

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ УКРАЇНИ
СІМФЕРОПОЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

На правах рукопису

ЛИСЕНКО Ірина Миколаївна

СТАН СТРУКТУРИ ТА ФУНКЦІОНАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ
СИРОВАТКОВОГО АЛЬБУМІНУ В НОРМІ
ТА ПРИ ПОРУШЕННІ ФУНКЦІЇ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ

03.00.04 - біохімія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Сімферополь - 1997



AB 38.577

Роботу виконано на кафедрі біохімії Сімферопольського держуніверситету ім. М.В.Фрунзе.

Науковий керівник - доктор біологічних наук,
професор Толкачова Н.В.

Офіційні опоненти - доктор медичних наук,
професор Ажицький Г.Ю.
кандидат біологічних наук,
Руднева І.І.

Провідна установа - Київський державний університет
ім. Т. Шевченка,
кафедра біохімії

Захист дисертації відбудеться 12 листопада 1997 р.
о 14 годині на засіданні спеціалізованої ради К.20.02.02
при Сімферопольському державному університеті.

Адреса університету: 333036, Крим, м.Сімферополь,
вул.Ялтинська, 4.

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці університету.

Автореферат розіслано "11 жовтня" 1997 р.

Вчений секретар
спеціалізованої ради,
кандидат біологічних наук,
доцент

А.В.Янцев

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність проблеми. За нашого часу глибокі порушення координації метаболічних процесів розцінюються як один з важливіших механізмів розвитку багатьох захворювань, зокрема, онкологічних. Серед систем, які беруть участь в регуляції різних функцій організму істотне значення має альбумін сироватки крові, як переносник великої кількості екзогенних та ендогенних метаболітів, сприяючи, таким чином, засвоєнню клітинами різноманітних біологічно-активних речовин.

При різних фізіологічних станах організму альбумін набуває фізикохімічної гетерогеності, зв'язаної, головним чином, зі змінами в кількості та складу лігандів та конформаційними модифікаціями білка. У системі теоретичних та практичних проблем, розкриваючих характер транзиторних змін сироваткового альбуміну, особливе значення мають дослідження, початі у 50-і роки Г.В. Троїцьким і які набули продовження в роботах біохіміків його школи. Вперше вказане їм припущення про пост-синтетичну модифікацію молекул альбуміну знайшло своє підтвердження в подальших дослідженнях, де були приведені переконливі докази гетерогеності СА як в умовах розвитку захворювання, так і при адаптації організму до фізичних навантажень (Г.В.Троїцький, 1969, 1972, Д.А.Соркіна, 1988, Г.Ю.Ажицький, 1989, С.М.Борисенко; 1990, Н.В.Толкачова, 1991).

Пильна увага дослідників спрямована на біохімічні зміни в організмі при онкологічних захворюваннях. В сироватковому альбуміні хворих із злоякісними пухлинами різних локалізацій показано значні зміни лігандного, зокрема, вуглеводного та жирнокислотного складу, а також конформаційні пошкодження, що робить його перспективним об'єктом дослідження (С.М.Борисенко, Г.В.Троїцький, 1984, В.М.Соркін та ін., 1985, Н.В.Толкачова та ін., 1991). Втім, не має поки достатнього освітлення в літературі транспортна ролі СА та його конформаційних змін на різних стадіях пухлинного процесу, особливо на ранніх, а також у хворих в стані, що розцінюється, як предраковий. Значний інтерес викликає динаміка зв'язування сироватковим альбуміном жирних кислот родин ω6 та ω3, окрема роль яких у розвитку раку неодноразово підкреслюється останнім часом (Karmali et al., 1984, Trosco et al., 1991, Hasler, Gonzalez, 1992, Б.С.Хишиктув та ін., 1994).

Мета і завдання дослідження. Метою даної роботи було вивчення структури та функціонального стану сироваткового альбуміну в транспорті лігандів ліпідної та вуглеводної природи у хворих на доброякісні пухлини та рак молочної залози різних ступенів важкості. До конкретних завдань дослідження входило:

- вивчення транспорту сироватковим альбуміном лігандів ліпідної та вуглеводної природи та рівню його глікозування в залежності від характеру та стадії захворювання;
- визначення функціональних можливостей сироваткового альбуміну в зв'язуванні жирних кислот різних родин при розвитку пухлинного процесу;
- виявлення залежності резервної функціональної активності альбуміну плазми крові та рівню його модифікованої форми від характеру та ступіні важкості захворювання;
- визначення структури та термостабільності сироваткового альбуміну в залежності від його лігандного навантаження та характеру захворювання.

Наукова новизна. Вивчена функціональна роль СА в транспорті ліпідів в залежності від характеру та ступеню важкості онкопатології молочної залози. Дана оцінка якісного та кількісного складу жирних кислот, зв'язаних альбуміном на різних стадіях раку молочної залози та у хворих на мастопатію. Встановлено факт вибіркового транспорту альбуміном жирних кислот різних родин в ході розвитку пухлинного процесу. Показана залежність резервної функціональної активності та вмісту модифікованої форми білка від важкості захворювання. Вперше дана оцінка термостабільності сироваткового альбуміну при онкопатології.

Практичне та теоретичне значення роботи. Характер зв'язаних альбуміном сироватки крові поліненасичених жирних кислот різних родин, рівень лігандів ліпідної природи, а також вміст модифікованої форми альбуміну та резервна функціональна активність білка є показниками, які відбивають неспецифічну реакцію альбуміну на метаболічні порушення, що відбуваються в організмі під впливом розвитку пухлини.

