

М.О. Дружина
Л.І. Маковецька
О.А. Главін
І.І. Смоланка
В.М. Михайленко

Інститут експериментальної
патології, онкології
і радіобіології
ім. Р.Є. Кавецького
НАН України, Київ, Україна

Ключові слова: передпухлинна патологія молочної залози, вільнорадикальні процеси, окисний метаболізм, периферична кров.

ВІЛЬНОРАДИКАЛЬНІ ПРОЦЕСИ В ПЕРИФЕРИЧНІЙ КРОВІ ХВОРИХ ІЗ ПЕРЕДПУХЛИННОЮ ПАТОЛОГІЄЮ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ

Запальні патологічні процеси супроводжуються надмірним утворенням активних форм кисню та інтенсифікацією вільнорадикального окиснення біо-субстратів, що призводить до розвитку оксидативного стресу. Такі порушення окисного метаболізму можуть спричиняти онкотрансформацію клітин. **Мета роботи:** дослідити стан вільнорадикальних процесів у периферичній крові для застосування як прогностичного тесту у хворих із передпухлинною патологією молочної залози (МЗ). **Об'єкт і методи:** дослідження проведено на зразках крові 96 хворих із передпухлинною патологією МЗ. У роботі використано біохімічні, біофізичні, спектрометричні та статистичні методи. Визначали інтенсивність генерування супероксидного аніон-радикала лімфоцитами, прооксидантно-антиоксидантне співвідношення у гемолізаті, рівень окиснення білків та активність ферментів антиоксидантного захисту: супероксиддисмутази (СОД) і каталази (КАТ). **Результати:** порівняно з показниками умовно здорових донорів виявлено збільшення ($p < 0,05$) прооксидантно-антиоксидантного співвідношення та інтенсивності генерування супероксидних аніон-радикалів (у 1,7 та 1,3 раза відповідно). Відмічали достовірне підвищення рівня окисної модифікації білків у плазмі крові (у 2,2 раза), активацію СОД (в 1,7 раза) та зниження ($p < 0,05$) активності КАТ (у 1,2 раза). **Висновки:** одержані результати свідчать про інтенсифікацію вільнорадикальних процесів на фоні розбалансованої роботи ферментів антиоксидантного захисту, що вказує на значні порушення окисного метаболізму та розвиток оксидативного стресу у хворих із передпухлинною патологією МЗ. Рекомендовано проводити профілактичні заходи, націлені на зменшення порушень окисного метаболізму у хворих з такою патологією.

Рак молочної залози (РМЗ) в Україні, як і в більшості країн світу, з кожним роком усе ширше розповсюджується і нині посідає перше місце в структурі захворюваності та смертності від злоякісних новоутворень серед жінок (25% усіх випадків раку). Щорічно у світі реєструють більше одного мільйона випадків цього захворювання, а при середній тривалості життя 80 років ризик занедужати на РМЗ становить 12,5%. В Україні РМЗ є однією з основних медико-соціальних проблем сучасної системи охорони здоров'я внаслідок значної поширеності та високого рівня інвалідності і смертності від цього захворювання. За даними Національного канцер-реєстру [1], кількість хворих на РМЗ, які перебували на обліку у 2016 р., становила 14 533 осіб, із яких 127 випадків реєстрували у чоловіків та 14 406 — у жінок (20,3% загальної кількості жінок, хворих на злоякісні новоутворення). Захворюваність на РМЗ в Україні щороку невпинно зростає в середньому на 1–2% за рік. Тому рання діагностика цього захворювання відкриває перспективу ефективного втручання в патологічний процес.

Багаторічні дослідження і клінічні спостереження свідчать, що онкологічна трансформація клітин, формування і розвиток пухлин часто супроводжуються порушенням окисного метаболізму [2, 3]. З'ясування питання, якою мірою передпухлинна патологія молочної залози (МЗ) пов'язана з формуванням оксидативного стресу, дозволить цілеспрямовано розробляти стратегію профілактики цього захворювання.

