

## АНТИОКСИДАНТНИЙ СТАТУС ЛІМФОЦИТІВ КРОВІ ПРАКТИЧНО ЗДОРОВИХ ЖІНОК РІЗНИХ ВІКОВИХ ГРУП І ХВОРИХ НА РАК ЯЄЧНИКА

Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького (м. Львів)

vorobets@meduniv.lviv.ua

Робота є фрагментом НДР Львівського національного медичного університету ім. Данила Галицького «Дослідження функціонально-метаболических резервів стрес-лімітуючих систем організму за екстремальних умов з метою виявлення ефективних способів їх корекції», № державної реєстрації 0111U000121.

**Вступ.** Згідно сучасних уявлень віковій зміні в організмі та розвиток патологічних процесів супроводжуються порушенням механізмів антиоксидантного захисту клітин [2,4,5,9,13]. При пухлинному рості окиснювальні вільнорадикальні процеси ініціюються в фосфоліпідах клітинних мембран, що містять поліненасичені жирні кислоти. Інтенсифікація пероксидації ліпідів (ПОЛ) призводить до накопичення токсичних продуктів, що призводить до зниження резистентності організму [2,7,9,12,13,16]. В той же час буферна ємність антиоксидантної системи (АОС) достатньо велика та забезпечується різними складовими. Важливе місце серед АОС клітини займає система глутатіону, компоненти якої приймають участь як в ензиматичних (глутатіонпероксидаза, глутатіонредуктаза, глутатіонтрансфераза), так і в неензиматичних (відновлений глутатіон) реакціях АОС [11,13,14].

Хоча система глутатіону є об'єктом багатьох досліджень, в літературі немає одностайної думки щодо її ролі в вікових змінах організму, розвитку патологічних станів, зокрема злоякісного росту.

**Мета дослідження** – з'ясувати функціональний стан системи глутатіону у лімфоцитах крові різних вікових групах жінок і при раку яєчника.

**Об'єкт і методи дослідження.** Дослідження проводили на лімфоцитах периферичної крові практично (клінічно) здорових жінок різних вікових груп. Перша група, 26 жінок, була віком 20-40 років (K1), її умовно прирівняли до фізіологічної норми. Друга група, 18 жінок, віком 40-60 років, яку умовно прирівняли до донозоологічного стану. Третю групу жінок з неопластичними змінами яєчника склали 80 жінок, віком 24-75 років (середній вік 55,4±5,3 років), які перебували на стаціонарному лікуванні у Львівському державному регіональному онкологічному лікувально-діагностичному центрі в період 2011-2015 роках і пройшли обстеження.

У дослідження включали осіб зі встановленим діагнозом раку яєчника без наявності супутніх захворювань на момент початку дослідження.

Дослідну групу було розділено на 4 підгрупи, в залежності від стадії розвитку раку яєчника (РЯ).

Моноядерні лімфоцити периферичної крові людини виділяли з гепаринізованої свіжо отриманої крові у градієнті густини фікол-тріумбразу [10]. Життєздатність лімфоцитів, яка в усіх дослідках складала не менше 95%, оцінювали за забарвленням трипановим синім. Для пермеабілізації мембран лімфоцитів крові та розкриття латентних ензиматичних активностей до суспензії лімфоцитів додавали 0,2% сапонін [17].

Глутатіонпероксидазну активність лімфоцитів визначали за зменшенням вмісту GSH [6], глутатіонредуктазну активність – за зменшенням вмісту NADPH [15], глутатіонтрансферазну активність – за зменшенням вмісту GSH [1], інтенсивність ПОЛ оцінювали за вмістом одного з кінцевих метаболітів – малонового діальдегіду (МДА) [8]. Вміст відновленого глутатіону визначали за методом Власова [3].

Варіаційно-статистичне опрацювання даних здійснювали з використанням програмного пакета для персональних комп'ютерів *Microsoft Excel*. Достовірність змін встановлювали за *t*-критерієм Стьюдента.

