

Л. В. Сорокіна, І. В. Бойчук, О. Р. Мельников, Г. І. Соляник

Особливості антиоксидантної системи плазми крові мишей з високоангіогенним варіантом карциноми легені Льюїс

(Представлено академіком НАН України В. Ф. Чехуном)

Проведено оцінку прооксидантно-антиоксидантного стану плазми крові мишей з пухлинами двох варіантів карциноми легені Льюїс з різним ангіогенним потенціалом з урахуванням показників вмісту продуктів пероксидного окиснення ліпідів, активності системи церулоплазмін-трансферин, сумарної супероксиддисмутазної та каталазної активності. Показано, що ознакою росту високоангіогенного варіанта карциноми порівняно з низькоангіогенним є нижча інтенсивність ліпопероксидації в плазмі крові, яка значною мірою пов'язана з більш ефективним функціонуванням антиоксидантних систем за рахунок підвищеної супероксиддисмутазної та пероксидазної активності плазми крові. Виявлені відмінності досліджуваних показників зворотно корелюють з ангіогенним потенціалом пухлин та прямо корелюють з їх метастатичним потенціалом.

Відомо, що розвиток злоякісного процесу супроводжується формуванням в організмі оксидативного стресу, який характеризується накопиченням активних форм кисню та азоту (АФК) [1]. Це виникає як внаслідок високого рівня продукції пухлинними клітинами в крові низькі біологічно активних медіаторів (до яких належать АФК), так і за рахунок недостатнього функціонування багаторівневої антиоксидантної системи організму. Останнє обумовлено системним впливом пухлини на організм, у рамках якого біологічні властивості пухлинних клітин визначають характер взаємовідносин між пухлиною та організмом, результатом чого стає специфіка перебігу пухлинного процесу та особливості функціонування захисних систем організму. Визначення характеру та параметрів взаємозв'язку між біологічними властивостями злоякісних пухлин та станом антиоксидантної системи організму є актуальним з точки зору підвищення ефективності протипухлинної терапії та покращення якості життя онкологічних хворих.

У зв'язку з вищесказаним метою роботи було дослідження змін стану антиоксидантної системи крові тварин у процесі росту експериментальних пухлин одного походження з різними біологічними властивостями.

У роботі було використано два варіанти карциноми легені Льюїс (LLC/R9 та LLC), які істотно відрізняються швидкістю росту, ангіогенним та метастатичним потенціалами. LLC/R9 (порівняно з LLC) є високоангіогенним (рівень продукції фактору росту ендотеліальних клітин в 1,5 раза вищий), низькометастатичним (кількість легеневи метастазів у 3 рази нижча) та характеризується в 1,4 раза вищою швидкістю росту первинної пухлини [2–4]. Крім того, характерною ознакою LLC/R9 (на відміну від LLC) є розвиток в організмі тварин значного паранеопластичного синдрому, який проявляється в анемії та екстрамедулярному гемопоезі [5].

Пухлинні клітини кожного варіанта культивували в середовищі RPMI-1640 у присутності 10% ембріональної сироватки при +37 °С в атмосфері 5% CO₂ та перещеплювали

