DOI: 10.26435/neoplasm.v9i3.217

С.А. Зуйков

Изучение свободно-радикального окисления у онкологических больных

Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького

Цель. Установить особенности взаимодействия компонентов системы свободно-радикального окисления в патогенезе злокачественной трансформации в организме больных раком желудка с различной стадией заболевания.

Материалы и методы. Материалом были опухолевые и смежные ткани желудка 35 больных в возрасте 40–80 лет. Изучили активность ферментов обмена пуриновых нуклеотидов — аденозиндезаминазу (АДА) и ксантиноксидазу (КО), как показатели прооксидантной системы; антиоксидантную защиту — глутатионпероксидазу (ГПО) и супероксиддисмутазу (СОД); уровень нитратов/нитритов (NO_x) и показатели окислительной модификации белков (ОМБ) — 2,4-динитрофенилгидразоны. Методом изучения активностей ферментов уровня NO_x и 2,4-динитрофенилгидразонов была спектрофотометрия.

Результаты. Нами установлено увеличение активности АДА, КО и снижение ГПО как при I–II стадии, так и на III–IV стадиях рака желудка. В обоих случаях отмечено увеличение уровня NO_x и ОМБ в опухолевой ткани относительно нетрансформированной слизистой желудка. Изменение СОД имеет разнонаправленный характер — на ранних стадиях рака происходит снижение активности фермента (в 5,2 раза), а на поздних — повышение (в 2,4 раза).

Выводы. Полученные данные свидетельствуют о дисбалансе в антиоксидантной системе у онкобольных, способствуя лучшему выживанию опухолевых клеток.

Ключевые слова: аденозиндезаминаза, ксантиноксидаза, супероксиддисмутаза, глутатионпероксидаза, оксид азота, окислительная модификация белков, гомогенат, рак желудка, окислительный стресс.

Введение

Онкологические заболевания являются одной из основных проблем здравоохранения во всём мире, а в странах СНГ считаются второй по значимости причиной смертности среди населения после заболеваний сердечно-сосудистой системы [1]. В структуре общемировой онкозаболеваемости лидирующее место занимает рак желудка (РЖ) [2]. При этом пик заболеваемости РЖ приходится на возраст 65±5 лет, однако, в последние годы наметилась тенденция по существенному омоложению онкозаболеваний желудочно-кишечного тракта [3]. Установлено, что показатель смертности очень зависит от ранней диагностики онкозаболевания, возраста больных, клинической стадии, успеха лечения [4] и, конечно же, понимания биологии опухолевого роста, особая роль в которой принадлежит свободно-радикальному окислению (СРО) [5].

Патогенез изменений слизистой оболочки желудка, который может привести к развитию рака, является сложным и многофакторным процессом, поэтому изучение метаболизма опухолевого роста представляет значительный практический интерес, поскольку может служить мотивацией для углубления знаний о биологии опухоли, необходимых для своевременной диагностики и поиска новых мишеней для успешной терапии [6]. Одним из важных аспектов изучения патогенеза опухолевого роста является исследование состояния окислительной модификации белков (ОМБ), СРО и антиокислительной защиты. Было установлено, что в процессе онкогенеза важную роль играет разобщение соотношения про- и антиоксидантных систем (АОС) в клетке, а также нарушения метаболизма нуклеотидов [7]. Более «подготовленными» к развитию злокачественных опухолей считаются органы и ткани с быстрообновляющимся клеточным составом и высоким уровнем пролиферации. К таким органам и тканям относится, в частности, слизистая оболочка желудка [8]. Высокая активация ОМБ и стимуляция СРО — универсальная составляющая патогенеза онкологических заболеваний [9]. Причем изменения соотношения прооксидантных систем (ПОС) и АОС в клетке указывают на нарушение механизма контроля апоптоза и пролиферации в ткани опухоли как надклеточной системы [10]. Это определяет актуальность изучения некоторых показателей АОС и ПОС, что может дать более четкую картину в понимании онкогенеза.

Цель исследования

Установить особенности взаимодействия компонентов системы свободно-радикального окисления в патогенезе злокачественной трансформации в организме больных РЖ с различной стадией заболевания.

