

УДК 612-066.6:577

DOI 10.34014/2227-1848-2019-2-117-121

РЕДОКС-СТАТУС АСЦИТИЧЕСКОЙ ЖИДКОСТИ НА РАЗЛИЧНЫХ СТАДИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО РАКА ЯИЧНИКОВ

А.Ю. Федотова, Д.Р. Долгова, Т.В. Абакумова, Л.В. Полуднякова, Т.П. Генинг

ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет», г. Ульяновск, Россия

e-mail: tonechkatuzeeva@mail.ru

В России рак яичников (РЯ) занимает первое место среди причин смертности от рака гениталий. Асцитная форма РЯ оценивается как наиболее злокачественная. Состав асцита при этом определяется биологическими свойствами неоплазмы в динамике ее развития.

Целью исследования была оценка редокс-статуса асцитической жидкости на различных стадиях экспериментального РЯ.

Материалы и методы. Работа выполнена на белых беспородных крысах массой 180–200 г с перивисаемой асцитной опухолью яичников. У животных в стационарную и терминальную стадии роста опухоли отбирался асцит, в котором после удаления опухолевых клеток биохимически определяли параметры перекисного окисления липидов: диеновые конъюгаты, кетодиены, основания Шиффа, малоновый диальдегид, уровни окислительной модификации белков (346 нм – альдегидные группы нейтрального характера; 370 нм – кетонные группы нейтрального характера; 430 нм – альдегидные группы основного характера; 530 нм – кетонные группы основного характера) и компоненты антиоксидантной защиты – активность каталазы и глутатион-S-трансферазы. Полученные результаты оценивались с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни (Stata 6.0).

Результаты. В результате проведенных исследований было установлено в терминальной стадии роста опухоли значимое по сравнению с показателями в стационарной стадии снижение уровня окислительной модификации белков, снижение активности каталазы и тенденция к снижению уровня малонового диальдегида.

Заключение. Редокс-статус асцитической жидкости при экспериментальном РЯ характеризуется снижением окислительной модификации белков, тенденцией к снижению интенсивности перекисного окисления липидов и постоянной активностью каталазы и глутатион-S-трансферазы в динамике прогрессирования неоплазмы.

Ключевые слова: рак яичников, асцитическая жидкость, окислительная модификация белков, перекисное окисление липидов, антиоксидантная система.

Введение. Взаимодействие опухоли и окружающей среды представляет значительный интерес с точки зрения эволюции опухоли. Микроокружение неоплазмы и, в частности, асцит – активная зона, компоненты которой влияют на пролиферацию, ангиогенез и провизируют в опухоли геномную нестабильность. В то же время неоплазма, воздействуя на окружающие фибробласты, клетки иммунной системы, может изменять уровень окислительных процессов, в частности влиять на образование активных форм кислорода [1–3].

В России рак яичников (РЯ) занимает первое место среди причин смертности от рака гениталий [4]. Заболевание длительно про-

текает бессимптомно, в 80 % случаев диагностируется на распространенной стадии [5]. Асцитная форма РЯ оценивается как наиболее злокачественная, и создание биологического портрета опухоли даст возможность более эффективно использовать схемы терапии РЯ. Эксперимент в данной ситуации позволяет наблюдать взаимодействие неоплазмы и ее микроокружения в динамике, что невозможно в клинике.

Цель исследования. Оценка редокс-статуса асцитической жидкости на различных стадиях экспериментального РЯ.

Материалы и методы. Экспериментальные исследования проводились на белых

беспородных крысах массой 180–200 г с перевиваемой асцитной опухолью (штамм опухоли яичников (АОЯ) получен из банка штаммов РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН). Все животные содержались в стандартных условиях вивария при естественном освещении и свободном доступе к воде и корму. Были соблюдены правила гуманного обращения с животными, которые регламентированы «Правилами проведения работ и использования экспериментальных животных», утвержденными Приказом МЗ СССР № 755 от 12.08.1977, положениями Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации от 1964 г., дополненной в 1975, 1983 и 1989 гг., а также требованиями этического комитета ИМЭиФК Ульяновского государственного университета (№ 10 от 15.06.2014).

