

ИЗМЕНЕНИЯ АНТИОКСИДАНТНЫХ И КИСЛОРОДТРАНСПОРТНЫХ СВОЙСТВ КРОВИ У МЫШЕЙ С ПРИВИТОЙ АДЕНОКАРЦИНОМОЙ КИШЕЧНИКА НА ФОНЕ ХИМИОТЕРАПИИ

© 2018 г. А.А. Байжуманов, В.В. Елагин*, Е.С. Тхор, Е.Ю. Паршина,
А.И. Юсипович, М.А. Силичева, Г.В. Максимов

*Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова,
119234, Москва, Ленинские горы, 1/12*

**Научно-исследовательский институт биомедицинских технологий Нижегородской государственной
медицинской академии МЗ РФ, 603950, Нижний Новгород, пл. Минина и Пожарского, 10/1*

E-mail: parshinae@gmail.com

Поступила в редакцию 03.02.18 г.

Исследовано влияние аденокарциномы кишечника мышей на антиоксидантный статус крови и состояние гемоглобина. Аденокарцинома мышей сопровождается снижением содержания небелковых тиолов и увеличением содержания церулоплазмينا. При патологии меняется конформация молекулы глобина, но не гема гемоглобина. Вероятно, изменения в белке обусловлены неспецифическим повреждением в результате процессов перекисного окисления.

Ключевые слова: аденокарцинома кишечника мышей, антиоксидантный статус, конформация гемоглобина, иринотекан.

Известно, что онкологический процесс часто сопровождается нарушениями ряда компонентов крови: повышением скорости оседания, структуры и функций эритроцитов, а также снижением концентрации железа и анемией [1,2]. Кроме того, изменяется прооксидантно-антиоксидантное равновесие: образование свободных радикалов и перекисное окисление липидов и активность антиоксидантных систем (система глутатиона, супероксиддисмутаза, α -токоферол) смещаются в сторону активации перекисного окисления липидов. Например, у мышей с карциномой легких Льюиса или карциномой молочной железы выявлена супрессия активности антиоксидантных ферментов [3], снижение содержания α -токоферола [4], SH-групп и восстановленного глутатиона в плазме крови [5]. На настоящий момент отсутствует информация об изменении структуры гемоглобина и его способности связывать кислород при аденокарциноме, в то время как обеспечение организма кислородом является важным фактором формирования патологического процесса.

Для исследования возможности восстановления изменений состояния гемоглобина и антиоксидантной системы крови при аденокарциноме использовали препарат иринотекан,

действие которого сопровождается ингибированием топоизомеразы 1, снижением транспорта в клетках цистеина и количества глутатиона, а также увеличением концентрации активных форм кислорода [6]. Важно, что снижение содержания глутатиона в клетках приводит к повышению цитотоксичности препарата, параллельно уменьшается содержание гемоглобина, провоцируя анемию [7]. Однако механизмы возможного действия данного препарата на гемоглобин и его способность переносить кислород в настоящее время не исследованы.

Целью данной работы было исследование изменений кислородтранспортных свойств гемопорфирина и структуры белковой части молекулы гемоглобина при аденокарциноме кишечника и химиотерапии у мышей, а также возможного влияния на гемоглобин антиоксидантного статуса крови.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили мыши линии Balb/c с подкожно привитой опухолью Colo-26 (200 тыс. кл. в 100 мкл фосфатного-солевого буфера), животным вводили 100 мкл иринотекана (внутрибрюшинно, в дозе 20 мг/кг)

в течение пяти суток. Исследование выполнено на 19 животных, разделенных на четыре группы: животные без опухоли, получавшие инъекции физиологического раствора (группа 1) или иринотекана (группа 2), и животные с привитой опухолью, получавшие инъекции физиологического раствора (группа 3) или иринотекана (группа 4). Контролем служили животные без привитой опухоли, получавшие инъекцию физиологического раствора. Забор крови осуществляли на восемнадцатые сутки роста опухоли путем декапитации. Предварительно животных наркотизировали раствором Золетила®. Эксперименты на животных в рамках исследования были разрешены Этическим комитетом Ниж-ГМА.

