

ОКИСЛИТЕЛЬНАЯ МОДИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ И ЛИПИДОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ БОЛЬНЫХ РАКОМ ЛЕГКОГО

Р.Н. Белоногов¹, Н.М. Титова¹, Ю.А. Дыхно², П.В. Лапешин²,
Е.В. Кудряшова¹, А.А. Савченко¹

*Сибирский федеральный университет, г. Красноярск¹
Красноярский государственный медицинский университет²
660041, г. Красноярск, пр. Свободный, 79, e-mail: ro-x@ya.ru¹*

С целью определения уровня показателей окислительной модификации белков и липидов в плазме крови 58 больных раком легкого оценивалось содержание диеновых конъюгатов, малонового диальдегида, карбонильных производных белков, среднемолекулярных пептидов, битирозина, SH-групп белков. Изменение содержания данных показателей свидетельствует об увеличении интенсивности свободнорадикальных процессов и варьирует в зависимости от стадии заболевания. Содержание продуктов окисления липидов возрастает при раке легкого IV стадии со смещением равновесия в сторону образования конечных продуктов липопероксидации. Также отмечен рост интенсивности окислительной модификации белков относительно контрольной группы, увеличение уровня карбонильных производных белков и снижение содержания битирозина и SH-групп белков. Уровень среднемолекулярных пептидов возрастает при II стадии заболевания и в дальнейшем практически не изменяется.

Ключевые слова: рак легкого, перекисное окисление липидов, окислительная модификация белков.

OXIDATIVE MODIFICATION OF PLASMA PROTEINS AND LIPIDS OF LUNG CANCER PATIENTS

*R.N. Belonogov¹, N.M. Titova¹, Yu. A. Dychno², P.V. Lapeshin², E.V. Kudryashova¹, A.A. Savchenko¹
Siberian Federal University, Krasnoyarsk¹
Krasnoyarsk State Medical University²
79, Svobodny avenue, 660041-Krasnoyarsk, e-mail: ro-x@ya.ru¹*

The aim of the study was to investigate level of different markers of oxidative modification of lipids and proteins in blood plasma of lung cancer patients at different stages. 58 patients with lung carcinoma were chosen for study. We measured diene conjugates, malondialdehyde, proteins carbonyl groups, middle molecular peptides, dityrosine and SH-groups. Alteration of levels of given markers indicates increase of free radical processes intensity and vary according to stage of the disease. Content of lipoperoxidation products increases to IV stage with enhancement of formation lipoperoxidation end-products. As well we registered higher level of oxidative modification of proteins in comparison with control. Content of carbonyl derivatives increased to IV stage, however dityrosine and SH-groups levels were decreased. Level of middle molecular peptides increased to II stage and did not significantly changed to further stages.

Key words: lung cancer, lipid peroxidation, oxidative modification of proteins.

Рак легкого является одной из основных причин смертности от онкологических заболеваний. Несмотря на большое количество исследований, касающихся этой проблемы, остается множество вопросов, связанных с диагностикой и лечением данной патологии. В процессе злокачественного роста происходит изменение показателей антиокислительной активности и окислительного статуса опухоли, что может отражаться на органах и тканях организма. Данные литературы свидетельствуют, что свободнорадикальное окисление играет важную роль в процессах возникновения и развития опухоли [8]. При окислительном стрессе происходит свободнорадикальное окис-

ление различных биомолекул. Причем имеются исследования, свидетельствующие, что в первую очередь окислительной модификации подвергаются молекулы белков [3, 6, 11]. Белки плазмы, подвергшиеся окислительной деструкции, имеют длительный период распада, по сравнению с продуктами перекисного окисления липидов (ПОЛ), что делает их перспективным маркером интенсивности свободнорадикального окисления [6]. Тем не менее характер и выраженность этих процессов при раке легкого практически не изучены.

Целью работы явилось определение уровня показателей окислительной модификации бел-

ков и липидов в плазме крови больных раком легкого на различных стадиях заболевания.

Материал и методы

На базе Красноярского краевого онкологического диспансера обследовано 58 больных мужского пола, с диагнозом рак легкого, в возрасте 35–60 лет. У 20 больных раком легкого диагностирована II стадия процесса, у 20 – III стадия, у 18 – IV стадия заболевания. В качестве контроля было обследовано 18 здоровых лиц мужского пола. Кровь забиралась из локтевой вены в гепаринизированные пробирки, утром натощак, на следующий день после поступления больного в стационар. Плазма крови отделялась центрифугированием, после чего в ней проводилось определение показателей ПОЛ (диеновые конъюгаты, малоновый диальдегид) и окислительной модификации белков (ОМБ) (карбонильные производные, среднемолекулярные пептиды, битирозин, тиоловые группы).

