

СТАН ОКИСЛЮВАЛЬНОЇ МОДИФІКАЦІЇ БІЛКІВ СИРОВАТКИ КРОВІ У ХВОРИХ НА РАК ШЛУНКА ТА ЇХ ПРОГНОСТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ

Харківський національний медичний університет (м. Харків)

*«ДУ Інститут медичної радіології ім. С. П. Григор'єва

Академії медичних наук України»

(м. Харків)

Робота виконана згідно з планом науково-дослідної роботи кафедри онкохірургії Харківської медичної академії післядипломної освіти та пріоритетною темою МОЗ України «Обґрунтування і клінічне значення до нозологічних інтегративних метаболічних механізмів пухлин шлунково-кишкового тракту», № державної реєстрації 0104U010760.

Вступ. Дослідженнями останніх років доведена роль активації системи вільнорадикального окислення та її окремих проявів – активації перекисного окислення ліпідів, окислювальної модифікації білків (ОМБ) – як неспецифічного патогенетичного ланцюга формування багатьох патологічних станів в організмі [1, 6, 7]. Посилення цих процесів призводить до порушення рівноваги між анти- та прооксидантами у бік підвищення останніх, формування оксидативного стресу, що супроводжується генералізацією активних форм кисню, які здатні порушувати структуру та функції клітинних мембран, призводити до тяжких порушень клітинного метаболізму і суттєвих змін гомеостазу [8]. При оксидативному стресі за умов дії активних форм кисню відбуваються зміни структури білкових молекул, а також фізико-хімічних і біологічних їх властивостей [11]. Продукти ОМБ можуть бути причиною вторинного пошкодження інших біомолекул [14]. Незважаючи на наявність окремих робіт, що свідчать про посилення вільнорадикальних процесів при раку шлунка, роль ОМБ у патогенезі цього захворювання до кінця не з'ясована. Доведено, що деструкція білків є надійнішим маркером окислювальних пошкоджень тканин, ніж перекисне окислення ліпідів, оскільки продукти ОМБ стабільніші, порівняно з пероксидами ліпідів, які швидко метаболізуються під дією пероксидаз і низькомолекулярних антиоксидантів [11, 14]. Рак шлунка є однією з актуальних проблем сучасної онкології. Підвищення результативності його лікування пов'язано з більш глибоким розумінням етіопатогенезу пухлинного процесу, зокрема, активності процесів нейрогуморальної та імунної регуляції, метаболічних зсувів, окислювального гомеостазу [9, 14].

Метою роботи було вивчення інтенсивності окислювальної модифікації білків у сироватці крові

хворих на рак шлунка з II, III і IV стадією пухлинного процесу та визначення їх прогностичного значення в механізмах розвитку гастроканцерогенезу.

Об'єкт і методи дослідження. Для реалізації поставленої мети було сформовано три групи хворих з підтвердженим клініко-інструментальними і гістологічними методами діагнозом – рак шлунка та локалізацією злоякісного процесу переважно в кардіальному, пілоричному і препілоричному відділах. Першу групу становило 27 хворих (19 чол. і 8 жін.) на рак шлунка II стадії, другу групу становило 34 хворих (24 чол. і 10 жін.) на рак шлунка III стадії, третю групу становило 23 хворих (12 чол. і 11 жін.) з IV стадією пухлинного процесу. Контрольну групу складала 20 практично здорових осіб (12 чол. і 8 жін.). Оцінку окислювальної модифікації білків сироватки крові проводили за вмістом карбонільних груп, накопиченням бітирозу та флуоресценцією залишків триптофану. Вміст карбонільних груп ОМБ визначали за реакцією з 2,4-динітрофенілгідразоном і утворенням похідних 2,4-динітрофенілгідразону, оптичну щільність яких реєстрували при довжині хвилі 370 нм [4]. Флуоресценцію бітирозу у сироватці крові вимірювали при довжині хвилі збудження 325 нм і довжині хвилі люмінесценції 416 нм; флуоресценцію триптофанів білків сироватки крові вивчали відповідно при 297 і 336 нм [5, 11]. Аналіз структурних змін білків сироватки крові проводили з використанням флуоресцентного зонду 1-аніліно-8-нафталінсульфонату (1,8-АНС) у концентрації 8 мкм. Спектри флуоресценції 1,8-АНС реєстрували при довжині хвилі збудження 380 нм і довжині хвилі люмінесценції 490 нм [2, 3]. Інтенсивність флуоресценції вимірювали на спектрофлуориметрі MPF-4A фірми «Хітачі» (Японія) та виражали в умовних одиницях. Оцінку інтенсивності ОМБ проводили також шляхом вимірювання фосфоресценції сироватки крові: на кварцові пластини наносили 50 мкл сироватки, висушували в термостаті при температурі 30° С протягом 20 хв. до появи твердої плівки. Потім пластини подавали у фосфороскоп, заміряли інтенсивність фосфоресценції при кімнатній температурі у режимі рахування квантів фотонів за допомогою