Прогрессирование данного типа опухоли проходит в 3 стадии: логарифмическая (с 4-х сут после перевивки), стационарная (с 8-х сут после перевивки), терминальная (с 13-х сут после перевивки). Асцит отбирался под эфирным наркозом на 8-е и 13-е сут после перевивки и разделялся с помощью центрифугирования на асцитическую жидкость и опухолевые клетки. Для оценки продуктов липопероксидации в асцитической жидкости оценивался уровень диеновых конъюгатов (ДК) – при $E_{232/220 \text{ нм}}$, кетодиенов (КД) – при $E_{278/220 \text{ нм}}$, оснований Шиффа

(ОШ) – при $E_{400/220 \text{ нм}}$ по методу И.А. Волчегорского [6]. Содержание ТБК-активного продукта перекисного окисления липидов (ПОЛ) – малонового диальдегида (МДА) – оценивалось в тесте с тиобарбитуровой кислотой по методу Л.И. Андреевой [7]. Уровень окислительной модификации белков (ОМБ) определялся по методу Е.Е. Дубининой [8] (при $\lambda=346 \text{ нм}$ – альдегидные группы нейтрального характера; при $\lambda=370 \text{ нм}$ – кетонные группы нейтрального характера; при $\lambda=430 \text{ нм}$ – альдегидные группы основного характера и при $\lambda=530 \text{ нм}$ – кетонные группы основного характера). Данные ОМБ пересчитывались на 1 мг белка по методу Брэдфорда [9]. Для оценки ферментативного звена антиоксидантной системы изучалась активность каталазы и глутатион-S-трансферазы (ГТ) по методу А.И. Карпищенко [10]. Для оценки достоверности различий использовался непараметрический критерий Манна–Уитни (Stata 6.0). Отличия от соответствующих показателей в стационарной стадии считались статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение. В результате проведенных исследований было установлено, что параметры ПОЛ в асцитической жидкости значимо не изменяются в терминальной стадии по сравнению со стационарной (табл. 1). Тенденцию к снижению имеет уровень МДА.

Таблица 1

Параметры ПОЛ в асцитической жидкости в динамике АОЯ крыс

Стадии РЯ	МДА, мкмоль/л	ДК, ед. опт. пл./мл	КД, ед. опт. пл./мл	ОШ, ед. опт. пл./мл
Стационарная, n=22	6,795±0,487	1,020±0,013	0,107±0,010	0,007±0,001
Терминальная, n=22	6,426±0,623	1,020±0,010	0,115±0,014	0,006±0,001

ОМБ рассматривают как ранний маркер неопластического процесса [11]. При этом показано, что белки плазматических мембран подвергаются радикальной атаке раньше, чем липиды. Активные формы кислорода фрагментируют и агрегируют белковые молекулы. В ряде исследований показано, что карбонильный стресс, возникающий при неопла-

стических процессах в крови и тканях, характеризуется повышением содержания продуктов ОМБ [12–15]. В результате проведенных нами исследований установлено статистически значимое снижение уровней карбонильных производных белков асцитической жидкости в терминальную стадию по сравнению со стационарной (табл. 2).

Таблица 2

Параметры ОМБ в асцитической жидкости в динамике АОЯ крыс, ед. опт. пл./мг белка

Стадии РЯ	λ			
	346 нм	370 нм	430 нм	530 нм
Стационарная, n=22	0,191±0,015	0,210±0,016	0,117±0,010	0,045±0,009
Терминальная, n=22	0,146±0,012*	0,161±0,014*	0,080±0,008*	0,025±0,005*

Примечание. * – данные, статистически значимо отличающиеся от соответствующих показателей в стационарной стадии ($p \leq 0,05$).

Каталаза как один из основных компонентов антиоксидантной защиты обеспечивает высокую скорость реакции окисления H_2O_2 и необходима в условиях окислительного стресса. У крыс с АОЯ активность каталазы значимо снижается (табл. 3) в терминальную стадию по сравнению со стационарной,

что представляется логичным в условиях снижения окислительного потенциала асцитической жидкости.

Активность ГТ, фермента, нейтрализующего разрушительное воздействие электрофильных соединений, не изменялась в динамике прогрессирования АОЯ (табл. 3).

Таблица 3

Параметры компонентов антиоксидантной защиты в асцитической жидкости крыс с АОЯ, ммоль/мин/л

Стадии РЯ	Каталаза	ГТ
Стационарная, n=22	0,395±0,073	0,020±0,001
Терминальная, n=22	0,240±0,054*	0,022±0,002

Примечание. * – данные, статистически значимо отличающиеся от соответствующих показателей в стационарной стадии ($p \leq 0,05$).

Заключение. Таким образом, в результате проведенных исследований нами установлено, что редокс-статус асцитической жидкости при экспериментальном РЯ характеризуется снижением окислительной модификации

белков, тенденцией к снижению интенсивности перекисного окисления липидов и постоянной активностью каталазы и глутатион-S-трансферазы в динамике прогрессирования неоплазмы.