Содержание диеновых конъюгатов (ДК) оценивали по интенсивности поглощения при длине волны 232 нм в гептановом экстракте липидов тканей [7]. Содержание малонового диальдегида (МДА) определяли по реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой, в результате которой образуется окрашенный комплекс с максимумом поглощения при длине волны 532 нм [9]. Об уровне карбонильных производных белков (КПБ) судили по реакции взаимодействия окисленных аминокислотных остатков белков с 2,4-динитрофенилгидразином с образованием 2,4-динитрофенилгидразонов, которые регистрировали спектрофотометрически при длине волны 370 нм [13]. Содержание битирозина оценивалось спектрофлуориметрически (спектрофлуориметр Aminco Bowman Series 2) при длине волны возбуждения 325 нм и при длине волны испускания 416 нм в 1/15 М фосфатном буфере, рН 7,4 [2]. О содержании среднемолекулярных пептидов (СМП) судили на основании прямой спектрометрии депротенинизированного супернатанта, полученного после осаждения белков раствором трихлоруксусной кислоты при длине волны 254 нм [4]. Определение количества восстановленных тиоловых групп белков осуществляли по взаимодействию SH-групп с 5,5'-дитио-бис-2-нитробензойной кислотой.

Оптическую плотность пробы измеряли спектрофотометрически при 412 нм.

Для всех полученных данных определяли среднее арифметическое значение (М) и ошибку средней арифметической (m). Проверку гипотезы о статистической достоверности величин исследуемых показателей несвязанных выборок проводили с помощью критерия Манна–Уитни. Статистический анализ осуществляли в пакете прикладных программ Statistica 7.0 (StatSoft Inc., 2004).

Результаты и обсуждение

У больных раком легкого (РЛ) наблюдается усиление процессов перекисного окисления липидов (рис. 1, 2). Было установлено достоверное возрастание концентрации ДК и МДА. Содержание ДК при раке легкого II стадии примерно на 97 % выше, чем в контрольной группе,

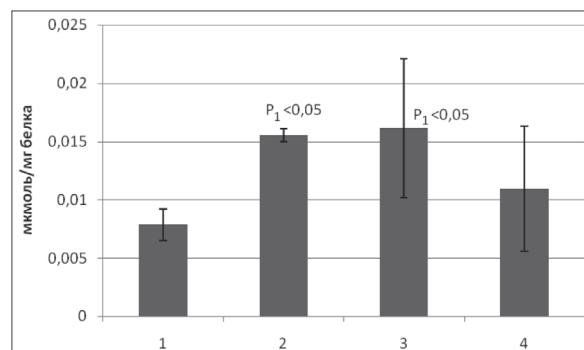


Рис. 1. Содержание диеновых конъюгатов в плазме крови больных раком легкого: 1 – контрольная группа; 2 – больные раком легкого II стадии; 3 – больные раком легкого III стадии; 3 – больные раком легкого IV стадии

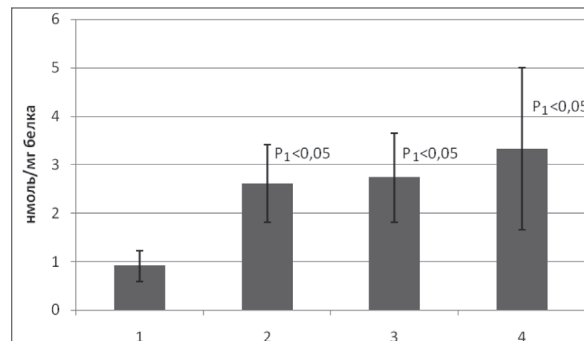


Рис. 2. Содержание МДА в плазме крови больных раком легкого: 1 – контрольная группа; 2 – больные раком легкого II стадии; 3 – больные раком легкого III стадии; 3 – больные раком легкого IV стадии

уровень МДА превышает контрольные показатели на 185 %. В дальнейшем наблюдается рост интенсивности перекисных процессов, а также увеличение разброса значений данных. При РЛ IV стадии происходит некоторое уменьшение уровня ДК, что, по всей видимости, свидетельствует о смещении равновесия в направлении образования конечных продуктов липопероксидации, таких как МДА. При этом статистически достоверные изменения выявляются только относительно контрольных показателей.