Динаміка показників інтенсивності процесів окислювальної модифікації білків сироватки крові

Таблиця

Показники	Група спостереження, стадія (M ± m)			
	Умовно-здорові (n=20)	РШ – II стадія (n=27)	РШ – III стадія (n=34)	РШ – IV стадія (n=23)
Карбонільні групи ОМБ (мкмоль/мг білка)	1,67 ± 0,14	2,42 ± 0,19*	3,96 ± 0,40*	4,57 ± 0,38*
Бітирозин (ум. од.)	0,83 ± 0,07	1,73 ± 0,10*	2,32 ± 0,20*	2,74 ± 0,31*
Триптофаніли (ум. од.)	11,94 ± 1,12	18,34 ± 1,33*	23,16 ± 2,07	29,35 ± 2,15*
Інтенсивність флуоресценції 1,8-АНС (ум. од.)	30,1 ± 2,8	22,4 ± 2,0*	12,7 ± 1,1*	7,4 ± 0,83*
Інтенсивність фосфоресценції (імп/с) λ ₃₆ 404 нм	508,3 ± 39,4	1826,8 ± 66,4	1943,6 ± 58,7	2012,6 ± 70,3

Примітка: * різниця вірогідна p < 0,05.

лічильника СБС-2. Статистичний аналіз отриманих результатів було проведено за допомогою дисперсійного аналізу, з використанням коефіцієнта Стьюдента, кореляції та регресії [10].

Результати досліджень та їх обговорення. Результати дослідження показали, що рівень карбонільних груп ОМБ суттєво переважав показники контролю на 44,9%; 137,1% і 173,4%, бітирозину – на 108,4%; 179,5% і 230,12%, триптофанілів – на 53,6%; 93,9% і 145,8%, інтенсивності фосфоресценції – на 259%; 282,3% і 295,94% на фоні зниження інтенсивності флуоресценції 1,8-АНС на 25,59%; 57,8% і 75,42%, відповідно у хворих при II, III і IV стадіях раку шлунка (**табл.**). Бітирозин утворюється у ході одноелектронного окислення тирозину, коли виникаючий довготривалий тирозин-радикал при взаємодії з таким же радикалом утворює бітирозинові зшивки.

Підвищення рівня бітирозину у сироватці крові та тканинах вважають найбільш надійним маркером ОМБ тому, що він не утилізується протеїназами, є хімічно стійкою сполукою на відміну від інших продуктів ОМБ [12, 13]. Крім того, у хворих пацієнтів виявлено статистично достовірне підвищення вмісту триптофанілів, відповідно на 5,6%; 9,9% і 145,8% при II, III і IV стадіях хвороби у порівнянні з групою контролю. Метод фосфоресценції, результати якого добре співвідносяться з результатами електронного парамагнітного резонансу, дозволяє оцінити окислювальну модифікацію білків з високою точністю. Так, у хворих виявлено статистично достовірне зростання, порівняно з контролем, інтенсивності фосфоресценції сироватки крові на 259%; 282,3% і 295,94% відповідно при II, III і IV стадії пухлинного процесу. Отримані дані свідчать, що у хворих на рак шлунка в сироватці крові зростає кількість молекул, які перебувають у триплетному збуджуючому стані.

Ці молекули є дуже реакційно здатними, мають більш тривалий час існування, після випромінювання переходять на низький синглетний енергетичний рівень. Результати реєстрації інтенсивності фосфоресценції підтверджують наявність конформаційних змін білкових молекул сироватки крові. Крім того, зростання у довгохвильовій спектральній області збудження кількості молекул у триплетному стані може свідчити про роз'єднання окисного фосфорилування та тканинного дихання, що супроводжується розсіюванням значної кількості енергії у вигляді тепла в організмі хворих на рак шлунка, особливо у випадку хвороби з IV стадією пухлинного процесу. Ці дані дозволяють зробити припущення, що в основі патогенеза рака шлунка лежать структурно-метаболичні порушення енергетичного обміну, які пов'язані з функціонуванням мітохондріального електронно-транспортного дихального ланцюга біологічного окислення речовин.

Вивчення інтенсивності флуоресценції зонда 1,8-АНС ставило за мету отримання інформації щодо змін конформації білків, їх функціональної активності. Відомо, що інтенсивність світіння 1,8-АНС визначається кількістю та локалізацією центрів зв'язування зонда в білковій молекулі. У всіх хворих пацієнтів спостерігалось достовірне зниження інтенсивності флуоресценції 1,8-АНС, що також вказує на наявність конформаційних змін білків сироватки крові у хворих на рак шлунка. Інтенсивність флуоресценції 1,8-АНС знижувалась на 25,59%; 57,81% і 75,42% відповідно при II, III і IV стадіях пухлинного процесу. Зниження інтенсивності світіння зонда 1,8-АНС може бути обумовлено як виникненням на поверхні окисленого білка негативно заряджених карбоксильних і карбонільних груп (пооява яких знижує ступінь зв'язування зонда з білком), так і гасінням його флуоресценції продуктами переокислення ліпідів і білків [2, 3].

