УДК 612.015: 618.16-006.6- 021.3-036.66-036.87

ИССЛЕДОВАНИЕ СОСТОЯНИЯ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ВУЛЬВЫ

Нородо Г.А., Горошинская И.А., Иванова В.А., Сурикова Е.И., Качесова П.А., Шалашная Е.В., Нородо Е.А., Немашкалова Л.А., Леонова А.В.

ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, Ростов-на-Дону, e-mail: rnioi@list.ru

Проведен сравнительный анализ интенсивности окислительных процессов и состояния антиоксидантной системы крови у 71 больной раком вульвы в возрасте 37 – 87 лет I-IV стадии заболевания, из которых у 30 был выявлен первичный рак, у 21 – рецидив заболевания и 20 находились в третьей клинической группе (состояние ремиссии). В плазме крови исследованы интенсивность хемилюминесценции, активность каталазы, церулоплазмина, содержание продуктов пероксидации липидов и белков. При достижении ремиссии происходит снижение интенсивности свободно-радикальных процессов и перекисного окисления липидов, восстановление структурно-функционального состояния мембран эритроцитов, при рецидивировании отмечается повышение активности каталазы, увеличение содержания церулоплазмина, снижение активности супероксиддисмутазы и усиление активности глутатионпероксидазы.

Ключевые слова: рак вульвы, ремиссия, рецидив, свободно-радикальное окисление, антиоксидантная система, окислительная модификация белков

STUDY OF LIPID PEROXIDATION STATUS IN PATIENTS WITH VULVAR CANCER

Nerodo G.A., Goroshinskaya I.A., Ivanova V.A., Surikova E.I., Kachesova P.A., Shalashnaya E.V., Nerodo E.A., Nemashkalova L.A., Leonova A.V.

Rostov Research Oncological Institute of Ministry of Health of the Russian Federation, Rostov-on-Don, e-mail: rnioi@list.ru

Comparative analysis of oxidative processes' intensity and of the blood antioxidant system condition in 71 patients with stage I-IV vulvar cancer aged 37-87 years was made. 30 patients were diagnosed with primary cancer, 21 had a relapse and 20 were in the third clinical group (state of remission). Chemiluminescence intensity, catalase and ceruloplasmin activity, content of lipid and protein peroxidation products were studied in blood plasma. Decrease of intensity of free radical processes and lipid peroxidation, restoration of structural and functional condition of erythrocyte membranes take place in remission, while activity of catalase raise, increase of ceruloplasmin content, decrease in activity of superoxide dismutase and increase in activity of glutathione peroxidase are recorded in relapses.

Keywords: vulvar cancer, remission, relapse, free radical oxidation, antioxidant system, oxidative modification of proteins

Рак вульвы является заболеванием весьма агрессивным, так как в силу своей анатомо-топографической особенности часто рецидивирует и рано метастазирует. По данным литературы частота рецидивирования рака вульвы составляет от 30% до 60%. Несмотря на визуальную доступность органа к осмотру более половины больных поступают для лечения с III-IVстадиями заболевания, что затрудняет возможность проведения адекватной терапии, в связи с чем имеется низкая эффективность лечения и 5-летняя выживаемость больных раком вульвы не превышает 50% [3, 8, 10].

Патогенетическая роль свободнорадикальных процессов в возникновении и развитии онкозаболеваний в настоящее время общепризнана. Известно, что на разных этапах злокачественной прогрессии происходят фазные изменения свободнорадикального окисления и антиокислительной активности как в самой опухоли, так и в других органах и тканях, в первую очередь в крови. В связи с этим, исследование окислительного метаболизма в крови больных раком вульвы может дать дополнительную информацию об особенностях функционального состояния организма в зависимости от клинического течения заболевания [6, 7, 12].

Цель исследования. Провести сравнительное исследование интенсивности свбоднорадикального окисления и активности антиоксидантной системы защиты в крови больных раком вульвы на различных этапах развития данной патологии (первичный рак, состояние ремиссии и рецидив заболевания).

Материалы и методы исследования

Исследование состояния свободнорадикальных окислительных процессов в крови было проведено у 71 женщины раком вульвы I–IV стадии (I –22%, II – 62%, III –15%, IV –1%) в возрасте от 37 до 87 лет (средний возраст составил 66,7±1,3 лет, 88% женщин находились в возрасте 51–80 лет) проходивших лечение в стационаре и находящихся на мониторинге

в ФГБУ «РНИОИ» Минздрава РФ. Из них на момент обследования у 30 был выявлен первичный рак вульвы, у 21 – рецидив рака вульвы, 20 находились в третьей клинической группе в длительной ремиссии – от 3 до 13 лет. Контрольную группу (группу доноров) составили 30 женщин без онкопатологии в возрасте от 34 до 73 лет (средний возраст 58,4±2,7 лет).