Помимо активации процессов перекисного окисления липидов, также наблюдается увеличение интенсивности окислительной модификации белков, о чем свидетельствует возрастание содержания КПБ в плазме. Дополнительно, в качестве показателя, отражающего степень фрагментации белков, исследовался уровень среднемолекулярных пептидов (таблица). При РЛ II стадии содержание КПБ возрастает на 81 %. У больных II–III стадии эти показатели несущественно отличаются друг от друга, но при IV стадии вновь происходит значительный рост уровня КПБ, он на 107 % выше, чем при III стадии. Наряду с повышением уровня КПБ в плазме крови отмечалось увеличение концентрации среднемолекулярных пептидов, высокий уровень которых является отражением степени фрагментации белков [5]. В отличие от КПБ содержание СМП возрастало при РЛ II стадии на 85 %, затем этот показатель оставался практически на неизменном уровне, незначительно снижаясь при IV стадии процесса.

Наличие окислительного стресса также подтверждается увеличением уровня битирозина и снижением содержания восстановленных тиоловых групп в белках (рис. 3, 4). Содержание

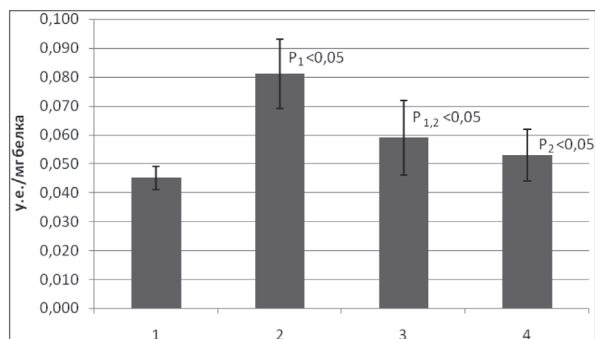


Рис. 3. Содержание битирозина в плазме крови при раке легкого: 1 – контрольная группа; 2 – больные раком легкого II стадии; 3 – больные раком легкого III стадии; 4 – больные раком легкого IV стадии

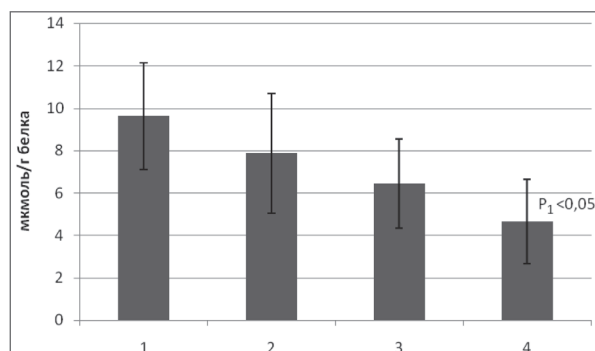


Рис. 4. Содержание тиоловых групп белков в плазме крови при раке легкого: 1 – контрольная группа; 2 – больные раком легкого II стадии; 3 – больные раком легкого III стадии; 4 – больные раком легкого IV стадии

битирозина в плазме существенно возрастает при II стадии, а затем постепенно снижается при РЛ IV стадии. Динамика изменения содержания тиоловых групп аналогична таковой для битирозина.

Изменения, происходящие в плазме, характеризуют увеличение интенсивности окисли-

Таблица

Содержание карбонильных производных белков и среднемолекулярных пептидов в плазме крови больных раком легкого

Показатели	Контрольная группа (n=18)	РЛ II стадии (n=20)	РЛ III стадии (n=20)	РЛ IV стадии (n=18)
КПБ (y.e./mg белка)	0,014 ± 0,002	0,029 ± 0,013 $p_1 < 0,05$	0,028 ± 0,011 $p_1 < 0,05$	0,058 ± 0,011 $p_{1,2,3} < 0,05$
СМП (y.e./mg белка)	0,196 ± 0,008	0,363 ± 0,064 $p_1 < 0,05$	0,361 ± 0,045 $p_1 < 0,05$	0,349 ± 0,078 $p_1 < 0,05$

Примечание: p_1 – различия статистически значимы по сравнению с показателями контрольной группы; p_2 – различия статистически значимы по сравнению с показателями при РЛ II стадии; p_3 – различия статистически значимы по сравнению с показателями при РЛ III стадии.