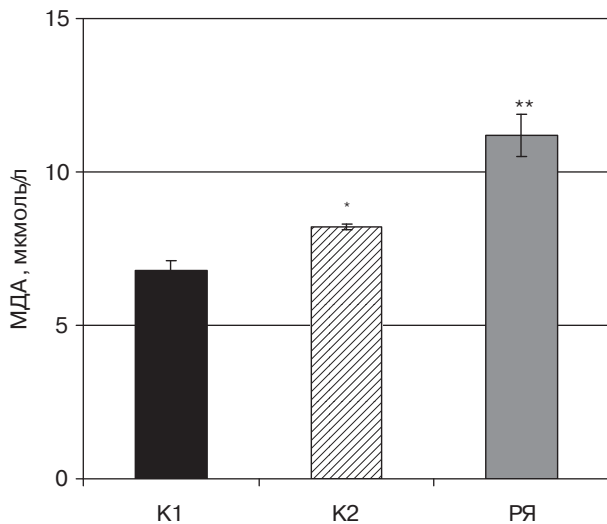
### Результати досліджень та їх обговорення.

Проведене порівняльне дослідження процесів ПОЛ в різних вікових групах жінок показало незначну активність цього процесу, за визначенням концентрації МДА. Так, у сироватці крові практично здорових жінок другої вікової групи K2, вона сягає (8,2±0,4) мкмоль/л у той час як в K1 вона складала (6,8±0,3) мкмоль/л ( $p<0,01$ ) (рис. 1). При РЯ процеси ПОЛ інтенсифікуються в 1,6 раза щодо K1 ( $p<0,001$ ).

Подібна ситуація спостерігається і при визначенні концентрації МДА у лімфоцитах крові. Так, у групі K1 концентрація МДА у лімфоцитах крові складає (61,2±4,5), а в K2 – (65,2±4,5) мкмоль/мг протеїну (рис. 2). При РЯ ця величина статистично достовірно зростає до (98,1±8,2) мкмоль/мг протеїну ( $p<0,001$ ).

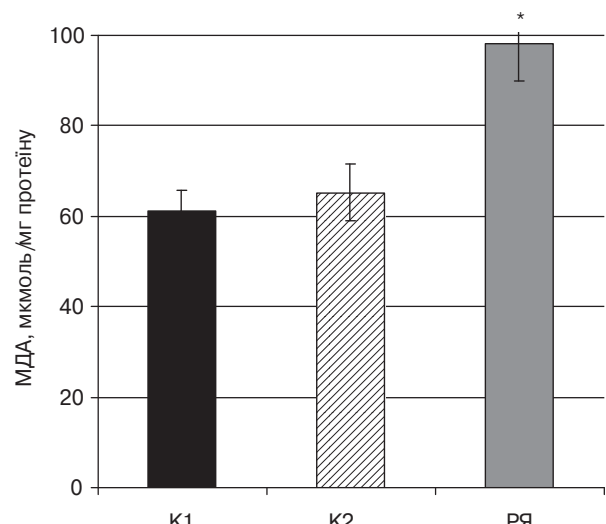
Таким чином, у практично здорових жінок різних вікових груп достовірні зміни в процесах ПОЛ виявлені тільки в сироватці крові, в лімфоцитах крові спостерігається тенденція до зростання процесів ПОЛ з віком жінок. Однак при РЯ процеси ПОЛ суттєво інтенсифікуються, в сироватці крові – в 1,6 рази, і лімфоцитах крові теж в 1,6 рази.