Для оценки интенсивности свободнорадикального окисления в плазме крови исследовали светосумму быстрой вспышки перекись-индуцированной люминолзависимой хемилюминесценции (ХЛ) [11], содержание продуктов реакции с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-активных соединений) в пересчете на концентрацию малонового диальдегида (МДА), содержание карбонильных производных аминокислотных остатков, характеризующих окислительную модификацию белков (ОМБ), по методу R.L. Levin в модификации Е.Е. Дубининой. Индуцированную ОМБ стимулировали реактивом Фентона. Продукты реакции регистрировали спектрофотометрически при λ 370 нм. Состояние ферментативного звена антиоксидантной системы оценивали в плазме и в эритроцитах крови, определяя активность ферментов: каталазы, супероксиддисмутазы СОД, глутатионпероксидазы ГПО [1,5]. Структурно-функциональное состояние мембран эритроцитов оценивали с использованием метода флуоресцентных зондов [4]. Содержание церулоплазмина определяли на биохимическом анализаторе COBAS INTEGRA 400 (Roche) иммунотурбидиметрическим методом.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета программ Statistika 6.0, используя критерии Стьюдента и Вилкоксона-Манна-Уитни. Различия считали статистически достоверными при $p<0,05$ или имеющими тенденцию к достоверности при $0,1>p>0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

При изучении окислительного метаболизма в плазме крови больных раком вульвы было обнаружено, что светосумма перекись-индуцированной люминолзависимой хемилюминесценции, отражающей интенсивность генерации супероксид-анион радикала ($O_2^{\cdot-}$) и гидроксильного радикала ($HO^{\cdot}$) существенно превышала норму (табл. 1).

Таблица 1

Состояние свободнорадикальных процессов и антиоксидантной системы в плазме крови больных раком вульвы

Показатель	Группа			
	Контрольная (доноры) n=30	Первичный рак вульвы n=30	3 клиническая группа n=20	Рецидив n=21
Каталаза, мкМ H_2O_2/мин.	34,76±2,35	48,58±2,72 $p_1<0,001$	52,31±4,9 $p_1<0,001$	47,98±3,59 $p_1<0,01$
МДА, нМ/мл плазмы	290,8±27,3	581,8±46,6 $p_1<0,001$	450,1±43,3 $p_1<0,001$	623,0±61,5 $p_1<0,001$ $p_3<0,05$
Церулоплазмин, г/л	0,295±0,023	0,340±0,027	0,301±0,025	0,358±0,025 $0,1>p_1>0,05$
Светосумма хемилюминесценции плазмы крови, имп./6 сек.	3950,4±375,2	11014,7±1576,8 $p_1<0,001$ $p_3<0,01$	5812,5±603,4 $p_1<0,01$	12364,8±1999,0 $p_1<0,001$ $p_3<0,01$
ОМБ 370 нмспонт., мкМ/мг белка	23,58±2,39	28,24±2,34	20,91±1,89	25,86±2,34
ОМБ 370 нм инд., мкМ/мг белка	1080,0±95,1	939,7±42,2 $p_3<0,05$	698,6±57,9 $p_1<0,01$ $p_2<0,05$	910,01±69,71 $p_3<0,05$

Примечание. достоверность различий между группами: p_1 – по сравнению с контрольной группой, p_2 – по сравнению с группой с первичным раком вульвы, p_3 – по сравнению с 3 клинической группой.

У больных первичным раком вульвы этот показатель был выше по сравнению с уровнем доноров в 2,8 раза, а у больных с рецидивом – в 3,1 раза ($p<0,001$). При этом следует отметить, что значение данного показателя у больных 3 клинической группы хотя и превышало контрольные значения в 1,5 раза, но было значительно ниже, чем у больных первичным раком вульвы и с рецидивом в 1,9 и 2,1 раза соответственно. Следовательно, рецидивирование рака вульвы происходит на фоне интенсификации процессов генерации свободных радикалов в плазме крови.