тельного стресса в организме. Повышенный уровень продуктов ПОЛ в плазме крови в первую очередь свидетельствует об усилении окислительной модификации липопротеинов низкой плотности, в результате чего те могут становиться цитотоксичными и создавать потенциальную угрозу организму [3]. Колебания уровней различных продуктов окислительной модификации белков имеют свои особенности, что, вероятно, связано с условиями их образования. Так, битирозин образуется, главным образом, при прямом воздействии активных форм кислорода (АФК) на белковые молекулы. В то же время образование карбонильных производных белков может осуществляться как путем прямого окисления аминокислотных остатков, так и при взаимодействии с продуктами липопероксидации (МДА, 4-гидрокси-2-ноненалем) и гликооксидации. Их содержание может служить показателем общего окислительного стресса [10, 14]. Окисление тиоловых групп в отличие от других форм окислительной модификации белков является обратимым процессом. Обратимое окисление/восстановление может защищать белки от других, более сильных повреждающих форм окислительной модификации, например образования карбонильных производных [12]. Наличием тиоловых групп обусловлены антиоксидантные свойства альбумина. Помимо этого, SH-содержащие соединения также могут вовлекаться в ферментативное восстановление фенольных антиоксидантов [1].

Полученные результаты свидетельствуют о сложном и системном характере нарушений антиоксидантной системы при раке легкого. В ходе заболевания происходят изменения всех исследованных показателей окисления белков и липидов, которые, в свою очередь, зависят от стадии патологического процесса, причем чем больше стадия, тем сильнее выражено окислительное повреждение биологических молекул. Вероятно, такая динамика окислительных процессов связана с тем, что опухоль в процессе своего роста потребляет большое количество

необходимых для этого веществ, в том числе и антиоксидантов, тем самым снижая общую антиокислительную активность крови [8]. Поскольку и содержание битирозина и тиоловых групп белков уменьшается по мере прогрессирования заболевания от II к IV стадии, можно предположить, что тиоловые группы обеспечивают защитное действие против непосредственного воздействия АФК на белки. В то же время увеличение уровня карбонильных производных при раке легкого IV стадии, по-видимому, может являться следствием усиления образования аддуктов белков с продуктами окисления других биомолекул, например липидов и углеводов [14]. Таким образом, определение различных показателей ПОЛ и ОМБ в плазме крови позволяет более полноценно охарактеризовать состояние окислительного стресса в организме больных раком легкого, что в перспективе может быть использовано и в диагностических целях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Афанасьева А.Н., Афанасьев С.Г., Ли А.А. и др. // Сибирский онкологический журнал. 2007. № 4 (24). С. 12–18.
2. Арутюнян А.В., Дубинина Е.Е., Зыбина Н.Н. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма. СПб., 2000. 103 с.
3. Болдырев А.А., Кяйваряйнен Е.И., Илюха В.А. Биомембранология. Петрозаводск, 2006. 226 с.
4. Габриэлян Н.И., Дмитриев А. А., Савостьянова О. А. и др. // Анестезиология и реаниматология. 1985. № 1. С. 36–38.
5. Дубинина Е.Е., Морозова М.Г., Леонова Н.В. и др. // Вопросы медицинской химии. 2000. Т. 46, № 4. С. 398–409.
6. Дубинина Е.Е., Пустыгина А.В. // Биомедицинская химия. 2007. Т. 53, № 4. С. 351–372.
7. Коган В.Е., Орлова О.Н., Прилшко Л.Л. // Биофизика. Итоги науки и техники / ВИНТИ АН СССР. М., 1986. Т. 18. 136 с.
8. Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К., Ланкин В.З. и др. Окислительный стресс: Патологические состояния и заболевания. Новосибирск, 2008. 284 с.
9. Стальная И.Д., Гаршивили Т.Г. // Современные методы в биохимии. 1977. С. 66–68.
10. Giulivi C., Traaseth N.J., Davies K.J.A. // Aminoacids. 2003. Vol. 25. P. 227–232.
11. Du J., Gebicki J.M. // Intern. J. Biochem. Cell Biol. 2004. Vol. 36. P. 2334–2343.
12. Kemp M., Go Y., Jones D.P. // Free Radical Biol. Med. 2008. Vol. 44. P. 921–937.
13. Levine L.R., Williams J.A., Stadtman E.R., Shacter E. // Methods in enzymology. 1994. Vol. 233. P. 346–357.
14. Zitanova I., Sumegova K., Simko M., Maruniakova A. // Clin. Biochem. 2007. Vol. 40. P. 567–570.

Поступила 31.03.09