Литература

1. *Martinez-Outschoorn U.E., Balliet R.M., Rivadeneira D.B., Chiavarina B., Pavlides S., Wang C., Whittaker-Menezes D., Daumer K.M., Lin Z., Witkiewicz A.K., Flomenberg N., Howell A., Pestell R.G., Knudsen E.S., Sotgia F., Lisanti M.P.* Oxidative stress in cancer associated fibroblasts drives tumor-stroma co-evolution: A new paradigm for understanding tumor metabolism, the field effect and genomic instability in cancer cells. *Cell Cycle*. 2010; 9 (16): 3256–3276.
2. *Catalano V., Turdo A., Di Franco S., Dieli F., Todaro M., Stassi G.* Tumor and its microenvironment: a synergistic interplay. *Semin. Cancer Biol.* 2013; 23 (6, Pt. B): 522–532.
3. *Chen F., Zhuang X., Lin L., Yu P., Wang Y., Shi Y., Hu G., Sun Y.* New horizons in tumor microenvironment biology: challenges and opportunities. *BMC Med.* 2015; 13: 45.
4. *Эмануэль Н.М., Коновалова Н.П., Дьячковская Р.Ф.* Чувствительность гетеротрансплантантов опухолей человека к спинмеченным производным рубомицина. *Экспериментальная онкология*. 1988; 10 (4): 54–59.

5. Van der Blik A.M., Borst P. Multidrug resistance. *Adv. Cancer Res.* 1989; 52: 165–203.
6. Волчегорский В.А., Налимов А.Г., Яровинский Б.Г. Сопоставление различных подходов к определению продуктов перекисного окисления липидов в гептан-изопропаноловых экстрактах крови. *Вопросы медицинской химии.* 1989; 1: 127–131.
7. Андреева Л.И., Кожемякин Л.А., Кишкун А.А. Модификация метода определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой. *Лабораторное дело.* 1988; 11: 41–43.
8. Дубинина Е.Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток. СПб.: Медицинская пресса; 2006. 400.
9. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72: 248–254.
10. Карпищенко А.И. Медицинские лабораторные технологии и диагностика. СПб.: Интермедика; 1999: 27–28.
11. Дубинина Е.Е. Окислительная модификация белков плазмы крови больных психическими расстройствами (депрессия, деперсонализация). *Вопросы медицинской химии.* 2010; 4: 389–409.
12. Жаворонок Т.В., Степовая Е.А., Петина Г.В. Участие тиосульфидной системы в регуляции окислительной модификации белков в нейтрофилах при окислительном стрессе. *Фундаментальные исследования.* 2007; 12: 383.
13. Gastegna A. Proteomic identification of oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease brain. Part I: creatine kinase BB, glutamine synthase, and ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L-1. *Free Radic. Biol. Med.* 2002; 33: 562–571.
14. Kinnula V.L., Crapo J.D. Superoxide dismutases in malignant cells and human tumors. *Free Radic. Biol. Med.* 2004; 36; 6: 718–744.
15. Генинг Т.П., Арсланова Д.Р., Абакумова Т.В., Антонеева И.И., Сидоренко Е.Г., Генинг С.О. Окислительная модификация белков и липидов в неоплазме и асцитической жидкости при экспериментальном раке яичников. *Ульяновский медико-биологический журнал.* 2012; 1: 72–75.

REDOX STATUS OF ASCITIC FLUID AT DIFFERENT STAGES OF EXPERIMENTAL OVARIAN CANCER

A.Yu. Fedotova, D.R. Dolgova, T.V. Abakumova, L.V. Poludnyakova, T.P. Gening

Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, Russia

e-mail: tonechkatuzeeva@mail.ru

In Russia, ovarian cancer (OC) is the first cause of mortality from vaginal cancer. Ascitic form of OC is considered to be the most malignant. The ascites composition is determined by the neoplasm biological properties in its development.

The aim of the study was to evaluate the redox status of ascitic fluid at various stages of experimental OC. Materials and Methods. The work was performed on white outbred rats, 180–200 g, with a transplanted ascitic ovarian tumor. Ascites was taken from animals in the stationary and terminal stages of tumor growth. After removal of tumor cells, lipid peroxidation parameters were biochemically determined in it: diene conjugates, ketodienes, Schiff bases, malondialdehyde, levels of protein oxidative modification (346 nm – neutral aldehyde groups; 370 nm – neutral ketone groups; 430 nm – basic aldehyde groups; 530 nm – basic ketones) and antioxidant defense components – catalase and glutathione-S-transferase activity. The results were evaluated by means of Mann-Whitney U test (Stata 6.0).

Results. As a result of the research conducted, the authors determined a significant reduction in the level of protein oxidative modification, a decrease in the catalase activity and a decrease in the malondialdehyde level at the terminal stage of tumor growth as compared with the stationary stage indices.

Conclusion The redox status of ascitic fluid in experimental OC is characterized by a decrease in the oxidative modification of proteins, a decrease in the intensity of lipid peroxidation and a constant catalase and glutathione-S-transferase activity in the dynamics of neoplasm progression.