Защиту от повреждающего действия активных форм кислорода осуществляют в первую очередь ферменты-антиоксиданты. У всех обследованных больных раком вульвы отмечено увеличение активности каталазы: у больных с первичным раком

вульвы и рецидивом на 39,8 и 38,0% по сравнению с контролем, а у больных 3 клинической группы – на 50,5% (табл. 1). Мы полагаем, что активация этого антиоксидантного фермента происходит в ответ на избыточную продукцию свободных радикалов в плазме крови больных раком вульвы и носит компенсаторный характер. Содержание основного антиоксиданта плазмы крови церулоплазмина было повышено на 21,4% только у больных с рецидивами рака вульвы. В связи с тем, что основными функциями церулоплазмина являются регулирование обмена меди в крови и других тканях, а также участие в иммобилизации сывороточного железа [7], такая картина может свидетельствовать об активации метаболизма меди и железа, и, по всей видимости, способствует развитию рецидива.

Однако, несмотря на данный факт, исследование интенсивности процессов перекисного окисления липидов в плазме крови выявило их активацию во всех исследуемых группах больных раком вульвы, что проявилось в повышении содержания МДА. У больных с первичным раком вульвы значения данного показателя в 2 раза превышали соответствующие величины контрольной группы, а у больных с рецидивом были в 2,1 раза выше относительно нормы и на 38% по сравнению со значениями у больных 3 клинической группы. Следует отметить, что у больных в ремиссии прирост содержания МДА был наименьшим – на 54% выше уровня доноров.

В то же время изучение перекисного окисления белков по уровню продуктов окисления белковых молекул плазмы крови – карбонильных производных не выявило достоверных изменений в содержании спонтанно окисленных аминокислотных остатков. Полученные нами результаты могут быть обусловлены активацией каталазы, о чём в литературе имеются данные, указывающие на сильную обратную корреляцию между накоплением карбонильных групп и активностью каталазы [13].

Исследование металлкатализируемой ОМБ выявило достоверное снижение уровня карбонильных производных белков у больных 3 клинической группы как по сравнению с уровнем у доноров, так и у больных первичным раком вульвы и с рецидивом – на 35,3, 25,7 и 23,2% соответственно (табл. 1). Поскольку уровень металлкатализируемой ОМБ рассматривается как величина, по которой можно судить о количестве субстрата окисления (доступных легко окисляемых групп) и возможности его вовлечения в этот процесс (доступных сайтов связывания ионов металлов) и, следовательно, об устойчивости системы к оксидативному стрессу [2,14], то более низкое значение показателя металлкатализируемого ОМБ у больных 3 клинической группы свидетельствует о меньшей окисляемости белков и большей устойчивости к окислительному повреждению, что в свою очередь может являться следствием конформационных изменений белковых молекул у больных этой группы.

Результаты исследования состояния антиоксидантной системы в эритроцитах крови больных раком вульвы представлены в табл. 2.

Таблица 2

Состояние антиоксидантной системы в эритроцитах крови больных раком вульвы

Показатель	Группа			
	Контрольная (доноры) n=30	Первичный рак вульвы n=30	3 клиническая группа n=20	Рецидив n=21
СОД, ед. актив./мг Hb	500,8±16,4	423,4±21,8 p_1<0,01	424,2±28,9 p_1<0,05	410,6±18,2 p_1<0,001
Каталаза, мкМ H_2O_2/мин.×мгHb	135,5±4,1	128,5±6,0	126,5±4,8	129,3±8,5
ГПО, МЕ/мг Hb	243,5±23,0	369,0±24,1 p_1<0,001	349,3±29,5 p_1<0,05	364,1±24,8 p_1<0,001
СОД/Каталаза	3,75±0,12	3,29±0,17	3,30±0,16	3,12±0,22
СОД/ГПО	2,50±0,23	1,10±0,08 p_1<0,001	1,07±0,09 p_1<0,001	1,33±0,19 p_1<0,01
Каталаза/ГПО	0,726±0,092	0,363±0,029 p_1<0,01	0,371±0,030 p_1<0,001	0,380±0,041 p_1<0,05
МДА, нМ/мл 1% гемолизата	521,0±33,9	755,0±70,7 p_1<0,05	519,4±41,3 p_2<0,01	747,3±72,8 p_1<0,01 p_3<0,01

Примечание. достоверность различий между группами: p_1 – по сравнению с контрольной группой, p_2 – по сравнению с группой с первичным раком вульвы, p_3 – по сравнению с 3 клинической группой.