Тому метою роботи було дослідити стан вільнорадикальних процесів (ВРП) у периферичній крові для застосування в якості прогностичного тесту у хворих із передпухлинною патологією МЗ.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження проведено на зразках крові 96 хворих із передпухлинною патологією МЗ і 18 умовно здорових осіб. Дослідження виконували за інформованою згодою пацієнтів відповідно до принципів проведення біомедичних досліджень, викладених в Гельсінській декларації Всесвітньої медичної асоціації.

Редокс-стан лімфоцитів крові оцінювали за інтенсивністю генерації супероксидного аніон-радикала ($O_2^{\cdot-}$) хемілюмінесцентним (ХЛ) методом із використанням люцигеніну в якості індикатора, який, реагуючи з $O_2^{\cdot-}$, висвічує кванти світла, що фіксується приладом [4]. Інтенсивність люмінесценції свідчить про швидкість окисного метаболізму в клітинах, оскільки кисень головним чином використовується для вироблення аденозинтрифосфату (АТФ) у дихальному ланцюзі мітохондрій. Вимірювання здійснювали на приладі AutoLumat LB 953 (Німеччина) впродовж 72 с (18 вимірів з інтервалом 4 с). Для цього у кювету вносили 40 мкл люцигеніну, безпосередньо перед вимірюванням додавали 1 мл суспензії клітин у концентрації 1 млн/мл. Записували світлосуму (Σ_{72}) реакції за 72 с (імп/72 с).

Інтенсивність ВРП вивчали за прооксидантно-антиоксидантним співвідношенням у крові методом індукованої пероксидом водню (H_2O_2) хемілюмінесценції [5]. Метод модифікували для проведення визначень на приладі AutoLumat LB 953 (Німеччина). У пробірку вносили 0,6 мл гемолізату, отриманого при розведенні крові у 400 разів дистильованою водою. ХЛ реакцію ініціювали автоматичним введенням 50 мкл 10% розчину H_2O_2 . Проводили вимірювання впродовж 180 с (18 вимірювань з інтервалом 10 с). Аналізу піддавали світлосуму реакції (за 180 с), яка свідчить про прооксидантно-антиоксидантне співвідношення хімічних продуктів у досліджуваній пробі. Дані виражали в імпульсах за 180 с (імп/180 с).

Рівень окиснення білків оцінювали за методом R.L. Levine [6] у модифікації О.Ю. Дубініної [7]. Цей метод заснований на реакції взаємодії окиснених амінокислотних залишків білків з 2,4-динітрофенілгідразином (2,4-ДНФГ) та утворенням при цьому похідних 2,4-динітрофенілгідразону. Вміст у плазмі крові альдегіддинітрофенілгідразону (АДНФГ) та кетондинітрофенілгідразону (КДНФГ) визначали за допомогою спектрофотометричного методу (довжина хвилі 274 нм і 370 нм відповідно).

Активність каталази (КАТ) визначали в гемолізаті при розведенні крові у 800 разів дистильованою водою за методом [8], в основі якого лежить властивість пероксиду водню утворювати з солями молібдену стійкий забарвлений комплекс. Метод модифікували для проведення вимірювань на спектрофотометрі Sinergy (США). Реакцію проводили в пробірках, що містили 0,8 мл 10 мМ H_2O_2 та 40 мкл проби гемолізату. Через 10 хв реакцію зупиняли додаванням 0,4 мл 4% молібдату амонію і проводили вимірювання при довжині хвилі 410 нм, підраховували частину утилізованого пероксиду водню з використанням калібрувальної кривої та перераховували активність КАТ у мМ H_2O_2 на 1 мл крові за хвилину (мМ/мл/хв).

Активність супероксиддисмутази (СОД) у гемолізаті визначали при розведенні крові у 10 разів дистильованою водою за методом [9], модифікова-

ним для проведення вимірювань на спектрофотометрі Sinergy (США). Принцип визначення базується на відновленні нітротетразолію $O_2^{\cdot-}$, що утворюються при взаємодії між феназинметасульфатом і відновленою формою нікотинаміддинуклеотиду (НАДН). Вимірювання проводили 20 хв з інтервалом у 2,5 хв при довжині хвилі 540 нм. Проба для аналізу містила 50 мкл зразка гемолізату, 50 мкл нітротетразолію синього (1,25 мг/мл), 100 мкл феназину метасульфату (0,208 мг/мл) та 50 мкл НАДН (0,46 мг/мл). Результати перераховували у відсотках перетвореного $O_2^{\cdot-}$ відносно контрольної проби, що містила замість зразка дистильовану воду (приймали за 100%).