Одночасно з інтенсифікацією процесів ПОЛ, виявлені відповідні зміни і в активності системи глу-



**Рис. 1. Концентрація малонового діальдегіду у сироватці крові практично здорових жінок (K1 і K2) та жінок хворих на рак яєчника.**

**Примітка:** зміни вірогідні щодо величин в осіб контрольної групи K1 \* $p < 0,01$ ; \*\* $p < 0,001$ .



**Рис. 2. Концентрація малонового діальдегіду у лімфоцитах крові практично здорових жінок (K1 і K2) та жінок хворих на рак яєчника**

**Примітка:** зміни вірогідні щодо величин в осіб контрольної групи K1, \* $p < 0,001$ .

татіону (табл.). Так, показано, що в обох вікових групах практично здорових жінок достовірних змін в концентрації глутатіону немає. В K1 вона складає  $(17,2 \pm 1,6)$ , а K2 –  $(18,4 \pm 1,7)$  нмоль/мг протеїну. При РЯ ця величина зростає в 1,4 рази щодо K1 і сягає  $(24,3 \pm 2,1)$  нмоль/мг протеїну ( $p < 0,01$ ).

Також не виявлено достовірної різниці в активності глутатіонпероксидази в контрольних групах K1 і K2, яка складає відповідно  $(155,5 \pm 11,6)$  та  $(166,3 \pm 13,8)$  нмоль GSH/хв·мг протеїну. При РЯ ця величина статистично достовірно знижується в 1,6 рази – до  $(96,4 \pm 8,8)$  нмоль GSH/хв·мг протеїну ( $p < 0,001$ ). Щодо активності глутатіонредуктази, то в обох контрольних групах вона теж практично однакова –  $(50,2 \pm 5,1)$  (K1) та  $(53,6 \pm 5,2)$  нмоль NADPH/хв·мг протеїну (K2). При РЯ ця активність знижується до  $(36,6 \pm 3,3)$  нмоль NADPH/хв·мг протеїну, тобто в 1,4 рази щодо K1 ( $p < 0,05$ ).

Достовірних змін в активності глутатіонтрансферази в обох контрольних групах K1 і K2 теж не виявлено. Вони становлять відповідно  $(117,3 \pm 8,2)$  та  $(112,6 \pm 9,8)$  нмоль GSH/хв·мг протеїну. При розвитку РЯ (III-IV стадія) активність ГТ зростає до  $(139,7 \pm 10,6)$  нмоль GSH/хв·мг протеїну, тобто в 1,2 рази, проте ці зміни не є статистично достовірними ( $p > 0,05$ ).

Таким чином, достовірної різниці в активності системи глутатіону між двома віковими групами практично здорових жінок не виявлено. Однак при розвитку РЯ суттєво знижуються активності двох основних антиоксидантних ензимів – глутатіонпероксидази та глутатіонредуктази.

### Висновки

1. У практично здорових жінок різних вікових груп достовірних змін в процесах ПОЛ в лімфоцитах крові не виявлено, хоча спостерігається тенденція до зростання цього показника з віком жінок. Однак у сироватці крові концентрація МДА достовірно зростає з віком жінок. При раку яєчника процеси ПОЛ суттєво інтенсифікуються як в сироватці крові, так і в лімфоцитах крові.

2. Достовірної різниці в активності системи глутатіону між двома віковими групами практично здорових жінок не виявлено. Однак при розвитку раку яєчника суттєво знижуються активності двох основних антиоксидантних ензимів – глутатіонпероксидази та глутатіонредуктази.

### Перспективи подальших досліджень

Планується визначення пухлинного маркера розвитку раку яєчника глікопротеїну CA-125 у різних вікових групах практично здорових жінок і хворих на рак яєчника (на різних стадіях).

Таблиця.