Было выявлено снижение активности СОД у больных раком вульвы: в группе первичных больных на 15,4%, у больных 3 клинической группы на 15,3%, у больных с рецидивом–на18,0% по сравнению с уровнем в контроле ($p<0,05$–$p<0,001$). Активность каталазы, функционирующей в каскаде с СОД, во всех группах обследованных больных достоверно не отличалась от значений в группе здоровых женщин. В отличие от каталазы активность другого перекись устраняющего фермента – ГПО во всех группах больных раком вульвы была достоверно выше, чем в группе доноров: у первичных больных на 51,5%, у больных 3 клинической группы на 43,4%, у больных с рецидивом на 49,5%.

Анализ динамики коэффициентов, характеризующих сбалансированность работы антиоксидантных ферментов эритроцитов, показал, что, несмотря на снижение активности СОД, достоверных изменений значений коэффициента СОД/Каталаза во всех группах больных выявлено не было, что свидетельствует о стабильности в работе каскада ферментов первой линии антиоксидантной защиты. При этом происходило достоверное снижение значения коэффициентов СОД/ГПО и Каталаза/ГПО во всех группах больных по сравнению с уровнем у здоровых женщин: у первичных больных раком вульвы на 56,0 и 50,0%, соответственно, в 3 клинической группе на 57,2 и 48,9%, в группе с рецидивом на 46,8 и 47,6% (за счет повышения активности ГПО), что свидетельствует о несбалансированном функционировании данных ферментов и может привести к активации процессов ПОЛ.

Действительно, было выявлено увеличение содержания МДА (продукта перекисного окисления липидов) в эритроцитах первичных больных и больных с рецидивом рака вульвы: в среднем на 43–45% по сравнению с уровнем в контроле и по сравнению с уровнем в группе с ремиссией ($p<0,05$–$p<0,01$) (табл. 2).

Известно, что основная роль в защите эритроцитов от действия активных форм кислорода как в норме, так и при развитии окислительного стресса, принадлежит ферментам первой линии антиоксидантной защиты, снижение активности которых, на фоне усиления работы ГПО, может служить показателем низкой резистентности эритроцитарных мембран к переокислению. При исследовании состояния мембран эритроцитов у больных раком вульвы было обнаружено увеличение их текучести по сравнению с уровнем у доноров (табл. 3). У больных первичным раком вульвы отмечено увеличение текучести мембран в липидном бислое на 19,7% по сравнению с контрольной группой ($p<0,05$). У больных с первичным процессом текучесть мембран эритроцитов увеличивалась не только в липидном бислое, но и в зоне белок-липидных контактов на 17,9 и 18,0%, соответственно ($p<0,05$). В группе больных с рецидивом увеличение данного показателя было максимально выраженным среди всех больных раком вульвы: увеличение составило 22,2 и 30,2%, соответственно, в зоне белок-липидных контактов и в липидном бислое ($p<0,05$–$p<0,01$).

Таблица 3

Структурно-функциональное состояние мембран эритроцитов крови больных раком вульвы, у.е. опт.плотности

Группа	Текучесть мембран эритроцитов		Полярность	Погруженность
	Белок-липидные контакты	Липидный бислой		
Контрольная группа n=30	0,442±0,024	0,305±0,017	1,423±0,014	0,198±0,008
Первичный рак вульвы n=30	0,521±0,028 $0,1>p_1>0,05$	0,365±0,013 $p_1<0,05$	1,454±0,012	0,227±0,014 $p_1<0,05$
3 клиническая группа n=20	0,497±0,022	0,360±0,016$p_1<0,05$	1,456±0,014	0,194±0,018 $p_2<0,05$
Рецидив n=21	0,540±0,031$p_1<0,05$	0,397±0,026$p_1<0,01$	1,483±0,017$p_1<0,05$	0,232±0,015 $p_1<0,05$ $p_3<0,05$

Примечание. достоверность различий между группами: p_1 – по сравнению с контрольной группой, p_2 – по сравнению с группой с первичным раком вульвы, p_3 – по сравнению с 3 клинической группой.

Надо отметить, что кроме текучести мембран эритроцитов, постепенно нарастала их полярность, достигая у больных с рецидивом рака вульвы хоть и незначительного, но достоверного увеличения на 4,2% ($p<0,05$).

Отмечено достоверное изменение показателя погруженности белков в липидный матрикс мембран: у больных первичным раком вульвы данный показатель был достоверно выше значений у здоровых женщин на 14,6%, ($p<0,05$), у больных 3 клинической группы не отличался от нормы, а у больных с рецидивом отмечалось возрастание погруженности белков на 17,2% по сравнению с уровнем контрольной группы и на 19,6% по сравнению со значениями в 3 клинической группе ($p<0,05$).