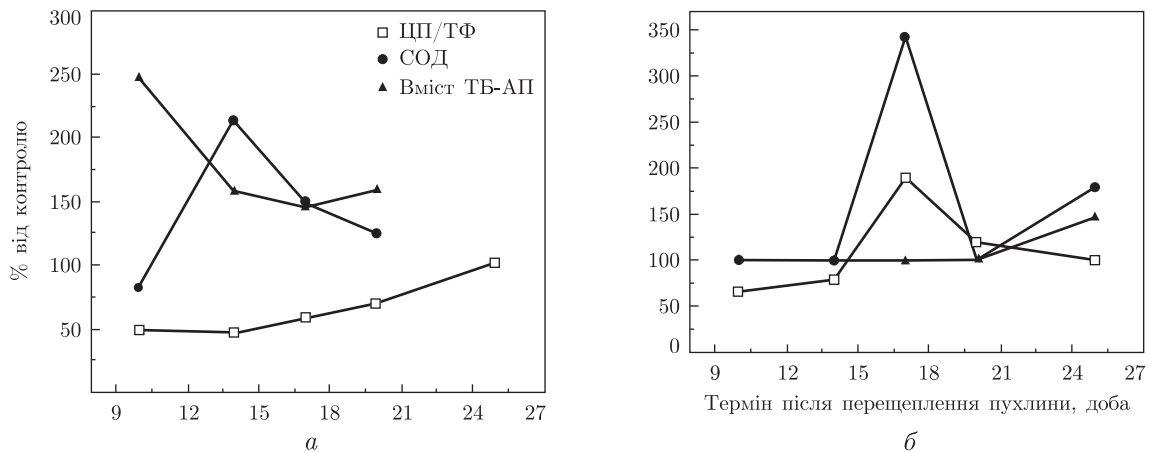


Рис. 1. Динаміка зміни співвідношення церулоплазмін/трансферин (ЦП/ТФ), активності супероксиддисмутази (СОД) та вмісту тіобарбітурат-активних продуктів (ТБ-АП) у плазмі крові мишей у процесі росту LLC (а) та LLC/R9 (б).

Величини наведені у відсотках по відношенню до показників у плазмі крові інтактних тварин з урахуванням статистичних відмінностей

мишам лінії C57/BL6 (віком 2–2,5 міс. та масою 20–22 г) у кількості $1 \cdot 10^6$ клітин на тварину. На 10, 14, 17, 20 та 25-ту добу росту пухлин проводили евтаназію тварин (по 5 мишей на добу дослідження). З плазми тварин готували циліндричні зразки каліброваних розмірів ($d = 4,0$ мм, $l = 25 \div 35$ мм), заморожували та зберігали при температурі 77 К. Як контроль використовували плазму крові тварин без пухлин (інтактні миші).

Стан прооксидантно-антиоксидантної системи плазми крові оцінювали за вмістом церулоплазміну (ЦП) та трансферину (ТФ) (за даними спектрів електронного парамагнітного резонансу [6]), за вмістом вторинних продуктів пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) — тіобарбітурат-активних продуктів (ТБ-АП), сумарною супероксиддисмутазною активністю (СОДА), активністю каталази (з використанням біохімічних методів [7–9]).

Аналіз результатів дослідження проводили з використанням описативної статистики та кореляційного аналізу Пірсона. Достовірність відмінностей між досліджуваними показниками оцінювали з використанням t -критерію Стьюдента.

Проведені дослідження показали, що ріст як LLC/R9, так і LLC супроводжується порушенням прооксидантно-антиоксидантного балансу в напрямку домінування першого, більш вираженому у тварин з LLC. Так, у період з 10-ї по 20-ту добу рівень ТБ-АП у плазмі крові мишей з LLC/R9 достовірно не відрізнявся від даного показника для плазми крові інтактних тварин (рис. 1, табл. 1, 2). Лише на 25-ту добу спостерігалось зростання вмісту вторинних продуктів ПОЛ на 45% ($p < 0,05$) порівняно з таким інтактних мишей. Ріст пухлин LLC характеризується більш високим вмістом ТБ-АП порівняно з відповідними показниками як інтактних тварин, так і тварин з LLC/R9. Так, на 10-ту добу вміст ТБ-АП у плазмі крові мишей з LLC майже на 146% ($p < 0,05$) та 81% ($p < 0,05$) більший порівняно з інтактними тваринами та мишами з LLC/R9 відповідно. Починаючи з 14-ї по 20-ту добу вміст ТБ-АП у плазмі крові мишей з LLC дещо знижується, але залишається вищим в середньому на 54% ($p < 0,05$) та 38% ($p < 0,05$) відносно показників контрольних тварин та тварин з LLC/R9 (див. рис. 1, табл. 1, 2).