Материалы и методы

Исследование изучаемых показателей СРО проводили в гомогенатах тканей (опухолевой ткани и нетрансформированной слизистой оболочке желудка). Под нетрансформированной слизистой оболочкой желудка (СОЖ) понимали — ткань края резекции, отдаленную от опухоли (min 30 мм от опухолевого инфильтрата) и не имеющей гистологических и морфологических признаков злокачественной трансформации. Было обследовано 35 больных РЖ: 28 муж-

чин и 7 женщин с различной стадией заболевания (I–IV стадия). Гистологической формой РЖ являлась аденокарцинома. Возраст всех обследуемых был от 40 до 80 лет. Материал для исследования был взят после радикальной операции.

При проведении статистического анализа сравнения исследуемых показателей ПОС и АОС, достоверных отличий по гендерному признаку нами обнаружено не было ни для одного из изученных показателей. Для изучения показателей СРО, в зависимости от тяжести патологического процесса, больные РЖ были разделены на 2 группы с различной стадией рака: 1-ю группу составили 16 человек с I–II стадией, 2-ю группу — 19 человек с III–IV стадией рака.

В качестве ферментативных показателей ПОС нами была изучена активность ключевых ферментов распада пуриновых нуклеотидов — аденозиндезаминазы (АДА, КФ 3.5.4.4) и ксантиноксидазы (КО, КФ 1.17.3.2). Активность АДА определяли по методу H. M. Kalckar в модификации G. L. Tritsch и выражали в нмоль/(мин×мг) [11]. Определение активности КО (в мкмоль/(мин×мг)) основано на способности фермента генерировать супероксид-анион радикал (O_2^-), о содержании которого судили по скорости восстановления нитросинего тетеразолия в формазан [12]. Для изучения АОС нами были определены активности ферментов первой линии защиты от АФК — супероксиддисмутазы (СОД, КФ 1.15.1.1) и глутатионпероксидазы (ГПО, КФ 1.11.1.9). Активность СОД (в ед/мг белка) определяли по торможению аутоокисления адреналина, окисляющегося самопроизвольно в щелочной среде с образованием окрашенного соединения — адренохрома с пиком поглощения на 480 нм [13]. Определение активности ГПО определяли по методу V. M. Moin и выражали в мкмоль/(мин×мг) [14].

В качестве продуктов, показателей интенсивности СРО, мы исследовали суммарное содержание нитратов/нитритов (NO_x) — что является не только показателем метаболизма оксида азота (NO), обладающего свободно-радикальными свойствами, но и важным его источником в клетках, а так же содержание кетондинитрофенилгидразонов (КДНФГ) и альдегиддинитрофенилгидразонов (АДНФГ) нейтрального и основного характера (в мкмоль/мг), как один из наиболее ранних и стабильных показателей поражения различных тканей организма при свободно-радикальной окислительной модификации белков (ОМБ) [15]. Эндогенный уровень NO в форме нитрит-аниона (NO_2^-) после энзиматического восстановления нитратов в нитриты определяли с помощью классической реакции Грисса и обозначали как NO_x (в мкмоль/л) [16]. ОМБ оценивали по методу R. L. Levine в модификации Е. Е. Дубининой [17]. Определение общего белка проводили в соответствии с методикой, описанной Лоури [18].

Определение всех исследуемых показателей проводились спектрофотометрически и регистрировались на спектрофотометре Specord-200. Статистическая обработка данных проводилась с помощью программы «Statistica 10.0» Statsoft, USA. Все исследования проводились при согласии больных, предварительно детально ознакомленных с задачами исследования, программой лечебно-диагностических мероприятий и давших свое письменное информированное согласие на отборы проб, которые осуществлялись под непосредственным контролем лечащих врачей. Исследование соответствует этическим принципам клинических испытаний и положениям Хельсинской декларации Всемирной Медицинской Ассоциации, не нарушает интересы пациента и не вредит его здоровью (Комиссия по биоэтике Донецкого национального медицинского университета им. М. Горького). Авторы сообщают (заявляют), что не имеют конкурирующих интересов.