Отримані результати свідчать про те, що визначення часткості в сироватковому альбуміні жирних кислот родини $\omega 3$ та відношення ПНЖК родин $\omega 6/\omega 3$ може бути використано, разом з іншими дослідженнями, в процесі відбору осіб з підвищеним онкологічним ризиком та в якості

диференційного тесту початкових стадій розвитку рака молочної залози, а також служити основою для розробки корекції харчування онкологічних хворих.

Дані про функціональні та структурні особливості сироваткового альбуміну при онкопатології молочної залози використовуються в лекційному матеріалі спецкурсів "Біохімія крові", "Біохімія вуглеводів та ліпідів", "Структура та функціональні властивості білків" на кафедрі біохімії Сімферопольського держуніверситету.

Положення, що виносяться на захіст

- Кількість лігандів ліпідної та вуглеводної природи в сироватковому альбуміні підвищується по мірі розвитку пухлинного захворювання та не залежить від характеру патологічного процесу.

- На початкових стадіях злоякісного росту відзначено дефіцит альбумін-зв'язаних жирних кислот, головним чином, родини ω3.

- По мірі поширення пухлинного процесу виявлено зростання рівню модифікованої форми сироваткового альбуміну та зниження резервної функціональної активності білка, що свідчить про активізацію його транспортної функції.

- На пізніх стадіях розвитку злоякісної пухлини відзначено змінення вторинної структури альбуміну крові по типу деспіралізації, що корелює з вмістом метаболітів вуглеводної природи.

- Термостабільність сироваткового альбуміну знижена на початкових стадіях раку молочної залози.

Апробація роботи. Матеріали дисертації доповідались на з'їзді Американського Фізичного Суспільства, 21-25 березня 1994 року, Піттсбург, на симпозіумі "Біологічні механізми старіння", 12-14 травня 1994 року, Харків, на VI Міжнародному з'їзді по біохімії ліпідів, 3-6 жовтня 1994 р., Санкт-Петербург, на наукових конференціях професорсько-викладацького складу Сімферопольського держуніверситету (1994, 1995, 1996 р.р.) та на розширеном засіданні кафедри біохімії.

Декларація особистого внеску автора. Автором самостійно здійснено виділення альбуміну сироватки крові, експериментальні дослідження, статистична та комп'ютерна обробка отриманих даних, аналіз та викладення матеріалу. Обговорення результатів газо-рідинної хрома-

тографії жирних кислот та диференційної скануючої мікрокалориметрії здійснено за консультацією спеціалістів Інституту харчування РАМН та Інституту елементів харчування РАН, відповідно.

Структура та об'єм роботи. Дисертація складається з вступу, огляду літератури (4 розділи), опису матеріалів та методів, результатів дослідження (5 розділів), 6 висновків та списку літератури (230 джерел, з них 118 - іноземних авторів). Дисертаційна робота викладена на 123 сторінках друкованого тексту, включаючи 25 сторінок списку літератури. Текст проілюстрован 14 таблицями та 20 рисунками.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

В роботі використовували альбумін сироватки крові хворих на фіброаденому, очагову мастопатію та рак молочної залози першої - четвертої стадій. Взяття крові проводили за медичними показаннями, діагнози було встановлено лікарями онкологічного центру м.Сімферополю та підтверджено під час операції та пато-гістологічними дослідженнями. Контрольну групу складали препарати альбуміну, в ділені з сироватки крові практично здорових осіб (донорів). Кров донорів отримували на станції переливання крові м.Сімферополя. Всього обстежено 40 донорів та 187 хворих.

Альбумін сироватки крові виділяли за допомогою препаративного електрофорезу у 7% поліакріламідному гелі (ПААГ) (Г.Ю.Ажицький, С.М.Багдасар'ян, 1975). Аналіз чистоти та гомогеності отриманих препаратів білка проводили методом дискелектрофорезу в ПААГ (Davis, 1964). Кількісний вміст альбуміну визначали методом Лоурі (Дж.Міллер, 1976).

Вміст загальних ліпідів в альбуміні виявляли методом Блюра в модифікації Брагдон, з екстракцією ліпідів за методикою Фолча (Folch et al., 1957). Кількість загальних вуглеводів (гексоз), зв'язаних альбуміном, визначали орциновим методом по Вінцлеру (Готтшалк А., 1969).

Визначення рівню модифікованої форми в білку проводили методом переосадження в системі ТХУ-етанол, запропонованим С.Н.Багдасар'ян та ін. (1979). Вміст модифікованої форми представлено у відсотках від загальної кількості альбуміну.

Газо-хроматографічний аналіз метилових ефірів жирних кислот

проводили на хроматографі "Intersmat" (Франція) з пламенево-іонізаційним детектором. Екстракт ліпідів з альбуміну отримували методом Фолча. Жирні кислоти метілювали, застосовуючи 14%-ний тетрафлуорид бора в метанолі (Morris, Smith, 1964). Склад жирних кислот розраховували методом внутрішнього нормування на інтерпретаторі-приставці "Intersmat", індивідуальні жирні кислоти представлено у відсотках від загальної суми. Для уточнення хімічної природи деяких компонентів суміші жирних кислот використовували хромато-мас-спектрометрію. Дослідження проводили на хромато-мас-спектрометрі "Фінніган 3200Г" з автоматичною системою обробки даних. Експерименти виконано в лабораторії ліпідного обміну Інституту харчування РАМН, м.Москва.

Резервну функціональну активність альбуміну визначали флуоресцентним методом за допомогою зондів АНС (1-анілінонаф-талін-8-сульфонат) та К-37, що входить до діагностичного набору "Зонд-31". Інтенсивність флуоресценції зондів в білкових розчинах оцінювали на установці "Зонд-31". Концентрація розчинів білка складала $3,7 \cdot 10^{-6}$ М, АНС - $1,7 \cdot 10^{-5}$ М (Остоловський Е.М. та ін., 1990). Результати представлено у відсотках від норми.