Відмінності в кількості вторинних продуктів ПОЛ у плазмі крові мишей з пухлинами досліджуваних варіантів значною мірою пов'язані зі станом їх антиоксидантних систем,

Таблиця 1. Параметри прооксидантно-антиоксидантного стану плазми крові мишей з пухлинами LLC/R9

Показник	Інтактні тварини	Термін після перещеплення пухлинних клітин, доба				
		10-та	14-та	17-та	20-та	25-та
Вміст ТБ-АП, мкмоль/л	127,0 ± 21,7	173,0 ± 39,2*	142,0 ± 42,5*	139,4 ± 31,6*	137,0 ± 31,1*	184,6 ± 28,5*
Вміст ЦП, у. о.	0,38 ± 0,02	0,36 ± 0,02	0,22 ± 0,02*	0,51 ± 0,03*	0,46 ± 0,04	0,45 ± 0,08
ЦП/ТФ	0,56 ± 0,04	0,37 ± 0,02	0,44 ± 0,07	1,06 ± 0,02	0,67 ± 0,04	0,68 ± 0,14
СОД активність, у. о./ (мг білка · хв)	61,0 ± 3,9	84,3 ± 30,1	99,0 ± 40,6	209,8 ± 75,1*	73,1 ± 39,5	109,6 ± 13,5*
Активність каталази, у. о./ (мг білка · хв)	93,7 ± 6,9	94,6 ± 14,7	54,2 ± 7,9*	76,0 ± 4,2*	26,7 ± 7,0*	27,2 ± 6,1*
Антиоксидантна активність ЦП, мкг ЦП/ (мг білка · год)	9,0 ± 3,4	15,0 ± 0,9	29,4 ± 1,8*	25,7 ± 1,5*	38,3 ± 0,4	20,8 ± 2,2*

* Тут і в табл. 2 відмінності достовірні порівняно із значеннями показників для інтактних мишей ($p < 0,05$).

Таблиця 2. Параметри прооксидантно-антиоксидантного стану плазми крові мишей з пухлинами LLC

Показник	Інтактні тварини	Термін після перещеплення пухлинних клітин, доба				
		10-та	14-та	17-та	20-та	25-та
Вміст ТБ-АП, мкмоль/л	127,0 ± 21,7	312,4 ± 8,1*	199,7 ± 22,9*	186,6 ± 29,4*	202,1 ± 32,5*	НВ
Вміст ЦП, у. о.	0,38 ± 0,02	0,29 ± 0,05	0,18 ± 0,03*	0,21 ± 0,03*	0,31 ± 0,02*	0,44 ± 0,09
ЦП/ТФ	0,56 ± 0,04	0,27 ± 0,05	0,26 ± 0,03	0,33 ± 0,04	0,39 ± 0,01	0,60 ± 0,07
СОД активність, у. о./ (мг білка · хв)	61,0 ± 3,9	50,0 ± 3,0*	129,6 ± 17,9*	91,5 ± 24,0*	75,8 ± 7,1*	НВ
Активність каталази, у. о./ (мг білка · хв)	93,7 ± 6,9	85,6 ± 14,5	36,1 ± 11,3*	49,6 ± 9,7*	19,2 ± 8,6*	НВ
Антиоксидантна активність ЦП, мкг ЦП/ (мг білка · год)	9,0 ± 3,4	15,2 ± 3,6	5,6 ± 1,6	11,8 ± 1,5	18,5 ± 8,7	НВ

Примітка. НВ — не визначалось.

активність яких може бути оцінена за співвідношенням її головних компонентів — ЦП і ТФ (ЦП/ТФ) [6]. На фоні високого вмісту вторинних продуктів ПОЛ у плазмі крові мишей з LLC спостерігається зниження величини ЦП/ТФ у середньому на 47% ($p < 0,05$) порівняно з інтактним контролем, що вказує на недостатній ступінь утилізації АФК антиоксидантними факторами плазми крові цих тварин. У той же час у плазмі крові тварин з LLC/R9 рівень ЦП/ТФ або не відрізнявся від контрольних значень, або був навіть вищим на 89% ($p < 0,05$) на 17-ту добу росту пухлини. Таким чином, підвищення значення ЦП/ТФ у плазмі крові тварин з високоангіогенним варіантом карциноми легені Льюїс обумовлює підтримку вмісту ТБ-АП на рівні, наближеному до значень даного показника в плазмі інтактних тварин.