Висновки. Таким чином, отримані результати свідчать, що розвиток пухлинного процесу у хворих на рак супроводжується інтенсифікацією окислювальної модифікації білків сироватки крові та їх конформаційними змінами, в наслідок активації вільнорадикальних процесів і розвитку молекулярної патології, яка є одним із основних ланцюгів в механізмах розвитку рака шлунка. Досліджувані показники ОМБ, бітирозину, триптофанілів можна використати як ранні маркери мембранної патології в онкологічних хворих, що тісно поєднані з тяжкістю і стадією розвитку гастроантерогенеза.

Перспективи подальших досліджень. У подальшій роботі ми плануємо дослідження стану нейроендокринної системи у хворих на гастроантерогенез.

Література

1. Бочкарева Н. В. Антиоксидантная система при предопухолевых заболеваниях и раке желудка / Н. В. Бочкарева, И. В. Кондакова, Л. А. Коломиец // Рос. онкол. журнал. – 1999. – № 1. – С. 14-17.
2. Владимиров Ю. А. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран / Ю. А. Владимиров, Г. Е. Добрецов. – М.: Наука, 1989. – 320 с.
3. Добрецов Г. Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов / Г. Е. Добрецов. – М.: Наука, 1989. – 274 с.
4. Дубинина Е. Е. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод ее определения / Е. Е. Дубинина, С. О. Бурмистров, Д. А. Ходов [и др.] // Вопросы медицинской химии. – 1995. – Т. 41, № 1. – С. 24-26.
5. Дубинина Е. Е. Окислительная модификация белков: окисление триптофана и образование в очищенных белках с использованием системы Фентона / Е. Е. Дубинина, С. В. Гавровская, Е. В. Кузьмич // Биохимия. – 2002. – Т. 67. – С. 413-421.
6. Зенков Н. К. Окислительный стресс: Биохимический и патофизиологический аспекты / Н. К. Зенков, В. З. Ланкин, Е. Б. Меньшикова. – М.: Наука, 2001. – 343 с.
7. Пасечник И. Н. Окислительный стресс и критические состояния у хирургических больных / И. Н. Пасечник // Вестник интенсивной терапии. – 2004. – № 3. – С. 27-31.
8. Саприн А. Н. Окислительный стресс и его роль в механизмах апоптоза и развития патологических процессов / А. Н. Саприн, Е. В. Калинина // Успехи биологической химии. – 1999. – Т. 39. – С. 289-326.
9. Седов В. М. Рак желудка / В. М. Седов, А. Н. Яицкий, И. Н. Данилов. – СПб: Издательство «Человек», 2009. – 232 с.
10. Стентон Г. Медико-биологическая статистика / Г. Стентон; [пер. с англ.]. – М.: Практика, 1998. – 459 с.
11. Davies K. J. Protein damage and degradation by oxygen radicals. General aspects / K. J. Davies // J. Biol. Chem. – 1987. – Vol. 262, № 20. – P. 9895-9901.
12. Di Marco T. Current analytical methods for the detection of dityrosine, a biomarker of oxidative stress, in biological samples / T. Di Marco, C. Giulivi // Mass. Spectrom. Rev. – 2007. – Vol. 26, № 1. – P. 108-120.
13. Huggins T. G. Formation of o-tyrosine and dityrosine in proteins during radiolytic and metal-catalyzed oxidation / T. G. Huggins, M. C. Wells-Knecht, N. A. Detorie // J. Biol. Chem. – 1993. – Vol. 15, № 17. – P. 12341-12347.
14. Squier T. C. Oxidative stress and protein aggregation during biological aging / T. C. Squier // Exp. Gerontol. – 2001. – Vol. 36, № 9. – P. 1539-1550.

УДК 577. 112. 825/. 826:616. 33-006. 6-037

СТАН ОКИСЛЮВАЛЬНОЇ МОДИФІКАЦІЇ БІЛКІВ СИРОВАТКИ КРОВІ У ХВОРИХ НА РАК ШЛУНКА ТА ЇХ ПРОГНОСТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ

Васильєва І. М., Шевченко О. О., Красносельський М. В Жуков В. І., Богдан Ю. А.