**Стан глутатіонової антиоксидантої системи у практично здорових жінок і хворих на рак яєчника,  $M \pm m$ ,  $n = 18-22$ .**

Показники	Практично здорові жінки, K1	Практично здорові жінки, K2	Жінки хворі на рак яєчника, III-IV стадії
GSH, нмоль/мг протеїну	$17,2 \pm 1,6$	$18,4 \pm 1,7$	$24,3 \pm 2,1^{**}$
ГП, нмоль GSH/хв·мг протеїну	$155,5 \pm 11,6$	$166,3 \pm 13,8$	$96,4 \pm 8,8^{***}$
ГР, нмоль NADPH/хв·мг протеїну	$50,2 \pm 5,1$	$53,6 \pm 5,2$	$36,6 \pm 3,3^*$
ГТ, нмоль GSH/хв·мг протеїну	$117,3 \pm 8,2$	$112,6 \pm 9,8$	$139,7 \pm 10,6$

**Примітка:** зміни вірогідні щодо величин в осіб контрольної групи K1, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

## Література

1. Булавин Д.В. Глутатион-S-Трансфераза P1-1 в нормальной и опухолевой тканях легкого: свойства, функции и возможные механизмы регуляции активности / Д.В. Булавин, А.И. Карпищенко, А.И. Губанов // Биохимия. – 1996. – Т. 61, Вып. 6. – С. 1015-1027.
2. Владимиров Ю.А. Свободные радикалы в биологических системах / Ю.А. Владимиров // Соросовский образовательный журн. – 2000. – Т. 6, № 12. – С. 13-19.
3. Власова С.Н. Активность глутатион зависимых ферментов эритроцитов при хронических заболеваниях печени у детей / С.Н. Власова, Е.И. Шабунина, И.А. Переслегина // Лаб. дело. – 1990. – № 8. – С. 19-22.
4. Капелько В.И. Активные формы кислорода, антиоксиданты и профилактика заболеваний сердца / В.И. Капелько // Русский мед. журн. – 2003. – № 21. – С. 1185-1190.
5. Меньщиков Е.Б. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты / Е.Б. Меньщиков. – М.: Слово, 2005. – 556 с.
6. Моин В.М. Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах / В.М. Моин // Лаб. дело. – 1986. – № 12. – С. 724-727.
7. Подколзин А.А. Система антиоксидантной защиты и старение / А.А. Подколзин, А.Г. Мегреладзе, В.И. Донцов // Профилактика старения. – 2000. – В. 3. – С. 21-25.
8. Тимирбулатов С.А. Метод повышения интенсивности свободнорадикального окисления липидсодержащих компонентов крови и его диагностическое значение / С.А. Тимирбулатов, Е.И. Селезнев // Лаб. Дело. – 1988. – № 4. – С. 209-211.
9. Чеснокова Н.П. Молекулярно-клеточные механизмы инактивации свободных радикалов в биологических системах / Н.П. Чеснокова, Е.В. Понукалина, М.Н. Бизенкова // Успехи соврем. естествознания. – 2006. № 7. – С. 29-36.
10. Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood / A. Boyum // Scand. J. Clin. Lab. Invest. – 1968. – V. 21 (Supp. 97). – P. 77-89.
11. Chaves F.J. Inadequate cytoplasmic antioxidant enzymes response contributes to the oxidative stress in human hypertension / F.J. Chaves, M.L. Mansego, S. Blesa // Am. J. Hypertens. – 2007. – № 20 (1). – P. 62-69.
12. Forstermann U. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease / U. Forstermann // Pflugers Arch. – 2010. – № 459 (6). – P. 923-939.
13. Gorodzanskaya E.G. Role of glutathione-dependent peroxidase in regulation of lipoperoxide utilization in malignant tumors / E.G. Gorodzanskaya, V.B. Larionova, G.N. Zubrikhina // Biochemistry. – 2001. – V. 66, № 2. – P. 221-224.
14. Kaynar H. Glutathione peroxidase, glutathione-S-transferase, catalase, xanthine oxidase, Cu-Zn superoxide dismutase activities, total glutathione, nitric oxide, and malondialdehyde levels in erythrocytes of patients with small cell and non-small cell lung cancer / H. Kaynar, M. Meral, H. Turhan // Cancer Lett. – 2005. – № 227 (2). – P. 133-139.
15. Mannervik B. Glutathione peroxidase / B. Mannervik // Meth. Enzym. – 1991. – V. 77. – P. 490-495.
16. Siddique Y.H. Estimation of lipid peroxidation induced by hydrogen peroxide in cultured human lymphocytes / Y.H. Siddique, G. Ara, M. Afzal // Dose Response. – 2012. – № 10 (1). – P. 1-10.
17. Vorobets Z. Effect of proton pump blocker on enzyme activity of glutathione antioxidant system of the peripheral blood lymphocytes / Z. Vorobets, O. Kimakovich // Annales Universitatis Mariae-Sklodowska. – 2006. – V. 19, № 1. – P. 131-134.