Власну флуоресценцію альбуміну, зумовлену наявністю залишка триптофану, в нормі та при патологічному стані організму визначали на спектрофлуориметрі конструкції К.К.Туровой та ір. (1974 р., ін-т Цитології, Ст-Петербург) при тій ж концентрації білка. Ступінь анізотропії люмінесцентного випромінювання виявляли за інтенсивністю світіння, що була замірена у максимумі відповідної смуги флуоресценції при паралельному та перпендикулярному стані поляризаторів.

Вторинну структуру білка оцінювали методом кругового дихроїзму (КД). Спектри КД реєстрували на дихрографі "Jasco" J-500A (Японія) в 1,0 мм кюветі при температурі 20°C. Спектри знімали в діапазоні хвиль від 240 до 200 нм. За отриманими спектрами будували графіки питомої еліптичності. Відсотковий вміст вторинних структур оцінювали за методом Янга (Chen, Yong, Mertinez, 1971) за допомогою програмного пакету "STRUCTURE" (Інститут Імунології, м. Любучани Московської обл.).

Термостабільність сироваткового альбуміну визначали методом диференційної скануючої мікрокалориметрії на установці DASM-4 (на базі Інституту Елементів Харчування, м.Москва) в діапазоні температур від 20

до 135 °С. Білок розчинювали у 0,02М фосфатному буфері. Математичну обробку кривих плавління та розрахунок питомої теплоти денатурації здійснювали за допомогою програм "DASM" та "ESIPLLOT".

Отримані дані оброблено з використанням метода малих вибірок по Ойвіну (Ойвін І.А., 1965). Коефіцієнти кореляції розраховували за допомогою пакета програм "STATGRAF".

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

1. Вплив характеру та стадії пухлинного процесу на вміст ліпідів та вуглеводів в альбуміні крові

Рівень загальних ліпідів (ЗЛ) у сироватковому альбуміні при всіх вивчених патологіях був вірогідно вищий, ніж в нормі (табл. 1). У хворих на рак відзначено послідовне зростання концентрації цих лігандів в СА в залежності від ступеню поширення пухлини, рівень вірогідності різниці порівняно з нормою во всіх випадках був не більше, ніж 0,05. Треба відзначити, що у хворих на фіброаденому та мастопатію вміст ЗЛ був вірогідно вищий, ніж на першій стадії раку, та приблизно відповідав такому на другій та третій стадії. Таким чином, незважаючи на яєну залежність даного показника від важкості захворювання, характер пухлинного процесу - доброякісний чи злоякісний - істотно не відбивається на його рівні. Не можна також не відзначити, що при раці молочної залози вміст ЗЛ навіть на пізніх ступенях захворювання значно нижче, ніж у хворих на рак печінки, кишечника, легенів (Н.В.Толкачова та ін., 1991, Бабусайлі А.А., 1995). Можливо, істотне значення має ступінь участі ураженого органу в метаболізмі ліпідів.

Для більш повної характеристики лігандного навантаження СА нами визначено вміст гексоз в білку, при цьому виявлена активізація гликозування в альбуміні хворих з онкопатологією молочної залози, причому вже при доброякісних пухлинах, та в предраківому стані (у практично здорових осіб - $2,86 \pm 0,26$ мг/100 мг білка, $4,82 \pm 0,39$ та $3,14 \pm 0,30$ мг/100 мг білка у хворих на фіброаденому та мастопатію, відповідно). На виражених стадіях злоякісного процесу утримання гексоз в СА було значно вище та складало в середньому $7,88 \pm 0,71$ мг/100 мг альбуміну.

Таблиця 1

Вміст загальних ліпідів в альбуміні сироватки крові в нормі та при онкопатології молочної залози ($M \pm m$)

Обстежені групи	Кількість обстежених	Загальні ліпіди, мг/100 мг білка	P1	P2
Донори	20	2,65 \pm 0,13	-	
Хворі на:				
фіброаденому	20	4,06 \pm 0,16	<0,01	н/в
мастопатію	25	3,89 \pm 0,22	<0,05	н/в
рак МЗ:				
T ₁	5	3,84 \pm 0,17	<0,05	-
T ₂	17	4,24 \pm 0,33	<0,01	н/в
T ₃	30	4,95 \pm 0,30	<0,01	<0,05
T ₄	5	7,27 \pm 0,43	<0,01	<0,01

Примітка: P1 - рівень вірогідності різниці порівняно до контрольної групи, P2 - рівень вірогідності різниці порівняно до групи хворих на рак молочної залози (МЗ) першої стадії.

У ліофілізованих препаратах СА вміст вуглеводів був нижчий за свіжі, що, можливо, пояснюється окисленням чи відновленням під час ліофілізації нековалентно зв'язаних вуглеводних залишків (Троїцький Г.В., 1991). В нормі даний показник склав 2,10 \pm 0,17 мг/100 мг білка, у хворих на фіброаденому та мастопатію - 2,46 \pm 0,29 та 2,13 \pm 0,13 мг/100 мг білка, відповідно, на першій та другій стадіях раку - 2,38 \pm 0,40 та 2,26 \pm 0,20 мг/100 мг альбуміну. Втім, на пізніх стадіях раку рівень гексоз в ліофілізованому альбуміні був вірогідно вищий, ніж у нормі (3,36 \pm 0,28 на третей та 2,98 \pm 0,28 мг/100 мг білка на четвертій стадії, $p < 0,05$). Певно, в цьому випадку проявляється ковалентне лігандування СА по дев'ятому лізіновому залишку, що було виявлено при онкологічних захворюваннях С.М.Багдасар'ян та ін. (1980).