Результаты и их обсуждение

Изучив изменения ферментативных показателей ПОС и АОС у больных РЖ в гомогенатах тканей в зависимости от тяжести патологического процесса, установили, что в нетрансформированных тканях у больных РЖ с III–IV стадией активность АДА выше 20%, а в ткани опухоли на 15%, чем в группе больных РЖ с I–II стадией. Одновременно обнаружено повышение активности КО в ткани опухоли на 24%, а в нетрансформированной ткани активность фермента с повышением стадии рака достоверно не изменяется. Выявлен дисбаланс в работе ферментативного звена АОЗ в зависимости от тяжести патологического процесса, так у больных РЖ с III–IV стадией активность СОД в опухолевой ткани в 13,5 раз выше относительно больных с I–II стадией ($r=0,99$, $p<0,001$), а активность ГПО ниже на 18% ($r= -0,86$, $p<0,001$). При этом в нетрансформированных тканях СОД достоверно не изменяется, а ГПО снижается на 15% (Таблица 1).

Так же нами установлено повышение продуктов СРО — содержания NO_x и уровня метаболитов ОМБ в зависимости от стадии РЖ как в опухолевой ткани, так и в ткани СОЖ (рис. 1). Полученные данные свидетельствуют об усиленной генерации АФК в организме больных РЖ, что согласуется с повышением активности АДА и КО, а также уровнем NO_x и 2,4-динитрофенилгидразонов, и более выражено это проявляется на более поздних стадиях РЖ.

При этом, проведя сравнение между нетрансформированными и опухолевыми тканями у больных 1-й группы, в ткани опухоли установлено снижение активностей ферментов первой линии защиты от окислителей — СОД в 5,2 раза ($p<0,001$) и ГПО в 1,5 раза ($p<0,001$), что свидетельствует об ослаблении АОС и развитию окислительного стресса (ОС) у онкобольных. Однако во 2-й группе нами были обнаружены неоднозначные изменения ферментативных активностей в системе антиоксидантной защиты: активность СОД была выше в опухолевой ткани относительно СОЖ в 2,4 раза ($p<0,001$), в то время как ГПО в 1,5 раза ниже ($p<0,001$).

Таблица 1

Ферментативные показатели ПОС и АОС в гомогенатах тканей больных РЖ в зависимости от стадии рака (M±σ)

Показатели	Ткань СОЖ		Опухоль	
	1-я группа (I-II стадия)	2-я группа. (III-IV стадия)	1-я группа (I-II стадия)	2-я группа (III-IV стадия)
АДА	11,0±0,62	13,8±1,54*	21,3±1,29	25,1±2,43#
КО	1,82±0,55	2,25±0,70	5,66±1,35	7,50±1,68##
СОД	50,2±5,67	54,4±6,85	9,67±2,61	131±13,5#
ГПО	24,8±1,52	21,0±1,03*	16,9±0,76	13,9±1,05#

Примечание:

* — значения показателя достоверны при p<0,001 для ткани СОЖ;

— значения показателя достоверны при p<0,001 для ткани опухоли;

— значения показателя достоверны при p<0,05 для ткани опухоли.

Следует отметить, что именно фермент, который участвует в инактивации O_2^- резко изменяется в зависимости от стадии заболевания РЖ. Если у больных первой группы активность данного фермента снижается в опухолевой ткани желудка, в сравнении со смежными нетрансформированными тканями, то у больных второй группы, то есть у пациентов с более неблагоприятным прогнозом, СОД увеличивается в ткани аденокарциномы желудка.

Полученные данные можно объяснить следующим образом: известно, что в опухолевых клетках происходит интенсификация гликолитического окисления глюкозы и усиливается скорость метаболизма нуклеотидов с последующим накоплением аденозина [19]. В виду того, что аденозин является регуляторной молекулой и в зависимости от условий, стимулирующих повышение этой молекулы в клетке, по разному может оказывать свои биологические эффекты, одним из которых является стимуляция ангиогенеза для роста опухоли [20]. Однако аденозин еще и выступает стимулятором экспрессии апоптогенных белков, белков АОС и низкомолекулярных антиоксидантов, что в свою очередь будет препятствовать росту опухоли и ее метастазированию. Следовательно, в опухоли работает тонкий механизм регуляции уровня аденозина, за счет стимуляции ферментов катаболизма этой молекулы (АДА и КО) с последующим включением ферментативного звена АОС в данную регуляцию. Обнаруженное нами повышение активности АДА и КО стимулирует увеличение уровня O_2^- избыток, которого в ткани опухоли в свою очередь приводит к ингибированию регуляторных ферментов гликолиза, Ca^{2+}-АТФ-азы, повышает активность протеолитических ферментов