Антиоксидантный статус крови исследовали с использованием биохимических методик определения количества небелковых тиолов в крови, церулоплазмينا и ТБК-активных продуктов в плазме крови, а также общей антиоксидантной активности плазмы [8]. Для выделения гемоглобина эритроциты отмывали от плазмы центрифугированием в буфере Аллена и гемолизировали в 5 мМ фосфатном буфере, мембраны клеток отделяли центрифугированием.

Размер и ζ-потенциал молекул гемоглобина исследовали методом динамического светорассеяния с использованием анализатора размеров частиц Zetasizer Nano ZS (Malvern, Великобритания).

Конформацию гемопорфирина гемоглобина исследовали методом спектроскопии комбинационного рассеяния при длине волны возбуждающего света 532 нм, мощности лазера 5 мВт и времени записи спектра 30 с на приборе «Интегра Спектра» (НТ-МДТ, Россия). Обработку спектров проводили с использованием оригинального пакета программ Pyraman (<https://bitbucket.org/alexeybrazhe/pyraman>).

Флуоресценцию глобина регистрировали методом спектроскопии высокого временного разрешения с использованием импульсного лазера ($\lambda_{\text{возб}} = 280 \text{ нм}$, $\nu = 10 \text{ МГц}$, $E_{\text{имп}} = 13 \text{ пДж}$) и 16-тиканальный полихроматор [9]. Обработку сигнала проводили в программе SPCImage.

Полученные результаты представлены в виде среднего значения \pm ошибка среднего. Для выявления различий между исследуемыми группами использовали критерий Крускала–Уоллеса. Последующую оценку достоверных отличий между группами проводили, используя критерий Данна. Статистически значимыми считали различия при уровне значимости $p < 0,05$.