2. Визначення спектру жирних кислот в альбуміні хворих з онкопатологією молочної залози

Газорідинна хроматографія альбумін-зв'язаних жирних кислот (ЖК) виявила 25 насичених та ненасичених жирних кислот від C₁₂ до C₂₂ (табл.2, 3). В альбуміні хворих та здорових осіб утримувались однакові жирні кислоти, втім їх кількісні відносини мали суттєві відмінності. Так, виявлено зниження вмісту альбумін-зв'язаних поліненасичених ЖК (ПНЖК) у хворих на рак молочної залози порівняно з нормою (головним чином, за рахунок родин ω6 та ω3), особливо виразне на першій стадії захворювання (рис.1). При цьому заслуговує уваги той факт, що вміст насичених жирних кислот змінюється обернено рівню ПНЖК, на першій стадії раку відношення НЖК/ПНЖК майже в 2 рази перевищує норму. При цьому, сума моноенових ЖК залишається практично незмінною. В предраківому стані подібних змін не виявлено.

Зниження кількості ПНЖК при раці показано багатьма дослідниками, як альбумін-зв'язаних - у хворих з онкопатологією гепато-дуоденальної зони, легенів, так і в мембранах пухлинних клітин, еритроцитів при раці молочної залози (Блюдзін Ю.А. та ін., 1994, Хишиктуєв Б.С. та ін., 1994, Wright et al., 1992). Таке явище пояснюється авторами як наслідок активізації процесів перекисного окислення. Втім виявленій нами факт низького утримання цих метаболітів на першій стадії раку, навіть порівняно з більш вираженими стадіями, певно, має інше пояснення.

Звертає до себе увагу те, що динаміка ПНЖК при раці зв'язана з падінням парціальних долей жирних кислот родин ω6 та ω3, головним чином, за рахунок лінолевої та ліноленової кислот, особливо на початкових ступенях раку. Недостатність 18:2 та 18:3 в сироватковому альбуміні була відзначена раніше у хворих на рак позапечінкових жовчних протоків та заочередного обширу (Н.В.Толкачова, 1991). Низький вміст 18:2 виявлено також в ліпідах плазми крові при раці легенів (Хишиктуєв Б.С. та ін., 1994). Недостатність незамінних жирних кислот на початкових стадіях раку молочної залози, можливо, свідчить про активне їх споживання клітинами злоякісного новоутворення з руслу крові. Проте даний факт також свідчить на користь думки про те, що розвиток ракових пухлин даної локалізації може бути стимульован жирнокислотним складом харчування (Блюдзін Ю.А. та ін., 1994).

Таблиця 2

Склад та деякі сумарні показники альбумін-зв'язаних жирних кислот в нормі та у хворих на онкопатологію молочної залози ($M \pm m$)

Жирні кислоти	Донори	Хворі на мастопатію	Хворі із злоякісними пухлинами, T ₁
12:0*	2,82±0,22	0,44±0,04	2,15±0,20
14:0	4,92±0,48	3,32±0,29	4,25±0,37
14:1	1,06±0,09	0,71±0,06	0,54±0,05
15:0	2,29±0,21	0,70±0,08	1,00±0,09
16:0	25,05±2,49	26,29±2,60	32,18±3,00
16:1	11,05±1,10	10,06±1,00	10,02±1,00
17:0:1	0,56±0,05	0,34±0,03	0,30±0,02
18:0	8,42±0,78	9,48±0,93	9,38±0,09
18:1	21,44±2,10	23,75±2,27	26,44±2,59
18:2	12,04±1,15	12,02±1,18	7,25±0,71
18:3	3,13±0,31	2,00±0,15	0,30±0,02
20:0	0,30±0,03	0,50±0,05	0,37±0,01
20:1	1,60±0,14	2,00±0,21	0,35±0,03
20:2	0,47±0,04	0,14±0,01	0,33±0,02
20:3	0,59±0,05	0,38±0,03	0,30±0,02
20:4	1,60±0,09	1,10±0,09	1,43±0,13
22:2	0,32±0,03	1,12±0,09	0,50±0,04
20:5	0,15±0,01	0,47±0,04	0,35±0,03
23:0	0,30±0,02	1,10±0,10	0,30±0,02
22:3	0,24±0,02	0,47±0,03	0,30±0,03
22:4+24:1	1,34±0,12	2,87±0,28	1,76±0,15
22:5	0,17±0,01	0,32±0,03	1,10±0,01
22:6	0,14±0,01	0,42±0,03	0,15±0,005
<u>НЖК</u>			
ПНЖК	2,27	2,11	4,18
Σω6 (18:2+ +20:4)	13,64±1,30	13,12±1,33	8,68±0,69
Σω3 (18:3+ +20:5+ +22:5+22:6)	3,59±0,35	3,21±0,32	0,90±0,08
ω6/ω3	3,80	4,09	9,64
Σω9 (18:1+ +20:3)	22,03±2,15	24,13±2,30	26,75±2,61

* - перше число відповідає кількості атомів вуглецю в молекулі кислоти, друге - після двокрапки - кількості подвійних зв'язків.