Keywords: *ovarian cancer, ascitic fluid, protein oxidative modification, lipid peroxidation, antioxidant system.*

References

1. Martinez-Outschoorn U.E., Balliet R.M., Rivadeneira D.B., Chiavarina B., Pavlides S., Wang C., Whitaker-Menezes D., Daumer K.M., Lin Z., Witkiewicz A.K., Flomenberg N., Howell A., Pestell R.G., Knudsen E.S., Sotgia F., Lisanti M.P. Oxidative stress in cancer associated fibroblasts drives tumor-stroma co-evolution: A new paradigm for understanding tumor metabolism, the field effect and genomic instability in cancer cells. *Cell Cycle*. 2010; 9 (16): 3256–3276.
2. Catalano V., Turdo A., Di Franco S., Dieli F., Todaro M., Stassi G. Tumor and its microenvironment: a synergistic interplay. *Semin. Cancer Biol.* 2013; 23 (6, Pt. B): 522–532.
3. Chen F., Zhuang X., Lin L., Yu P., Wang Y., Shi Y., Hu G., Sun Y. New horizons in tumor microenvironment biology: challenges and opportunities. *BMC Med.* 2015; 13: 45.
4. Emanuel' N.M., Konovalova N.P., D'yachkovskaya R.F. Chuvstvitel'nost' getero transplantantov opukholy cheloveka k spinmechennym proizvodnym rubomitsina [Sensitivity of human tumor heterotransplants to spin-marked rubomycin derivatives]. *Ekspierimental'naya onkologiya*. 1988; 10 (4): 54–59 (in Russian).
5. Van der Bliek A.M., Borst P. Multidrug resistance. *Adv. Cancer Res.* 1989; 52: 165–203.
6. Volchegorskiy V.A., Nalimov A.G., Yarovinskiy B.G. Sopostavlenie razlichnykh podkhodov k opredeleniyu produktov perekisnogo okisleniya lipidov v heptan-izopropanolovykh ekstraktakh krovi [Comparison of different approaches to the determination of lipid peroxidation products in heptane-isopropanol blood extracts]. *Voprosy meditsinskoj khimii*. 1989; 1: 127–131 (in Russian).
7. Andreeva L.I., Kozhemyakin L.A., Kishkun A.A. Modifikatsiya metoda opredeleniya perekisey lipidov v teste s tiobarbiturovoy kislotoy [Modification of lipid peroxide determination in a test with thiobarbituric acid]. *Laboratornoe delo*. 1988; 11: 41–43 (in Russian).
8. Dubinina E.E. *Produkty metabolizma kisloroda v funktsional'noy aktivnosti kletok* [Oxygen metabolism products in cell functional activity]. St. Petersburg: Meditsinskaya pressa; 2006. 400 (in Russian).
9. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72: 248–254.
10. Karpishchenko A.I. *Meditsinskie laboratornye tekhnologii i diagnostika* [Medical laboratory technologies and diagnostics]. St. Petersburg: Intermedika; 1999: 27–28 (in Russian).
11. Dubinina E.E. Okislitel'naya modifikatsiya belkov plazmy krovi bol'nykh psikhicheskimi rasstroystvami (depressiya, depersonalizatsiya) [Oxidative modification of plasma proteins in patients with mental disorders (depression, depersonalization)]. *Voprosy meditsinskoj khimii*. 2010; 4: 389–409 (in Russian).
12. Zhavoronok T.V., Stepovaya E.A., Petina G.V. Uchastie tiosul'fidnoy sistemy v regulyatsii okislitel'noy modifikatsii belkov v neytrofilakh pri okislitel'nom stresse [Thiosulfide system in the regulation of protein oxidative modification in neutrophils under oxidative stress]. *Fundamental'nye issledovaniya*. 2007; 12: 383 (in Russian).
13. Gastegna A. Proteomic identification of oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease brain. Part I: creatine kinase BB, glutamine synthase, and ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L-1. *Free Radic. Biol. Med.* 2002; 33: 562–571.
14. Kinnula V.L., Crapo J.D. Superoxide dismutases in malignant cells and human tumors. *Free Radic. Biol. Med.* 2004; 36: 6: 718–744.
15. Gening T.P., Arslanova D.R., Abakumova T.V., Antoneeva I.I., Sidorenko E.G., Gening S.O. Okislitel'naya modifikatsiya belkov i lipidov v neoplazme i atsitsicheskoy zhidkosti pri eksperimental'nom rake yaichnikov [Oxidative modification of proteins and lipids in neoplasm and ascitic fluid in experimental ovarian cancer]. *Ul'yanovskiy mediko-biologicheskij zhurnal*. 2012; 1: 72–75 (in Russian).