Известно, что текучесть характеризует способность мембран реагировать на происходящие в организме нарушения, в том числе и на развитие злокачественного процесса. Причиной увеличения текучести липидного бислоя может стать усиление процессов свободнорадикального окисления липидов мембран, их взаимодействие с продуктами ПОЛ, изменение липидного состава мембран. Поскольку липиды мембран формируют среду для функционирования мембранных белков, то нарушение структуры липидного бислоя приводит к нарушению конформации связанных с ним белков, повышению их агрегации или фрагментации, что способствует увеличению текучести в зоне белок-липидных контактов, погруженности белков в липидный матрикс и, как следствие, снижению их функциональных возможностей, в том числе рецепторного аппарата [9].

При индивидуальном анализе погруженности белков в липидный матрикс в эритроцитах крови больных 3 клинической группы, находившихся на клиническом наблюдении, выяснилось, что увеличение данного показателя по сравнению со значением в предыдущей точке мониторинга предшествует клиническому проявлению рецидива рака вульвы.

Заключение

Таким образом, сравнительное исследование свободнорадикальных окислительных процессов в крови больных раком вульвы показало, что при достижении длительной ремиссии происходит снижение интенсивности свободнорадикальных процессов и перекисного окисления липидов, восстановление структурно-функционального состояния мембран эритроцитов.

При рецидивировании рака вульвы происходят нарушения метаболизма, подобные тем, что наблюдаются при первичном процессе. Отмечается усиление интенсивности генерации свободных радикалов в плазме крови, несбалансированность в работе антиоксидантных ферментов, что проявляется повышением активности каталазы и увеличением содержания церулоплазмина в плазме, снижением активности супероксиддисмутазы и существенным усилением активности глутатионпероксидазы в эритроцитах. Однако это не приводит к компенсации процессов липопероксидации, о чем свидетельствует значительное увеличение содержания продуктов перекисного окисления липидов, нарушения структурно-функционального состояния мембран эритроцитов.

Список литературы

1. Арутюнян А.В., Дубинина Е.Е., Зыбина Н.Н. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма // Методические рекомендации. СПб, 2000. – 104 с.

2. Арчаков А.И., Мохосеев И.М., Модификация белков активными формами кислорода и их распад // Биохимия. – 1989. – Т.54. – Вып.2. – С.179-186.

3. Ашрафян Л.А., Харченко Н.В., Киселёв В.И., Свешников П.Г. Рак вульвы: этиопатогеническая концепция. – М.: Практическая медицина, 2006. – 192 с.

4. Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов. – М.: Наука, 1989. – 276 с.

5. Камышников В.С., ред. Методы клинических лабораторных исследований. 6-е изд. – М.: МЕДпресс-информ, 2013. – 736 с.

6. Лущак В.И. Окислительный стресс и механизмы защиты от него у бактерий. Обзор // Биохимия. – 2001. – Т.66. – Вып. 5. – С. 592-609.

7. Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К., Ланкин В.З., Бондарь И.А., Труфакин В.А. Окислительный стресс: Патологические состояния и заболевания. – М.: АРТА, 2008. 284 с.

8. Неродо Г.А., Иванова В.А., Неродо Е.А. Сроки возникновения рецидивов рака вульвы и их прогностические факторы // Современные проблемы науки и образования. – 2013. -№1. – URL:www.science-education.ru/107-8442 (дата обращения: 14.02.2014).

9. Новицкий В.В., Степовая Е.А., Гольдберг В.Е., Колосова М.В. Структурно-метаболический статус и функциональное состояние эритроцитов у онкологических больных//Паллиативная медицина и реабилитация. – 2000. – № 1-2. – С. 80.

10. Турчак А.В. Рецидивы рака вульвы и результаты их терапии (20 летний опыт) // Онкология. – 2009. – Т.11. – №4. – С.312-313.

11. Шестаков В.А., Бойчевская Н.О., Шерстнев М.П. Хемилюминесценция плазмы крови в присутствии перекиси водорода // Вопр. мед. химии. 1979. Т.25. Вып.2.С.132-137.

12. Barrera G. Oxidative Stress and lipid Peroxidation Products in Cancer Progression and Therapy//ISRN Oncology/ -2012/ Article ID 137289, 21 pages.

13. Lushchak V.L., Gospodaryov D.V. Catalases protect cellular proteins from oxidative modification in Saccharomyces cerevisiae // Cell Biol.Int. -2005. -Vol.29. -№3 -P.187-192.

14. Stadman E.R. Metal ion – catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological conseguences // ree Rad .Biol. Med. – 1990. – V.9. – P. 315-325.