Таблиця 3

Склад та деякі сумарні показники альбумін-зв'язаних жирних кислот у хворих на онкопатологію молочної залози ($M \pm m$)

Жирні кислоти	Хворі із злоякісними пухлинами:		
	T2	T3	T4
12:0*	2,19±0,21	2,67±0,25	4,08±0,31
14:0	1,62±0,10	2,98±0,30	4,29±0,42
14:1	0,70±0,05	0,30±0,03	0,47±0,04
15:0	3,47±0,43	1,40±0,16	0,72±0,07
16:0	32,44±3,09	26,71±2,62	33,01±3,30
16:1	12,00±1,10	10,73±1,04	6,70±0,68
17:0:1	0,29±0,02	0,43±0,03	0,75±0,07
18:0	10,55±0,97	7,51±0,75	10,96±1,08
18:1	20,78±2,06	25,78±2,52	20,88±1,96
18:2	9,13±0,87	10,97±1,03	9,32±0,93
18:3	0,30±0,02	1,09±0,08	0,44±0,04
20:0	0,40±0,04	1,20±0,10	0,54±0,05
20:1	0,70±0,05	0,83±0,06	0,16±0,01
20:2	0,41±0,03	0,08±0,007	0,72±0,07
20:3	0,25±0,02	0,09±0,009	0,44±0,02
20:4	0,25±0,02	2,41±0,24	1,74±0,15
22:2	0,18±0,01	0,95±0,09	0,52±0,05
20:5	0,06±0,003	0,08±0,006	0,20±0,01
23:0	0,07±0,007	0,54±0,04	0,45±0,04
22:3	0,18±0,01	0,10±0,01	0,35±0,03
22:4+24:1	1,87±0,17	2,41±0,22	2,90±0,23
22:5	0,25±0,02	0,50±0,04	0,15±0,01
22:6	0,40±0,04	0,89±0,08	0,20±0,02
<u>НЖК</u>			
ПНЖК	3,90	2,44	3,05
Σω6 (18:2+			
+20:4)	9,38±0,90	13,38±1,10	11,06±1,05
Σω3 (18:3+			
+20:5+	1,80±1,15	1,91±0,10	1,00±0,09
+22:5+22:6)			
ω6/ω3	5,21	7,00	11,06
Σω9 (18:1+			
+20:3)	20,03±2,08	25,88±2,50	21,32±1,98

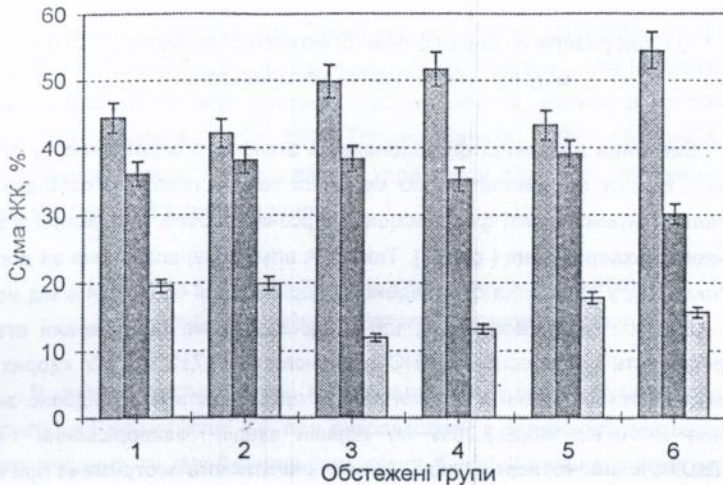


Рис. 1. Динаміка сумарних показників альбумін-зв'язаних жирних кислот у хворих з онкопатологією молочної залози.

1 - донори, 2 - хворі на мастопатію, 3-6 - хворі на рак молочної залози 1й-4й стадій, відповідно

■ НЖК ■ МНЖК □ ПНЖК

На першій стадії раку молочної залози відзначено різке зростання відношення сум жирних кислот $\omega 6/\omega 3$, майже в 2,5 рази порівнянно з донорами (табл. 2). Значне збільшення цього показника було виявлено також на початкових стадіях раку легенів, проте в цьому випадку зріст спостерігався вже в предраковому стані (Бабусайлі А.А., 1995). Можливо, даний показник є перспективним в якості діагностичного тесту початкових стадій розвитку злоякісної пухлини.

Таким чином, в сироватковому альбуміні хворих на рак молочної залози виявлено порушення жирнокислотного складу порівнянно з нормою та хворими на мастопатію, у бік зниження кількості поліненасичених жирних кислот, головним чином, за рахунок родин $\omega 6$ та $\omega 3$. Низький вміст таких жирних кислот, як лінолева та ліноленова, особливо виражений на першій стадії раку, а також високий рівень відношення $\omega 6/\omega 3$ свідчать про пригнічення метаболізму ЖК цих родин у онкологічних хворих, що показує роль альбуміну як можливого індикатора канкрофілії.

3. Стан резервної функціональної активності сироваткового альбуміну при онкопатології молочної залози

Вивчення резервної функціональної активності сироваткового альбуміну хворих на онкопатологію молочної залози показало послідовне зниження інтенсивності флуоресценції в розчинах білка в залежності від важкості захворювання (рис.2). Так, РФА альбуміну, визначена за допомогою АНС, у хворих на фіброаденому дорівнювала $80,2 \pm 2,24\%$ від норми, тоді як при мастопатії, що розцінюється як предраківий стан, інтенсивність флуоресценції АНС дорівнювала $69,7 \pm 2,10\%$. У хворих із злоякісними пухлинами молочної залози простежується послідовне зниження РФА від $68,2 \pm 3,25\%$ на першій стадії захворювання до $52,8 \pm 0,65\%$ на четвертій стадії. Аналогічна залежність отримана при використанні зонду К-37: в цьому випадку інтенсивність флуоресценції змінювалась від $64,4 \pm 1,90\%$ у хворих на фіброаденому до $44,6 \pm 1,60\%$ на четвертій стадії раку. Таким чином, при онкопатології молочної залози відзначено зменшення кількості вільних міст зв'язку на молекулі альбуміну, що, очевидно, пояснюється зростанням лігандного навантаження