Серед показників, які відображають ефективність функціонування антиоксидантної системи, ключовою є сумарна супероксиддисмутазна активність плазми крові (СОД активність), яка обумовлена активністю ЦП, високомолекулярною Cu, Zn-вмісною супероксиддисмутазою та низькомолекулярними антиоксидантами неензиматичної природи [10].

Встановлено відмінності у характері змін сумарної СОД активності плазми крові мишей у міру росту пухлин LLC та LLC/R9 (див. рис. 1, табл. 1, 2). Починаючи з 10-ї доби активність плазми крові мишей з LLC/R9 проявляє тенденцію до зростання, досягаючи свого максимального значення на 17-ту добу, коли рівень СОД активності на 244% ($p < 0,05$) вищий порівняно з відповідними показниками інтактних тварин. На 20-ту добу відмічена реверсія активності СОД плазми крові мишей з LLC/R9 до значень, які достовірно не відрізняються від величин для інтактних мишей, із подальшим її зростанням на 80% ($p < 0,05$) на 25-ту добу росту пухлин. СОД активність плазми крові мишей з LLC є значно нижчою порівняно з такою мишей з LLC/R9 (див. рис. 1, табл. 1, 2). Так, максимальний рівень цієї активності, який спостерігається на 14-ту добу росту пухлини, на 62% ($p < 0,05$) нижчий за аналогічний показник мишей з LLC/R9, хоча і є підвищеним на 112,5% ($p < 0,05$) порівняно з інтактними тваринами.

Отримані результати свідчать про більш високий рівень утилізації супероксид-аніона в плазмі крові тварин з LLC/R9 порівняно з плазмою мишей з LLC, що співвідноситься з меншим рівнем вмісту продуктів ПОЛ у плазмі крові мишей з пухлинами високоангіогенного варіанта. Односпрямованість змін співвідношення ЦП/ТФ та сумарної СОД активності плазми крові мишей з пухлинами LLC/R9 дозволяє припускати значний внесок ЦП у реалізацію антиоксидантної функції, пов'язаної із знешкодженням супероксид-аніон-радикала.

Менша інтенсивність ПОЛ у плазмі крові мишей з пухлинами LLC/R9 порівняно з аналогічним показником мишей з LLC може бути обумовлена як більш ефективним функціонуванням систем, які проявляють СОД активність, так і вищим рівнем активності каталази в плазмі крові тварин з LLC/R9. Незважаючи на те, що рівень активності каталази зменшується в процесі росту як LLC/R9, так і LLC, у плазмі крові тварин з LLC/R9 на всіх термінах спостереження він є вищим, ніж у тварин з LLC (див. табл. 1, 2).

Таким чином, ріст високоангіогенного варіанта з низьким метастатичним потенціалом (LLC/R9) характеризується вищим рівнем активності ключових компонентів антиоксидантної системи (система церулоплазмін–трансферин, фактори з СОД активністю, каталаза), наслідком чого є нижчий рівень вмісту вторинних продуктів ПОЛ порівняно з плазмою крові тварин з пухлинами LLC. Виявлені особливості показників прооксидантно-антиоксидантного стану плазми крові в процесі росту кожного з досліджуваних варіантів карциноми легені Льюїс є відображенням різного впливу на організм пухлин, яким притаманні різні біологічні властивості.