Статистичну обробку даних виконано з використанням програм MS Excel 2003 та OriginPro 2015. Достовірність розбіжностей оцінювали за t-критерієм Стьюдента. Різницю між одержаними показниками вважали достовірною при $p < 0,05$ [10].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Відомо, що за дії різних чинників найбільш чутливою функціональною ланкою організму є лімфоцити крові. Реакція на дію факторів зовнішнього середовища перш за все відображається у зміні окисного метаболізму. Пусковим моментом ініціації ВРП є генерація $O_2^{\cdot-}$ в різних хімічних реакціях, головним чином внаслідок утворення АТФ у мітохондріях.

При дослідженні інтенсивності генерування супероксидного аніон-радикала лімфоцитами крові виявлено її підвищення ($p < 0,05$) в 1,3 раза у хворих із передпухлинною патологією МЗ порівняно зі значенням в умовно здорових осіб ($924,3 \pm 76,4$ та $703,7 \pm 47,5$ імп/72 с відповідно) (рис. 1).

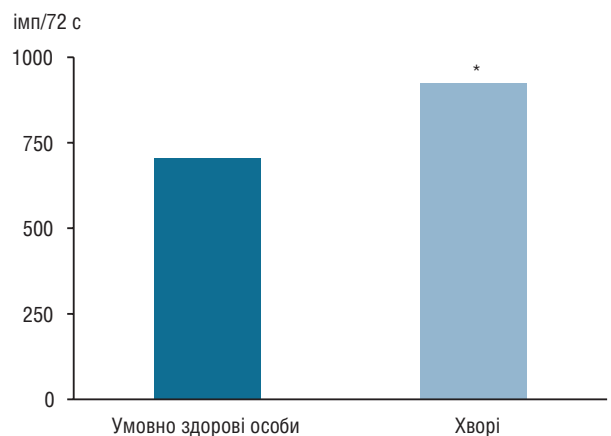


Рис. 1. Інтенсивність генерування супероксидного аніон-радикала лімфоцитами крові умовно здорових осіб і хворих із передпухлинною патологією МЗ. * $p < 0,05$ порівняно з умовно здоровими особами

Загальний рівень інтенсивності ВРП у тканинах організму та ефективність його гальмування ферментативними та неферментативними антиоксидантними системами відображає прооксидантно-антиоксидантне співвідношення, яке є досить лабільним інтегральним показником. Порушення цього співвідношення внаслідок утворення вільних радикалів

є одним із провідних механізмів формування структурно-функціональних ушкоджень і розвитку оксидативного стресу, що супроводжується підвищеною генерацією в тканинах і біологічних рідинах активних форм кисню та вторинних продуктів окисної модифікації біомолекул, що належать до різних класів органічних сполук (білки, ліпіди, нуклеїнові кислоти).

Дослідження прооксидантно-антиоксидантного співвідношення у гемолізаті хворих із передпухлинною патологією МЗ та умовно здорових осіб показало високу варіабельність цього показника в межах групи. При цьому середньгрупове значення рівня прооксидантно-антиоксидантного співвідношення у гемолізаті хворих становило $25\,453,0 \pm 1539,7$ імп/180 с з варіацією $8953,5$ – $63\,645$ імп/180 с, у той час як в умовно здорових осіб — $14615,8 \pm 1227,7$ імп/180 с і варіювало в межах від $6928,0$ до $24\,399,3$ імп/180 с. Таким чином, відмічено підвищення ($p < 0,05$) рівня ВРП за прооксидантно-антиоксидантним співвідношенням у гемолізаті хворих із передпухлинною патологією МЗ порівняно з умовно здоровими особами в 1,7 раза (рис. 2), що свідчить про інтенсифікацію процесів вільнорадикального окиснення.