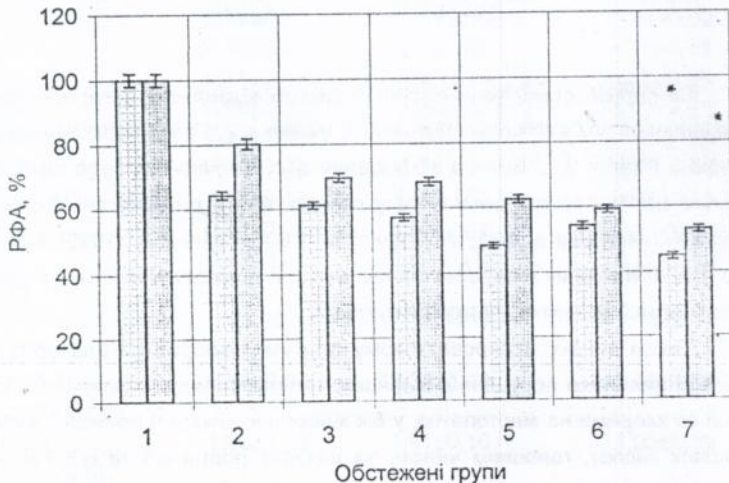


Рис. 2. Резервна функціональна активність сироваткового альбуміну у хворих з онкопатологією молочної залози.

1 - донори, 2 - хворі на фіброаденому, 3 - хворі на мастопатію, 4 - 7 - хворі на рак молочної залози 1й-4й стадій, відповідно

□ К-37 □ АНС

білка або його модифікацією. Зниження зв'язуючої здібності для флуоресцентних зондів показано й для інших захворювань - для ниркової недостатності, вірусного гепатиту, цирозу печінки, деяких онкологічних патологій (Іванов А.І. та ін., 1993, Толкачова Н.В., 1994). Очевидно, що дане явище носить неспецифічний характер і залежить, головним чином, від важкості захворювання.

4. Стан структури та термостабільність сироваткового альбуміну при онкопатології молочної залози

В наших дослідженнях представляло інтерес порівняти ступінь структурної модифікації СА при онкопатології в залежності від важкості захворювання та функціонального стану білка. Загальна оцінка вмісту модифікованої форми альбуміну була проведена методом переосадження в системі ТХУ-етанол, дослідження структурних параметрів СА - методами кругового дихроїзму (КД) та флуоресцентної спектроскопії.

У хворих із злюкисними новоутвореннями молочної залози відзначено послідовне зростання рівню модифікованої форми сироваткового альбуміну в залежності від стадії захворювання. В альбуміні хворих з першою стадією раку, вміст модифікованої форми був в 2,5 рази вищий, ніж в нормі (табл.4). Альбумін хворих з другою та третьою стадіями раку, по даному показнику майже в два рази перевищують T_1 , втім практично не розрізняються між собою. При поширенні злюкисного процесу утримання МФА досить значне, що свідчить про істотне молекулярне пошкодження альбуміну на даному етапі розвитку захворювання.

У хворих на фіброаденому та мастопатію рівень МФА був вірогідно вищим, ніж на першій стадії раку, та приблизно відповідає таким на другій та третій стадії раку молочної залози. Отримані результати, а також численні дані літератури, що свідчать про зріст МФА при інших патологіях, підтверджують неспецифічність цього показника.

В представлений роботі отримана досить висока кореляція рівню МФА та вмісту загальних ліпідів на різних стадіях пухлинного процесу, коефіцієнт кореляції складав 0,913 (рис.3). Подібний взаємозв'язок виявлен також між вмістом модифікованої форми та РФА сироваткового альбуміну (коефіцієнт кореляції -0,769) (рис. 4). Таким чином, як і зниження резервної функціональної активності, зріст рівню модифікації СА свідчить

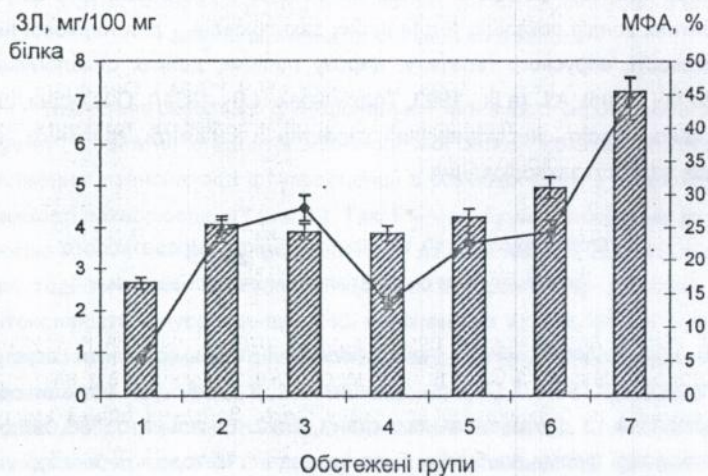


Рис. 3. Залежність рівню модифікованої форми альбуміну від вмісту лігандів ліпідної природи.