УДК 612.015.33.+616.153.94

### АНТИОКСИДАНТНИЙ СТАТУС ЛІМФОЦИТІВ КРОВІ ПРАКТИЧНО ЗДОРОВИХ ЖІНОК РІЗНИХ ВІКОВИХ ГРУП І ХВОРИХ НА РАК ЯЄЧНИКА

Якубець О. І., Воробець Д. З., Воробець З. Д., Гжегоцький М. Р.

**Резюме.** У практично здорових жінок різних вікових груп – 20-40 і 40-60 років, достовірних змін в процесах ПОЛ в лімфоцитах крові не виявлено, хоча спостерігається тенденція до зростання цього показника з віком жінок. Однак у сироватці крові, за визначенням концентрації МДА, ПОЛ достовірно зростає з віком жінок. При раку яєчника процеси ПОЛ суттєво інтенсифікуються, в 1,6 рази, як в плазмі крові, так і в лімфоцитах крові. Достовірної різниці в активності системи глутатіону (відновлений глутатіон, глутатіонпероксидаза, глутатіонредуктаза, глутатіон-S-трансфераза), між двома віковими групами практично здорових жінок не виявлено. Однак при розвитку раку яєчника суттєво знижуються активності двох основних антиоксидантних ензимів – глутатіонпероксидази в 1,6 рази, глутатіонредуктази в 1,4 рази, а активність глутатіон-S-трансферази зростає в 1,2 рази. Також зростає в 1,4 рази концентрація відновленого глутатіону.

**Ключові слова:** лімфоцити, система глутатіону, пероксидація ліпідів, рак яєчника.

УДК 612.015.33.+616.153.94

### АНТИОКСИДАНТНОЕ СОСТОЯНИЕ ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ ПРАКТИЧЕСКИ ЗДОРОВЫХ ЖЕНЩИН РАЗНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУПП И БОЛЬНЫХ РАКОМ ЯИЧНИКА

Якубец О. И., Воробец Д. З., Воробец З. Д., Гжегоцкий М. Р.

**Резюме.** У практически здоровых женщин разных возрастных групп – 20-40 и 40-60 лет, достоверных изменений в процессах ПОЛ в лимфоцитах крови не обнаружено, только наблюдается тенденция к увеличению этого показателя с возрастом женщин. Однако в сыворотке крови, за определением концентрации МДА, ПОЛ достоверно увеличивается с возрастом женщин. При раке яичника процессы ПОЛ существенно интенсифицируются, в 1,6 раза, как в плазме крови, так и в лимфоцитах крови. Достоверно различия в активностях энзимов системы глутатиона (восстановленный глутатион, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза, глутатион-S-трансфераза), между двумя возрастными группами практически здоровых женщин не обнаружено. Однако при развитии рака яичника существенно снижаются активности обеих основных антиоксидантных энзимов – глутатионпероксидазы в 1,6 раза и глутатионредуктазы в 1,4 раза, а активность

глутатион-S-трансферазы увеличивается в 1,2 раза. Также увеличивается в 1,4 раза концентрация восстановленного глутатиона.