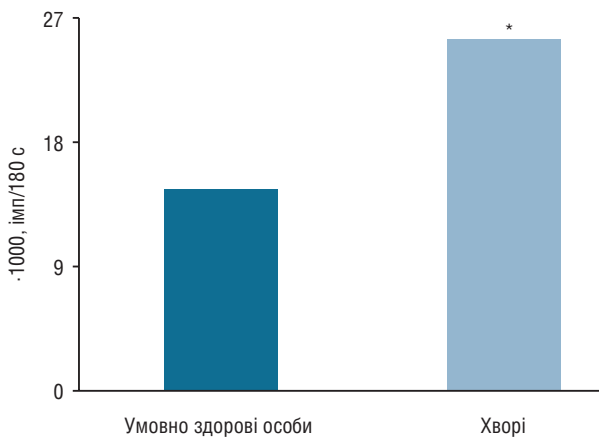


Рис. 2. Прооксидантно-антиоксидантне співвідношення у гемолізаті умовно здорових осіб і хворих із передпухлинною патологією МЗ. * $p < 0,05$ порівняно з умовно здоровими особами

Варто відмітити, що 11% хворих характеризуються дуже низькими рівнями прооксидантно-антиоксидантного співвідношення (рис. 3). Це може свідчити як про гіперактивацію антиоксидантних ферментних систем, так і про зменшення в плазмі крові вмісту сполук, які використовуються в процесах енергетичного обміну. Другий варіант є загрозливим для здоров'я і його потрібно брати до уваги при лікуванні таких хворих.

Вважають, що в стані оксидативного стресу атаці вільних радикалів в першу чергу піддаються не ліпіди, а білки плазматичних мембран [11]. Підтвердженням первинності пероксидного окиснення білків є наявність виражених змін при оксидативному стресі в ділянці анулярних ліпідів, що свідчить про провідну роль окисної модифікації білків (ОМБ) у деструк-

ції клітинної мембрани [12]. Найбільш поширений тип пошкодження білків — утворення карбонільних груп при їх окисненні, коли утворюються альдегідні та кетоніві групи амінокислотних залишків.



Рис. 3. Групи хворих із передпухлинною патологією МЗ за показниками прооксидантно-антиоксидантного співвідношення у гемолізаті (частка від загальної кількості обстежених хворих)

Аналіз вмісту продуктів ОМБ у плазмі крові хворих із передпухлинною патологією МЗ показав підвищення рівня як АДНФГ, так і КДНФГ (рис. 4).

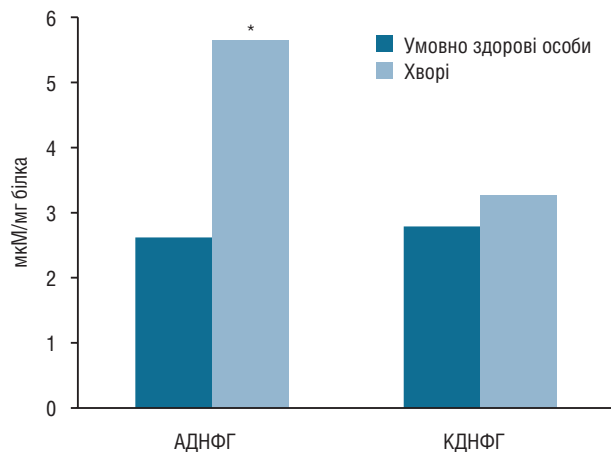


Рис. 4. Рівень АДНФГ та КДНФГ у плазмі крові умовно здорових осіб і хворих із передпухлинною патологією МЗ. * $p < 0,05$ порівняно з умовно здоровими особами

При цьому середньгрупове значення АДНФГ у хворих становило $5,7 \pm 0,5$ мкМ/мг білка, що у 2,2 раза ($p < 0,05$) перевищує показник умовно здорових осіб ($2,6 \pm 0,3$ мкМ/мг білка). Водночас рівень КДНФГ підвищувався лише в 1,2 раза. Відповідно, середньгрупові значення цього показника у хворих становили $3,3 \pm 0,2$, а у здорових — $2,8 \pm 0,2$ мкМ/мг білка.