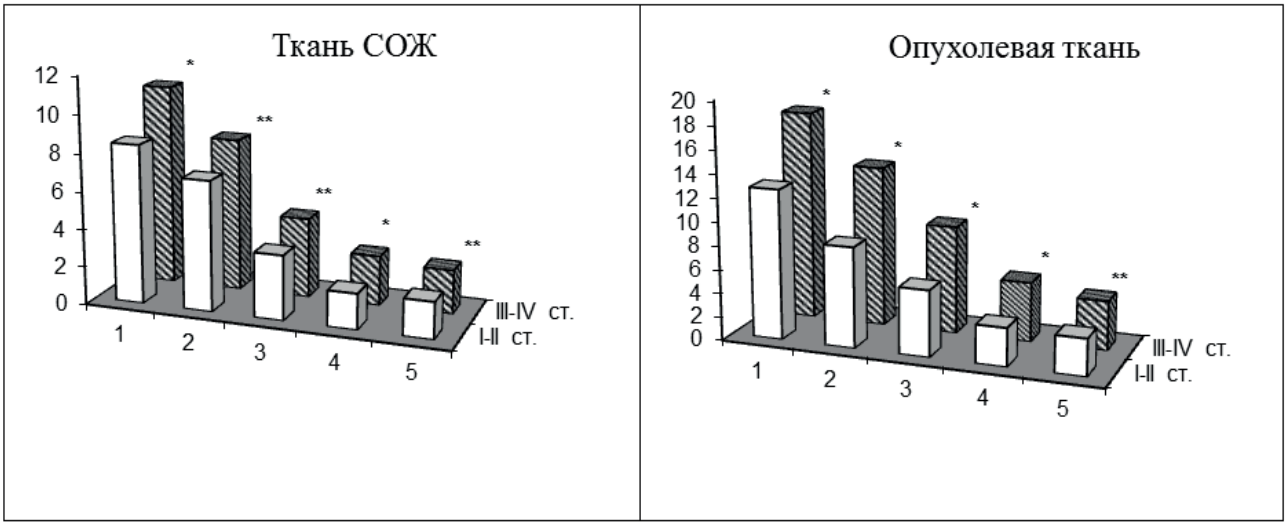

Рисунок 1. Уровень продуктов СРО в зависимости от стадии РЖ.

1-КДНФГ(нейтр), 2-АДНФГ(нейтр), 3-КДНФГ(основ), 4-АДНФГ(основ), 5-NO_x

Примечание: * — значения показателя достоверны при p<0,001.

** — значения показателя достоверны при p<0,05.

и апоптогенных белков, соответственно в опухоли, одновременно срабатывает компенсаторный механизм защиты от O_2^-, который проявляется в увеличении активности СОД, что хорошо видно у больных на поздних стадиях РЖ, с последующей наработкой перекиси водорода (H_2O_2), которая не будет должным образом утилизироваться в виду снижения активности ГПО, способствуя окислению белков в тканях с последующей их модификацией, что отражает повышение уровня 2,4-динитрофенилгидразонов.

Такой механизм приведет к стимуляции активности КО и АДА, тем самым замыкая порочный круг опухолевой прогрессии, а снижение активности ГПО и высокая активность СОД будет приводить к накоплению H_2O_2, способствуя выживаемости опухоли. Следовательно, на основании полученных результатов можно предположить, что АФК могут быть факторами, стимулирующими активность АДА и КО при патологии, в отличие от большинства ферментов, которые обычно подвергаются ингибированию в условиях ОС. Известно, что опухолевые клетки обладают способностью адаптироваться к экстремальным воздействиям H_2O_2, которые в обычных условиях вызывают гибель клеток [21], а в опухолевой ткани за счет H_2O_2 происходит стимуляция экспрессии факторов роста, гликолитических ферментов, ангиогенеза, метастазирования, подавление апоптоза и фосфотаз, при этом изменение редокс-статуса в опухоли за счет H_2O_2 приводит ко вторичной индукции СОД, сопряженной с агрессивной канцерогенной трансформацией клеток, еще больше нарабатывая регуляторную молекулу [22].