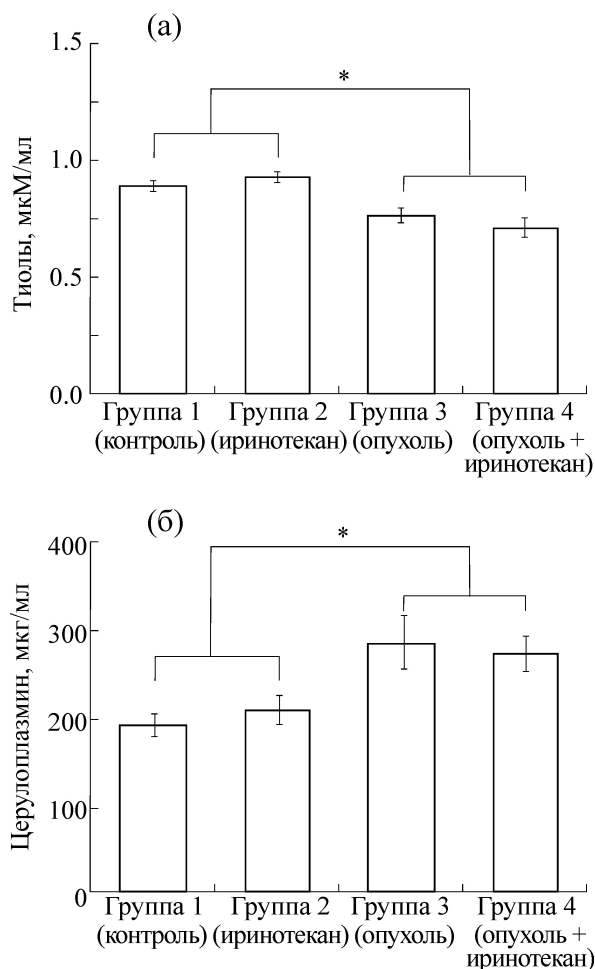


Рис. 1. Количество небелковых тиолов (а) и церулоплазмينا (б). Группы животных, участвовавших в эксперименте: 1 – мыши без опухоли, получавшие инъекции физиологического раствора, контроль ($n = 4$); 2 – мыши без опухоли, получавшие «иринотекан» ($n = 4$); 3 – мыши с привитой опухолью, получавшие инъекции физиологического раствора ($n = 5$); 4 – мыши с привитой опухолью, получавшие «иринотекан» ($n = 6$). * $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для исследования изменений антиокислительной системы крови при патологии и действии иринотекана регистрировали содержание небелковых тиолов в крови, 90% которых составляет восстановленный глутатион (основной антиоксидант крови), церулоплазмينا – антиоксиданта плазмы и белка острой фазы воспаления, ТБК-активных продуктов (пропорциональное содержанию малонового диальдегида), маркера перекисного окисления липидов, а также общей антиоксидантной активности плазмы, пропорциональной концентрации неферментативных водорастворимых антиоксидантов, таких как ураты и витамин С, и не зависящей от активности

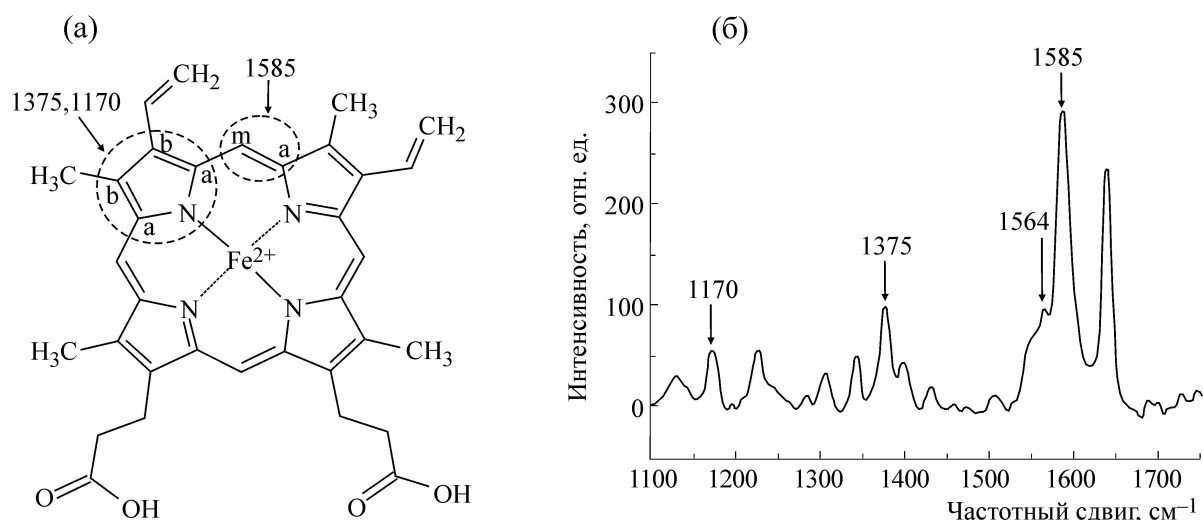


Рис. 2. Гемопорфирин гемоглобина: (а) – структурная формула, (б) – спектр комбинационного рассеяния (длина волны возбуждающего света 532 нм). Отмечены выбранные для анализа полосы и соответствующие им группы связей в молекуле гемопорфирина.