1. *Klaunig J., Kamendulis L.* The role of oxidative stress in carcinogenesis // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* – 2004. – **44**. – P. 239–267.
2. *Pyaskovskaya O., Dasyukevich O., Kolesnik D., Garmanchouk L., Solyanik G.* Changes in VEGF level and tumor growth characteristics during Lewis lung carcinoma progression towards cis-DDP resistance // *Exp. Oncol.* – 2007. – **29**, No 3. – P. 197–202.
3. *Pyaskovskaya O., Kolesnik D., Kolobov A., Vovyanko S., Solyanik G.* Analysis of growth kinetics and proliferative heterogeneity of Lewis lung carcinoma cells growing as unfed culture // *Ibid.* – 2008. – **30**, No 4. – P. 269–275.
4. *Solyanik G., Pyaskovskaya O., Garmanchouk L.* Cisplatin-resistant Lewis lung carcinoma cells possess increased level of VEGF secretion // *Ibid.* – 2003. – **25**. – P. 260–265.
5. *Федорчук О., Пясковська О., Сківка Л., Горбик Г., Тромпак О., Якшибаева Ю., Соляник Г.* VEGF опосередковує особливості паранеопластичного синдрому у мишей з високоангіогенним варіантом карциноми легені Льюїс // *Вісн. Луганськ. нац. ун-ту.* – 2010. – № 10. – С. 23–29.
6. *Melnikov O., Pyatchanina T., Motot V. et al.* Changes in the Proportion of Blood Metalloproteids as a Result of Arterial Hypertension Treatment in Liquidators of the Chernobyl NPP Accident Consequences // *Int. J. Rad. Med.* – 2003. – **5**, No 1–2. – P. 237–245.
7. *Стальная И., Гаришвили Т.* Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты // *Современные методы в биохимии* / Под. ред. В. Н. Ореховича. – Москва, 1977. – С. 66–68.
8. *Nishikimi M., Rao N. A., Yagi K.* The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1972. – **46**. – P. 849–854.
9. *Королюк М. А., Иванова Л. И., Монтарева В. Е.* Метод определения каталазы // *Лаб. дело.* – 1988. – № 1. – С. 16–19.
10. *Tamura T., Olin K., Goldenberg R. et al.* Plasma extracellular superoxide dismutase activity in healthy pregnant women is not influenced by zinc supplementation // *Biol. Trace. Elem. Res.* – 2001. – **80**, No 2. – P. 107–113.

*Інститут експериментальної патології,
онкології та радіобіології ім. Р. Є. Кавецького
НАН України, Київ*

Надійшло до редакції 03.06.2011

Л. В. Сорокина, И. В. Бойчук, О. Р. Мельников, Г. И. Соляник

Особенности антиокислительной системы плазмы крови мышей с высокоангиогенным вариантом карциномы легкого Льюис

Проведена оцінка прооксидантно-антиокислительного стану плазми крові мишей з опухольми двох варіантів карциноми легкого Льюїс з різним ангиогенним потенціалом з урахуванням показателів вмісту продуктів перекисного окислення ліпідів, активності системи церулоплазмин–трансферрин, суммарної супероксиддисмутазної та каталазної активностей. Показано, що ознакою росту високоангиогенного варіанта порівняно з низкоангиогенним є більш низька інтенсивність ліпопероксидації в плазмі крові, яка в значительній ступені пов'язана з більш ефективним функціонуванням антиоксидантних систем за рахунок підвищених супероксиддисмутазної та пероксидазної активностей плазми крові. Обнаруженні відмінності досліджуваних показателів обернено корелюють з ангиогенним потенціалом опухолей і прямо корелюють з їх метастатичним потенціалом.

L. V. Sorokina, I. V. Boichuk, O. R. Melnykov, G. I. Solyanik

Peculiarities of the antioxidant system of blood plasma in mice with highly angiogenic Lewis lung carcinoma

The evaluation of the prooxidant-antioxidant state of blood plasma of mice with transplanted tumors of two variants of Lewis lung carcinoma with different angiogenic potentials is performed using the indices of lipid peroxidation products content, the antioxidant activity of the ceruloplasmin-transferrin system, and the total superoxide dismutase and catalase activities. It is shown that the growth of highly angiogenic variant of carcinoma is characterized by the lower lipid peroxidation intensity due to a high level of superoxide dismutase and peroxidase activities in blood plasma. The observed differences in the changes of these indices correlate in the reverse manner with the angiogenic properties of tumors and directly correlate with their metastatic potentials.