Заключение

Так как опухолевый процесс связан с усиленной генерацией АФК, оказывающих двоякую роль в канцерогенезе — выступая с одной стороны фактором прогрессии опухоли, а с другой — при очень высокой концентрации могут стимулировать апоптоз и некроз, тем самым повредить раковую клетку, следовательно можно предположить, что обнаруженный дисбаланс в работе фермента первой линии защиты от АФК — СОД, а именно повышение его активности у больных 2-й группы, выступает как компенсаторный, защитный механизм опухоли, активируемый в условиях ОС, способствуя ее выживанию и более быстрой прогрессии, что согласуется с клиническим течением заболевания у этой группы больных. При этом нарабатываемый ферментом H_2O_2 в ткани опухоли, скорее всего проявляет свойства физиологического регулятора [23], нежели выступает как токсический и деструктивный агент, оказывая следующие эффекты в клетке: приводит к инактивации ферментов АОС, одним из которых выступает ГПО; снижает цитотоксический эффект фактора некроза опухоли [24], защищая опухолевые клетки от повреждения; усиливает окисление нитратов в нитриты, повышая пул NO_x, что служит важным стимулятором индуцированной кровотоком вазодилатации, способствуя усилению кровоснабжения опухолевых тканей, повышению транспорта питательных веществ и метастазированию, тем самым создает необходимые условия для выживаемости опухолевых клеток, стимулируя их озлокачествление.

Список литературы

1. Иванилов А.К. Заболеваемость злокачественными новообразованиями в мире, РФ и отдельных её регионах (обзор литературы). Молодой ученый. 2014;2:337–339.
2. Рыбалкина Д.Х., Дюсембаева Н.К., Шпаков А.Е. [и др.]. Обзор современных эпидемиологических аспектов по онкопатологии. Гигиена труда и медицинская экология. 2015; 4(49):31–48.
3. Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. Злокачественные новообразования в России в 2015 году (заболеваемость и смертность). М.: МНИОИ им. П.А. Герцена, филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России; 2017.
4. Полунин Г.Е., Седаков И.Е., Зинкович И.И. [и др.]. Энергетический статус эритроцитов у больных с неспецифическим язвенным колитом и раком толстой кишки на фоне терапии лактатом натрия. Таврический медико-биологический вестник. 2012;15(3):200–202.
5. Pourahmad J., Salimi A., Seydi E. Role of Oxygen Free Radicals in Cancer Development and Treatment. Free Radicals and Diseases. 2016. Available at: https://www.intechopen.com/books/free-radicals-and-diseases/role-of-oxygen-free-radicals-in-cancer-development-and-treatment. doi: 10.5772/64787.
6. Лисица А.В., Пономаренко Е.А., Лохов П.Г., Арчаков А.И. Постгеномная медицина: альтернатива биомаркерам. Вестник Российской академии медицинских наук. 2016;71(3). doi:10.15690/vramn647.
7. He Y.C., Zhou F.L., Shen Y. [et al.]. Apoptotic death of cancer stem cells for cancer therapy. Int. J. Mol. Sci. 2014;15(5):8335–8351. doi: 10.3390/ijms15058335.
8. Li T., Guo H., Zhao X. [et al.]. Gastric cancer cell proliferation and survival is enabled by a cyclophilin B/STAT3/microRNA-520d-5p signaling feedback loop. Cancer Res. 2017;77(5). doi: 10.1158/0008–5472.CAN-16–0357.
9. Vermorken, A.J.M., Zhu J., Andres E. Obesity and colorectal cancer risk: the role of oxidative stress. Gut. 2014;63(3):529–530. doi: 10.1136/gutjnl-2013–304701.
10. Дзасохов А.С. Патогенетические аспекты опухолевого роста в свете тканевой теории канцерогенеза (краткий литературный обзор). ВНМТ. 2012;19(1):179–181.
11. Tritsch G.L. Validity of the continuous spectrophotometric assay of Kalckar for adenosine deaminase activity. Anal. Biochem. 1983;129(1):207–209.
12. Медицинские лабораторные технологии: руководство по клинической лабораторной диагностике: в 2 т. Под ред. А.И. Карпищенко. 3-е изд., перераб. и доп. Т. 2. М.: ГЕОТАР-Медиа; 2013:40–41.
13. Макаревич О.П., Голиков П.П. Активность супероксиддисмутазы крови в острый период различных заболеваний. Лаб. дело. 1983;6:24–27.