Резюме. Вивчено інтенсивність окислювальної модифікації білків у сироватці крові хворих на рак шлунка з II, III і IV стадією пухлинного процесу. Результати дослідження показали, що у хворих при II, III і IV стадіях раку шлунка суттєво переважали показники по відношенню до контролю – карбонільних груп ОМБ, бітирозин, триптофанілі, інтенсивність фосфоресценції на фоні зниження інтенсивності флуоресценції 1,8-АНС. Отримані результати свідчать, що розвиток пухлинного процесу у хворих на рак супроводжується інтенсифікацією окислювальної модифікації білків сироватки крові та їх конформаційними змінами, в наслідок активації вільнорадикальних процесів і розвитку молекулярної патології, яка є одним із основних ланцюгів в механізмах розвитку рака шлунка.

Ключові слова. Рак шлунка, флуорисценція, фосфоресценція, бітирозин.

УДК 577. 112. 825/. 826:616. 33-006. 6-037

СОСТОЯНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ МОДИФИКАЦИИ БЕЛКОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЖЕЛУДКА И ИХ ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Васильєва И. М., Шевченко Е. А., Красносельский Н. В., Жуков В. И., Богдан Ю. А.

Резюме. Изучили интенсивность окислительной модификации белков в сыворотке крови больных раком желудка с II, III и IV стадией опухолевого процесса. Результаты исследования показали, что у больных при II, III и IV стадиях рака желудка существенно преобладали показатели по отношению к контролю – карбонильных групп ОМБ, битиروزина, триптофанила, интенсивность фосфоресценции на фоне снижения интенсивности флуоресценции 1,8-АНС. Полученные результаты свидетельствуют, что развитие опухолевого процесса у больных раком сопровождается интенсификацией окислительной модификации белков сыворотки крови и их конформационными изменениями, в результате активации свободнорадикальных процессов и развития молекулярной патологии, которая является одним из основных цепей в механизмах развития рака желудка.

Ключевые слова. Рак желудка, флуорисценция, фосфоресценция, битирозин.

UDC 577. 112. 825/. 826:616. 33-006. 6-037

STATE OF BLOOD SERUM PROTEINS OXIDATIVE MODIFICATION OF PATIENTS WITH GASTRIC CANCER AND ITS PROGNOSTIC SIGNIFICANCE

Vasylyeva I. M., Shevchenko E. A., Krasnoselskey N. V., Zhukov V. I., Bogdan Yu. A.

Abstract. In oxidative stress the action of reactive oxygen species leads to changes in protein molecule structure and also physical, chemical and biological properties.

Products of protein oxidative modification (POM) can cause secondary damage to other biomolecules. Despite the existence of some investigations that suggest the enhancement of free radical processes in gastric cancer, the role of POM in the pathogenesis of this disease is not fully understood. For realization of the chosen task three groups of patients with histologically confirmed diagnosis of stomach cancer and malignancy localized mainly in the cardiac, pyloric and prepyloric regions were formed. The 1st group consisted of 27 patients (19 males, 8 females) with II stage of tumor development; the 2nd group included 34 patients (24 males, 10 females) with III stage of pathological process; the 3rd group consisted of 23 patients (12 males, 11 females) with IV stage of gastric cancer; the 4th group included 20 patients (12 males, 8 females) with IV stage of pathological process. The control group included 20 healthy individuals (12 males, 8 females). The evaluation of blood serum POM was performed by determination of carbonyl group content, accumulation of bityrosine and fluorescence of tryptophan residues.

The content of POM carbonyl groups was determined by reaction with 2,4-dinitrophenylhydrosone and the formation of derivatives of 2,4-dinitrophenylhydrosone, which optical density was registered at a wavelength of 370 nm. Fluorescence of bityrosine in serum was measured at a wavelength of 325 nm and excitation wavelength of 416 nm luminescence; fluorescence of blood serum proteins tryptophanlys was studied, respectively, at 297 and 336 nm. The intensity of POM in the serum of patients with II, III i IV stage of gastric cancer was studied. The results showed that patients with II, III i IV cancers of the gastric cancer higher indices compared to control group-carbonyl groups of POM, bityrosine, tryptophanlys, phosphorescence intensity and decreased fluorescence of 1,8-ANS. Free radical oxidation of proteins is accompanied by the formation of various amino acid derivatives such as modified residues of tryptophan and tyrosine, the content of which can also be used to evaluate the MOB in various pathological conditions. Increased bityrosine level in serum and tissues is considered as the most reliable marker of MOB that it is not utilized by proteases and it is chemically stable compound, unlike other products of MOB. These results indicate that the development of oncologic process in patients with cancer is accompanied by intensification of oxidative modification of serum proteins and their conformational changes that result in the activation of free radical processes and development of molecular pathology, which is one of the major chains in the mechanisms of gastric cancer development.

Keywords: gastric cancer, fluorescence, phosphorescence, bityrosine.

Рецензент – проф. Непорада К. С.

Стаття надійшла 2. 12. 2014 р.