Зростання рівня ОМБ може відбуватися як за рахунок пригнічення антиоксидантного захисту, так і шляхом взаємодії білків з продуктами пероксидного окиснення ліпідів, внаслідок чого можуть утворюватись стабільні комплекси. Слід зазначити, що при взаємодії активних форм кисню зі складними білками відбувається модифікація поліпептидного ланцюга і небілкового компонента, що має у своєму

складі негемове залізо [13]. Так відбувається й інактивація антиоксидантних ферментів.

Ключовими факторами, від яких залежить баланс ВРП у клітинах і тканинах, є ферменти антиоксидантного захисту, зокрема СОД і КАТ, що беруть участь, відповідно, в утилізації супероксидного радикала та пероксиду водню. Важливим є збалансована робота цих двох ферментів, оскільки при перетворенні супероксидного радикала ферментом СОД утворюється пероксид водню, який руйнує КАТ.

У крові хворих із передпухлинною патологією МЗ спостерігалася достовірна активація СОД в 1,7 раза (таблиця). Водночас при дослідженні активності КАТ констатували незначне, але достовірне ($p < 0,05$) зниження активності ферменту в 1,2 раза. Таким чином, у хворих відмічено значну активацію СОД на фоні дещо зниженої активності КАТ та підвищення варіабельності індивідуальних показників активності для обох ферментів порівняно з контрольною групою. Такі зміни в активності ферментів антиоксидантного захисту у хворих свідчать про розбалансування їх роботи та можливе виснаження КАТ, що може бути пов'язано і з частковою окисною модифікацією її білкової складової.

Таблиця

Активність ферментів антиоксидантного захисту у крові умовно здорових осіб і хворих з передпухлинною патологією МЗ

Показник	Умовно здорові особи	Хворі з передпухлинною патологією МЗ
Активність СОД, %	19,0 ± 1,8	33,1 ± 2,3*
Активність КАТ, мМ Н ₂ О ₂ /мл/хв	25,3 ± 1,1	21,2 ± 0,8*

* $p < 0,05$ порівняно з умовно здоровими особами.

Таким чином, у хворих із передпухлинною патологією МЗ відмічено активацію прооксидантних процесів та СОД зі зниженням активності КАТ. Тривала активація окисних процесів, як правило, зумовлює структурні порушення, що особливо небезпечні для ДНК, тому наявність стійких метаболічних змін, пов'язаних із генеруванням активних радикальних продуктів потребує корекції (профілактики) розвитку оксидативного стресу.

ВИСНОВКИ

1. У крові хворих із передпухлинною патологією МЗ виявлено достовірне збільшення прооксидантно-антиоксидантного співвідношення (у 1,7 раза), інтенсивності генерування супероксидного аніон-радикала (у 1,3 раза), рівня ОМБ (у 2,2 раза) із одночасною активацією СОД (в 1,74 раза) та зниження активності КАТ (в 1,2 раза) порівняно з показниками умовно здорових донорів.

2. Одержані результати свідчать про значні порушення окисного метаболізму та розвиток оксидативного стресу у хворих із передпухлинною патологією МЗ, що у свою чергу може слугувати причиною переходу передпухлинної патології у злякисну форму. Тому застосування профілактичних заходів, націлених на нівелювання порушень окисного