14. Moin V.M. A simple and specific method for determining glutathione peroxidase activity in erythrocytes. Lab. Delo. 1986;12:724–727.
15. Andriichuk A., Tkachenko H., Tkachova I. Oxidative Stress Biomarkers and Erythrocytes Hemolysis in Well-Trained Equine Athletes Before and After Exercise. J. of Equine Veterinary Sci. 2016;36:32–43. doi:10.1016/j.jevs.2015.09.011.
16. Мажитова М. В. Спектрофотометрическое определение уровня метаболитов монооксида азота в плазме крови и ткани мозга белых крыс. Современные проблемы науки и образования. 2011;3. Доступно по: http://www.science-education.ru/97–4655.
17. Унанян Л.С., Соцкий П., Хачатрян Л.Г. [и др.]. Окислительная модификация белков сыворотки крови белых крыс под влиянием шума и α2-адреноблокаторов. Биолог. журн. Армении. 2010;1(62):79–83.
18. Lowry O.H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 1951;193(1):265–275.
19. Шатова О. П. Роль лактата в аденозинергической иммуносупрессиии. Питання експериментальної та клінічної медицини. 2013;2(17):153–159.
20. Thakur S., Du J., Hourani S. [et al.] Inactivation of adenosine A2A receptor attenuates basal and angiotensin II-induced ROS production by Nox2 in endothelial cells. Biol. Chem. 2010;285(51):40104–40113. doi: 10.1074/jbc.M110.184606.
21. Осинский С., Ваупель П. Микрофизиология опухолей. К.: Наукова думка; 2009.
22. Rios-Arrabal S., Artacho-Cordón F., León J. [et al.]. Involvement of free radicals in breast cancer. SpringerPlus. 2013. Available at: http://doi.org/10.1186/2193–1801–2–404.
23. Kiruthiga P.V., Shafreen R. B., Pandian S. K. [et al.]. Protective effect of silymarin on erythrocyte haemolysate against benzo(a)pyrene and exogenous reactive oxygen species (H2O2) induced oxidative stress. Chemosphere. 2007;68(8):1511–1518. doi: 10.1016/j.chemosphere.2007.03.015
24. Zhang D.X., Borbouse L., Gebremedhin D. [et al.]. H2O2-induced dilation in human coronary arterioles: role of protein kinase G dimerization and large-conductance Ca2+-activated K+ channel activation. Circ Res. 2012;110(3):471–480. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.258871.

S.A. Zuikov

Study of free radical oxidation in oncological patients

M.Gorky Donetsk National Medical University

Aim. To establish the features of interaction of the system components of free radical oxidation in the pathogenesis of malignant transformation in the body of patients with stomach cancer with a different stage of the disease.
Materials and Methods. The material was neoplastic and adjacent tissues of 35 patients at the age of 40–80 years. We studied the activity of purine nucleotides metabolism enzymes — adenosine deaminase (AD) and xanthine oxidase (XO) as indicators of prooxidant system; antioxidant protection — glutathione peroxidase (GPx) and superoxide dismutase (SOD); levels of nitrates/nitrites (NOx) and indicators of oxidative modification of proteins (OMP) — 2,4-dinitrophenylhydrazones. Spectrophotometry was method for studying enzyme activities, level NOx and 2,4-dinitrophenylhydrazones.
Results. We established that increasing of AD, XO activities and decreasing of GPx activity were observed for I–II stages as well as for III–IV stages. The increase in NOx and OMP level in the neoplastic tissue relatively non-transformed gastric mucosa was noted in both cases. The SOD change is multidirectional — in the early stages of cancer the enzyme activity decreases (5.2 times) but in the late stages the increase (2.4 times) is detected.
Conclusion. The data obtained indicate an imbalance in the antioxidant system in cancer patients, contributing to a better survival of tumor cells.

Keywords: adenosine deaminase, xanthine oxidase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, nitric oxide, oxidative modification of proteins, homogenate, stomach cancer, oxidative stress.