**Ключевые слова:** лимфоциты, система глутатиона, пероксидация липидов, рак яичника.

UDC 612.015.33.+616.153.94

### **BLOOD LYMPHOCYTES ANTIOXIDANT STATE IN DIFFERENT AGE GROUPS OF PRACTICALLY HEALTHY WOMEN AND PATIENTS WITH OVARIAN CANCER**

**Yakobets O. I., Vorobets D. Z., Vorobets Z. D., Gzhegotsky M. R**

**Abstract.** Comparative study of lipid peroxidation in different age groups of women showed slight activation of this process. Thus, in the serum of healthy women of the second age group K2, the concentration of malondialdehyde (MDA) reached  $(8,2 \pm 0,4) \mu\text{mol/l}$ , while in the K1 it was  $(6,8 \pm 0,3) \mu\text{mol/l}$ . In patients with ovarian cancer processes of lipid peroxidation were intensified in 1,6 times comparably to K1. A similar situation was observed in determining the concentration of MDA in blood lymphocytes. Thus, the group K1 concentration of MDA in blood lymphocytes was  $(61,2 \pm 4,5)$ , and the K2 –  $(65,2 \pm 4,5) \mu\text{mol/mg}$  of protein. In the patients with ovarian cancer this value was significantly increased to  $(98,1 \pm 8,2) \mu\text{mol/mg}$  of protein. Thus, in healthy women of different age groups significant changes in lipid peroxidation were found only in the blood serum, while in the lymphocytes processes of lipid peroxidation tend to increase with women age.

Along with the intensification of lipid peroxidation processes appropriate changes in the activity of the glutathione were detected. Thus, it was demonstrated that there are no significant changes in the concentration of glutathione in both age groups of healthy women. In K1 it was  $(17,2 \pm 1,6)$ , and in K2 –  $(18,4 \pm 1,7) \text{nmol/mg}$  of protein. In ovarian cancer patients this value was increased in 1.4 times comparably to K1 and reached  $(24,3 \pm 2,1) \text{nmol/mg}$  of protein. There were no significant differences in the activity of glutathione peroxidase in the control groups K1 and K2 and it was respectively  $(155,5 \pm 11,6)$  and  $(166,3 \pm 13,8) \text{nmol GSH/min}\cdot\text{mg}$  of protein. In ovarian cancer patients this value was significantly reduced in 1.6 times – up to  $(96,4 \pm 8,8) \text{nmol GSH/min}\cdot\text{mg}$  of protein. Regarding an activity of glutathione reductase, in both control groups it was also almost identical –  $(50,2 \pm 5,1)$  (K1) and  $(53,6 \pm 5,2) \text{nmol NADPH/min}\cdot\text{mg}$  of protein (K2). Upon investigation of ovarian cancer patients this activity was reduced to  $(36,6 \pm 3,3) \text{nmol NADPH/min}\cdot\text{mg}$  of protein, that is in 1.4 times regarding K1.

Significant changes in the activity of glutathione transferase in both control groups K1 and K2 were not found. They were respectively  $(117,3 \pm 8,2)$  and  $(112,6 \pm 9,8) \text{nmol GSH/min}\cdot\text{mg}$  of protein. With the development of ovarian cancer (stage III-IV) activity of GT increases to  $(139,7 \pm 10,6) \text{nmol GSH/min}\cdot\text{mg}$  of protein, ie in 1,2 times, but these changes are not statistically significant.

Thus, in practically healthy women of different age groups significant changes in the processes of lipid peroxidation in lymphocytes were not found, although there was a tendency to increasing of this value with the age of women. However, the serum concentration of MDA significantly increases with the age of women. In ovarian cancer patients processes of ovarian cancer are being significantly intensified in both serum and lymphocytes. Significant differences in the activity of glutathione system between the two age groups of healthy women were not found. However, during the development of ovarian cancer activity of two key antioxidant enzymes - glutathione peroxidase and glutathione reductase is being significantly reduced.

**Keywords:** lymphocytes, glutathione system, lipid peroxidation, ovarian cancer.

*Рецензент – проф. Костенко В. О.*

*Стаття надійшла 17.03.2016 року*