метаболізму у хворих із передпухлинною патологією МЗ, є вкрай необхідним.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Fedorenko ZP, Michailovich YYo, Goulak LO, *et al.* Cancer in Ukraine, 2016–2017. Incidence, mortality, activities of oncological service. Bull Natl Cancer Registry of Ukraine № 19. Kyiv: 2018. 134 p. (in Ukrainian).
2. Calaf GM, Urzua U, Termini L, Aguayo F. Oxidative stress in female cancers. *Oncotarget* 2018; **9**(34): 23824–42. doi: 10.18632/oncotarget.25323.
3. Kruk J, Aboul-Enein HY. Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Carcinogenesis: Implications of Oxidative Stress on the Progression and Development of Several Cancer Types. *Mini Rev Med Chem* 2017; **17** (11): 904–19. doi: 10.2174/1389557517666170228115324.
4. Liochev SI, Fridovich I. Lucigenin (Bis-N-methylacridinium) as a mediator of superoxide anion production. *Arch Biochem Biophys* 1997; **337** (1): 115–20.
5. Serkiz YaI, Druzhina NA, Khrienko AP, *et al.* The chemiluminescence blood at radiation exposure. Kyiv: Naukova Dumka, 1989. 176 p. (in Russian).
6. Levine RL, Garland D, Oliver CN, *et al.* Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 1990; **186**: 464–78.
7. Dubinina EE, Burmistrov SO, Khodov DA, Porotov IG. Oxidative modification of human serum proteins, method of its determination. *Voprosy Med Khimii* 1995; **41** (1): 24–6 (in Russian).
8. Korolyuk MA, Ivanova LI, Mayorova IG. Method for determining the activity of catalase. *Lab Delo* 1988; (1): 16–9 (in Russian).
9. Chevari S, Andyal T, Strenger Ya. Determination of antioxidant parameters of blood and their diagnostic value in old age. *Lab Delo* 1991; (10): 9–13 (in Russian).
10. Lakin GF. *Biometry*. Moscow: Vyschaya Shkola, 1990. 352 p. (in Russian).
11. Pochinok TV, Veselova TV, Gorobetz NI. Protein peroxidation and lipid peroxidation in children with undifferentiated dysplasia of connective tissue. *Sovremennaya Pediatriya* 2016; **74** (2): 36–40 (in Ukrainian).
12. Tukbekova B, Dyussenova S, Kizatova S, *et al.* Peculiarities of the clinical course of oxidative protein and lipid modification in children with acute rheumatic fever. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2016; **16** (4): 254–63.
13. Wang Z, Li S, Cao Y, *et al.* Oxidative stress and carbonyl lesions in ulcerative colitis and associated colorectal cancer. *Oxid Med Cell Longev* 2016; **2016**: 9875298. doi: 10.1155/2016/9875298.

THE FREE-RADICAL PROCESSES IN PERIPHERAL BLOOD OF PATIENTS WITH BENIGN BREAST DISEASE

M.O. Druzhyna, L.I. Makovetska, O.A. Glavin,
I.I. Smolanka, V.M. Mikhailenko

R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology,
Oncology and Radiobiology, NAS of Ukraine, Kyiv,
Ukraine

Summary. *Inflammatory pathological processes are accompanied by excessive formation of reactive oxygen species and the intensification oxidation biological substrates by free radical, leading to the development of oxidative stress. Such disturbances of oxidative metabolism can cause cells malignisation. Objective: to investigate the state of free radical processes in peripheral blood of patients with benign breast disease as a prognostic test of the breast can-*

cer risk. **Object and methods:** the study was carried out on blood samples obtained from 96 patients diagnosed with benign breast disease. We have studied the intensity of superoxide anion radical generation by lymphocytes, the prooxidant-antioxidant ratio in hemolizate, the level of proteins oxidation, and the activity of antioxidant enzymes: superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT). **Results:** blood samples of benign breast disease patients show an increase: 1.7-fold ($p < 0.05$) in the prooxidant-antioxidant ratio, 1.3-fold ($p < 0.05$) in the rate of superoxide anion radical generation, 2.2-fold ($p < 0.05$) on oxidative modification of proteins in plasma, 1.7-fold in activation of SOD, but 1.2-fold ($p < 0.05$) decrease in CAT activity as compared to healthy subjects. **Conclusions:** the obtained results suggest marked enhancement of free radical processes on the background of the unbalanced performance of antioxidant enzymes, indicating significant disturbanc-

es of the oxidative metabolism and the development of oxidative stress in patients with benign breast disease. Therefore, it is recommended to carry out preventive measures aimed at reducing the disturbances of oxidative metabolism in patients with benign breast disease.

Key Words: benign breast disease, free-radical processes, oxidative metabolism, peripheral blood.

Адреса для листування:

Дружина М.О.

03022, Київ, вул. Васильківська, 45

Інститут експериментальної патології,

онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького

НАН України

E-mail: tsigun@ukr.net

Одержано: 23.11.2018