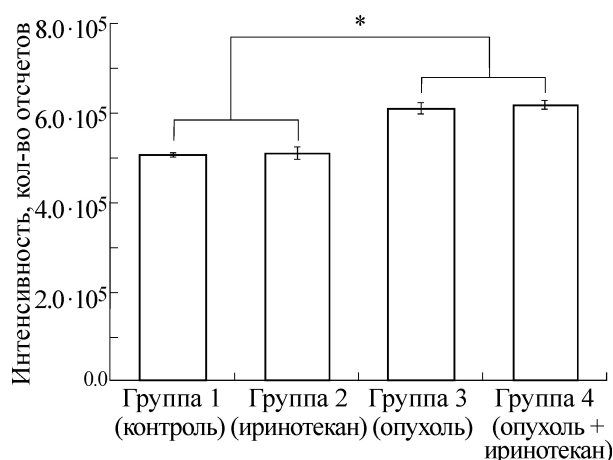


Рис. 3. Интенсивность флуоресценции триптофановых остатков в молекуле гемоглобина. Обозначения экспериментальных групп, как на рис. 1. * $p < 0,05$.

ферментных антиоксидантных систем и активности жирорастворимых антиоксидантов.

Установлено, что в группах мышей с опухолью и мышей с опухолью на фоне химиотерапии наблюдается снижение количества небелковых тиолов и увеличение количества церу-

лоплазмина (рис. 1). Снижение количества небелковых тиолов указывает на наличие окислительного стресса, а повышение концентрации церулоплазмина указывает на воспалительные процессы, происходящие вокруг опухолевого узла [10].

Для оценки кислородтранспортной функции эритроцитов крови мы исследовали конформацию гемопорфирина выделенного гемоглобина (рис. 2), используя соотношения интенсивностей полос спектра комбинационного рассеяния (таблица). Установлено, что при патологии и при действии иринотекана конформация гемопорфирина гемоглобина не изменяется во всех исследованных группах, что свидетельствует об отсутствии изменений в кислородтранспортных свойствах гемопорфирина. Исследование размера молекулы гемоглобина и ее поверхностного заряда (ζ -потенциала) также не выявило изменений в экспериментальных группах.

Известно, что молекула гемоглобина содержит шесть аминокислотных остатков триптофана, который ответствен за ее флуоресценцию. Установлено, что интенсивность флуорес-

Соотношения интенсивности полос спектра комбинационного рассеяния гемоглобина

Соотношения	Значение
I_{1375}/I_{1585}	Оценка способности оксигемоглобина отдавать лиганды
I_{1585}/I_{1564}	Характеризует средство гемоглобина к кислороду
I_{1375}/I_{1170}	Этот параметр зависит от белкового микроокружения гемопорфирина

ценции триптофановых остатков в белковой части молекулы гемоглобина меньше в контрольной группе и в группе животных, получавших препарат для химиотерапии, по сравнению с группами с привитой опухолью (рис. 3). Увеличение интенсивности флуоресценции может быть связано с увеличением расстояния между остатками триптофана и находящимися вблизи ароматическими аминокислотными остатками (тирозином и фенилаланином). Изменение конформации белка, сопровождающееся увеличением расстояния между ароматическими остатками и остатками триптофана на расстояние более 10 нм, приводит к нарушению миграции энергии по механизму ферстеровского переноса, при этом интенсивность флуоресценции остатков триптофана возрастает.

Полученные в ходе исследования результаты свидетельствуют об изменении исследуемых параметров в группе животных с привитой опухолью, но не при действии иринотекана. Последнее может быть связано с тем, что введение иринотекана не оказало ожидаемого терапевтического действия (в группе мышей с привитыми опухолями после химиотерапии средний размер опухоли на 18-е сутки составлял $1,1 \pm 0,5 \text{ см}^3$, в группе животных с опухолью, не получавших химиотерапию – $1,2 \pm 0,2 \text{ см}^3$). Очевидно, что для повышения эффективности действия препарата необходимо использовать иринотекан в комбинации с другими препаратами, такими как 5-фторурацил [13] или оксалиплатин [6,11,12,14].

Итак, в ходе работы были выявлены изменения антиоксидантного статуса у мышей с привитой аденокарциномой кишечника, а также изменения конформации белковой части молекулы гемоглобина. Доказано, что при патологии и при введении химиотерапевтического препарата изменения конформации гемопорфирина и связанную с ней его способность переносить кислород. Изменения конформации глобина могут быть результатом неспецифического повреждения в результате процессов перекисного окисления.