1 - донори, 2 - хворі на фіброаденому, 3 - хворі на мастопатію, 4-7 - хворі на рак молочної залози 1й-4й стадій, відповідно

▨ Вміст загальних ліпідів —◆— Рівень модифікованої форми

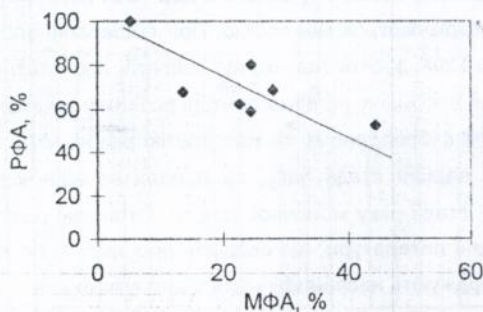


Рис. 4. Залежність резервної функціональної активності сироваткового альбуміну від рівню його модифікованої форми

про посилення транспортної функції альбуміну та перевантаження білка лігандами при патології.

Таблиця 4

Рівень модифікованої форми альбуміна крові
в нормі та при патології (M±m)

Обстежені групи	Кількість обстежених	Рівень МФА, %	P1	P2
Донори	20	5,31±0,33	-	
Хворі на:				
фіброаденому	20	24,43±0,98	<0,001	<0,01
мастопатію	23	27,91±2,40	<0,001	<0,01
рак МЗ:				
T ₁	5	13,64±1,10	<0,001	-
T ₂	15	22,58±1,99	<0,001	<0,01
T ₃	27	24,32±0,65	<0,001	<0,01
T ₄	5	44,41±0,99	<0,001	<0,01

Примітка: P1 - рівень вірогідності різниці порівняно до контрольної групи, P2 - рівень вірогідності різниці порівняно до групи хворих на рак молочної залози (МЗ) першої стадії.

Аналіз власної флуоресценції альбуміну у хворих на рак молочної залози порівняно з донорами та хворими на мастопатію виявив тенденцію до зміщення спектру флуоресценції у довгохвильову область, що відтворюється в деякому збільшенні відношення E_{360}/E_{365} (табл. 5). Вірогідне змінення даного показника відзначено на третій стадії раку, що свідчить про слабе "розпушення" гідрофобного оточення залишку триптофана (Пермяков Е.А., Дейкус Г.Ю., 1995). Втім, поляризація власної флуоресценції СА практично не змінилась. Таким чином, істотних змін укладки гідрофобного ядра молекули альбуміну при вивчених захворюваннях не знайдено.

Дослідження спектрів КД також показало вірогідне змінення вторинної структури білка тільки на виражених стадіях канцерогенезу (табл.б.). Так, на третій стадії раку вміст α -спіралей був майже на 20% нижчий, ніж у донорів, що свідчить про порушення конформації альбуміну по типу

деспіралізації. У хворих на фіброаденому, мастопатію та рак молочної залози першої стадії різниця порівнянно з нормою не вірогідна.

Таблиця 5

Деякі флуоресцентні параметри сироваткового альбуміну
донорів та онкологічних хворих ($M \pm m$)

Обстежені групи	Кількість зразків	Поляризація власної флуоресценції	E_{360}/E_{365}	P
Донори	10	$0,224 \pm 0,001$	$1,057 \pm 0,009$	-
Хворі на: мастопатію	10	$0,228 \pm 0,001$	$1,039 \pm 0,029$	н/в
рак МЗ:				
T_2	10	$0,227 \pm 0,001$	$1,084 \pm 0,028$	н/в
T_3	10	$0,226 \pm 0,003$	$1,105 \pm 0,017$	<0,05

Примітка: P1 - рівень вірогідності різниці зміщення спектру E_{360}/E_{365} порівнянно до контрольної групи.

Звертає до себе увагу істотна кореляція концентрації гексоз та вмісту α -спіралей в СА, коефіцієнт кореляції складав -0,88. Одержана закономірність узгоджується з висновками С.Н.Борисенко (1978) про те, що головна кількість альбумін-зв'язаних вуглеводів реєструється во фракції модифікованого білка. Певно, саме ковалентно зв'язані вуглеводи в найбільшій мірі сприяють структурній модифікації СА.

Методом диференційної скануючої мікрокалориметрії виявлена загальна тенденція до зниження термостабільності СА при раку молочної залози, причому найменша питома ентальпія денатурації білка була отримана на першій стадії раку - майже в 1,5 рази нижче, ніж у нормі (табл. 7). У хворих на фіброаденому та мастопатію питома теплота денатурації СА близька до норми. На виражених стадіях канцерогенезу показано зниження температури денатурації білка, що також свідчить про зменшення його термостабільності.

Таблиця 6

Вміст спіральних структур в сироватковому альбуміні в нормі та при патології ($M \pm m$)

Обстежені групи	Кількість зразків	Вміст α -спіралей, %	P
Донори	5	55,0 \pm 1,5	-
Хворі на:			
фіброаденому	5	51,0 \pm 3,0	н/в
мастопатію	5	50,0 \pm 3,5	н/в
рак МЗ:			
T ₁	5	53,0 \pm 1,5	н/в
T ₃	5	43,5 \pm 1,0	<0,05

Примітка: P - рівень вірогідності різниці порівняно до контрольної групи.

Таблиця 7

Питома теплота денатурації сироваткового альбуміну в нормі та при онкопатології ($M \pm m$)

Обстежені групи	Кількість зразків	Питома теплота денатурації, Q, Дж/г	P
Донори	10	22,90 \pm 0,09	-
Хворі на:			
фіброаденому	10	21,01 \pm 0,18	<0,05
мастопатію	10	21,90 \pm 0,96	н/в
рак МЗ:			
T ₁	5	14,90 \pm 0,13	<0,05
T ₂	10	18,25 \pm 0,16	<0,05
T ₃	10	20,82 \pm 0,33	<0,05
T ₄	5	18,52 \pm 0,17	<0,05

Примітка: P - рівень вірогідності різниці порівняно до контрольної групи.

