і лімфоцитів.

**UDC 616.351-006-089**

**OXIDIZING-ANTIOXIDIZING INTERACTIONS and STRUCTURAL –FUNCTIONAL STATE of PLASMATIC MEMBRANES in PATIENTS RECEIVING COLORECTAL CANCER**

**Zhukov V.I., Perepadya S.V., Vinnik Ju.A., Zaytseva O.V., Moiseenko A.S.**

**Summary.** In patients (n=68) receiving colorectal cancer with different stages (I-IV) of the illness it were investigated reactions of free-radical processes, peroxidal oxidation of lipids, oxidizing modification of proteins and structural-functional state of erythrocytes and lymphocytes membranes. It is determined breach of cooperative interaction of oxidizing-antioxidizing homeostasis, and also changes of plasmatic membranes physics-chemical properties. In estimate of severity of disease and efficacy treatment prognostic unfavourable indices are such as lowering of intensity of blood serum H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induction luminol-intensified biochemiluminescence and growth of free sulphohydratic groups concentration.

**Key words:** colorectal cancer, oxidizing-antioxidizing homeostasis, erythrocytes and lymphocytes membranes.

*Стаття надійшла 18.12.2009 р.*