Авторы выражают свою признательность директору НИИ БМТ д.м.н., проф. РАН Е.В. Загайновой и с.н.с. НИИ БМТ к.б.н. М.А. Сироткиной за помощь в организации исследования, с.н.с. биологического ф-та МГУ имени М.В. Ломоносова к.б.н. Е.Г. Максимова за помощь в проведении экспериментов.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке государственного задания по теме «Разработка технологий флуоресцентного биоимиджинга для задач фундаментальной и прикладной онкологии».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ш. Х. Ганцев, В. В. Старинский, И. Р. Рахматуллина и др., *Амбулаторно-поликлиническая онкология*, 2-е изд. (ГЭОТАР-Медиа, М., 2012).
2. В. Т. Долгих, *Опухолевый рост. Избранные лекции* (Медицинская книга, М.; Изд-во НГМА, Нижний Новгород, 2001).
3. R. M. Johnke, R. S. Abernathy, C. J. Kovacs, et al., *Anticancer Res.* **17**, 2169 (1997).
4. E. M. de Cavanagh, A. E. Honegger, E. Hofer, et al., *Cancer* **94** (12), 3247 (2002).
5. F. della Rovere, A. Granata, A. Saija, et al., *Anticancer Res.* **20** (3A), 1595 (2000).
6. S. Chintala, K. Tóth, M.-B. Yin, et al., *Chemotherapy* **56** (3), 223 (2010). doi:10.1159/000316334.
7. C. Zeng, H. Zhou, Y. Wei, et al., *Chin. Med. J. (Engl.)*, **127** (5), 951 (2014).
8. M. S. Pankratova, A. A. Baizhumanov, A. I. Yusipovich, et al., *Peer J.* **3**, e1055 (2015). doi:10.7717/peerj.1055
9. N. G. Zhdanova, E. G. Maksimov, A. M. Arutyunyan, et al., *Spectrochim. Acta – Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **174**, 223 (2017).
10. S. Upadhyaya, S. Upadhyaya, and K. S. Prabhu, *Ind. J. Clin. Biochem.* **17** (1), 20 (2002). doi:10.1007/BF02867936.
11. W. L. Tung, Y. Wang, P. W. Gout, et al., **71** (7), 675 (2011). doi: 10.1002/pros.21283.
12. W. C. Zamboni, C. F. Stewart, P. J. Cheshire, et al., *Clin. Cancer Res.* **4** (3), 743 (1998).
13. J. I. Hare, R. W. Neijzen, M. Anantha, et al., *PLoS One* **8** (4), e62349 (2013). doi: 10.1371/journal.pone.0062349.
14. S. Guichard, S. Arnould, I. Hennebelle, et al., *Anti-cancer Drugs* **12** (9), 741 (2001).

Alterations of Antioxidant and Oxygen Transport Blood Properties in Adenocarcinoma-bearing Mice during Chemotherapy

A.A. Baizhumanov*, **V.V. Elagin***, **E.S. Tkhor***, **E.Y. Parshina***, **A.I. Yusipovich***,
M.A. Silicheva*, and **G.V. Maksimov***

**Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/12, Moscow, 119234 Russia*

***Institute of Biomedical Technologies, pl. Minina i Pozharskogo 10/1, Nizhny Novgorod, 603950 Russia*

We explored how adenocarcinoma of the intestine in mice influenced the levels of the antioxidant status in the blood and hemoglobin content. It was shown that the oncological process causes a decrease in the non-protein thiols and an increase in the ceruloplasmin. In pathology, there is a conformational change in the globin molecule but not in the heme group. Probably, changes in the protein are caused by nonspecific damage as a result of the processes of peroxidation.

Keywords: adenocarcinoma of the intestine in mice, antioxidant status, conformation of hemoglobin, Irinotecan