Таким чином, в результаті проведених досліджень виявлено істотні зміни лігандного складу та структури сироваткового альбуміну онкологічних хворих в залежності від стадії пухлинного процесу та характеру за хворювання. Отримані дані поширюють існуючі уявлення про характер метаболічних зрушень в організмі та ролі сироваткового альбуміну як транспортного білка при розвитку злоякісних новоутворень.

ВИСНОВКИ

1. Показано вірогідне збільшення альбумін-зв'язаних ліпідів у хворих з доброякісними та злоякісними новоутвореннями молочної залози, що відбиває неспецифічний характер даної реакції організму.

2. Виявлено зниження вмісту ПНЖК $\omega 6$ та $\omega 3$ в ліпід-альбуміновому комплексі, що супроводжується вираженим зростом відношення жирних кислот цих родин при раку молочної залози переважно за рахунок дефіциту жирних кислот $\omega 3$.

3. Встановлено, що резервна функціональна активність сироваткового альбуміну при онкопатології молочної залози знижується послідовно в залежності від ступеню важкості захворювання.

4. Показано, що вміст модифікованої форми білка зростає по мірі поширення пухлини та корелює з рівнем його лігандного навантаження.

5. Методом кругового дихроїзму виявлено структурні зміни молекул сироваткового альбуміну на пізніх стадіях рака молочної залози, які супроводжувались вірогідними зменшенням відсотку α -спіралей.

6. Встановлено зниження термостабільності сироваткового альбуміну при онкопатології молочної залози, найбільш виражене на початкових етапах розвитку злоякісного процесу.

СПИСОК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Onsoyich I.N., Tolkacheva N.V., Berjanskii M. A study of serum albumin in patients with various diseases of mammary gland by fluorescent sondes method // 1994 March Meeting of Amer. Phys. Soc., 21-25 March 1994, Pittsburg (USA): Bul. of the Amer. Physic. Soc.- 1994.- v.39.- N1.- P. 424.

2. Онсович И.Н. Функциональное состояние сывороточного альбумина у онкологических больных разного возраста // Биологические механизмы старения, 12-14 мая 1994 г.: тез. симпозиума.- Харьков, 1994.- С.113.

3. Толкачева Н.В., Левачев М.М., Кулакова С.Н., Онсович И.Н. Альбу-

мин-зависимый транспорт лигандов липидной природы при различных состояниях организма // Материалы VI Симиозиума по биохимии липидов, 3-6 октября 1994, С.-Петербург.- М., 1995.- С.103.

4. Толкачева Н.В., Борисенко С.Н., Левачев М.М., Кулакова С.Н., Онсович И.Н. Характеристика транспортной функции и структуры сывороточного альбумина у онкологических больных // Вопр.онкологии.- 1995.- т.41.- № 1.- С. 29-32.

5. Структурно-функциональные свойства макромолекул и особенности метаболических процессов при различных состояниях организма / Толкачева Н.В., Коношенко С.В., Мартынюк В.С., Залевская И.Н., Гемберг О.П., Лысенко И.Н. и др. // В кн.: Записки ученых университета.- Симферополь, 1995.- С. 137-197.

6. Толкачева Н.В., Кулакова С.Н., Лысенко И.Н., Бабусайли Абдулла Ахмед, Стогова Э.Г. Жирнокислотный состав сывороточного альбумина онкологических больных в зависимости от стадии и локализации злокачественной опухоли // Вопросы мед. химии - Т. 43. - Вып.4. - С. 261-266.

7. Н.В. Толкачова, И.Н. Лисенко. Вивчення лігандного складу та структури альбуміну хворих з онкопатологією молочної залози // VII Український біохімічний з'їзд (Тези доповідей). - Київ: 1997. - Ч. III.- С. 88-89.

ЛЫСЕНКО Ирина Николаевна. Состояние структуры и функциональные особенности сывороточного альбумина в норме и при нарушении функции молочной железы.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.04 - биохимия. Симферопольский государственный университет.

С помощью методов кругового дихроизма и флуоресцентной спектроскопии установлено нарушение структуры альбумина сыворотки крови в зависимости от его лигандной нагрузки. Показано снижение термостабильности белка на начальных стадиях канцерогенеза. Дана оценка качественного и количественного состава альбумин-связанных жирных кислот. Выявлен дефицит полиненасыщенных жирных кислот семейств $\omega 6$ и $\omega 3$ в условиях патологии. В ходе развития заболевания установлено повышение уровня модифицированной формы альбумина и снижение его резервной функциональной активности, что свидетельствует об активизации транспортной функции этого белка.

I.N. Lysenko. The state of structure and functional peculiarities of serum albumin in norm and at the breach of function of mammary gland

The dissertation work to obtain the degree of Candidate of Biological Sciences (specialty 03.00.04 - biochemistry), the Simferopol State University.

Using the circular dichroism and fluorescent spectroscopy methods the breach of structure of serum albumin depending of it's ligand load has been established. By the differential scanning microcalorimetry method it was discovered the fall of thermostability of protein at initial stages of cancerogenesis. The qualitative and quantitative composition of albumin-bound fatty acids was estimated and deficiency of polyunsaturated $\omega 6$ and $\omega 3$ fatty acids in disease condition has been revealed. It was shown the increase of modified form level of albumin and the decrease of it's reserve functional activity in process of disease development, that evidence about activation of albumin's transport function.

Ключові слова: сироватковий альбумін, структура білка, ліпіди, жирні кислоти, термостабільність, молочна залоза.

434280

AB 38.577

AB 38.577