

М.А. Барсукова, Е.В. Хомутов, Л.С. Дмитриев, Е.Д. Якубенко, И.И. Зинкович

Изоферментный профиль аденозиндезаминазы в аденокарциноме молочной железы

Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького

Резюме. Изменение активности АДА сопряжено со многими патологическими процессами, в том числе с малигнизацией. В организме человека функционируют и проявляют плеiotропные свойства две изоформы АДА: АДА1 и АДА2.

Целью работы является исследование особенностей распределения активности изоферментов АДА в аденокарциноме молочной железы и смежной с ней тканью.

Материалы и методы. Материалом послужили биоптаты аденокарциномы молочной железы и смежной с ней ткани (ТхNxMx). Исследуемые изоферменты выделяли методом гель-фильтрации, ферментативную активность определяли спектрофотометрически.

Результаты. Обнаруженная в узлах аденокарциномы высокая активность АДА обусловлена гиперэкспрессией обеих ее изоферментов. Так, активности АДА1 и АДА2 в опухолевых узлах в среднем превышают таковые в смежной ткани в 2,1 и 2,2 раза, соответственно. Установлено, что в обеих группах изученных образцов (опухолевый узел и смежная с ним ткань) преобладает экспрессия АДА1. В биоптатах смежной ткани в среднем ее активность в 5,5 раз превышает соответствующий показатель для АДА2. В узлах опухолевой ткани активность АДА1 в среднем выше активности АДА2 в 4,9 раза.

Заключение. Показанная нами высокая активность обеих изоферментов АДА является характерной для озлокачествленной железистой ткани. Показатель соотношения активностей изоферментов АДА1 и АДА2 сохраняется на одном уровне как в опухолевом узле, так и в смежных с ним тканях, не имеющих признаков злокачественной трансформации.

Ключевые слова: аденозиндезаминаза, изофермент, аденокарцинома.

Введение

Аденозиндезаминаза (АДА, Е.С.3.5.4.4) — фермент класса гидролаз, катализирующий дезаминирование аденозина — пуринового нуклеозида, обладающего свойствами сигнальной молекулы и участвующего в подавлении Т-клеточного иммунитета. Концентрация аденозина во внеклеточной среде значительно возрастает при ряде патологических состояний, в том числе при ишемии, гипоксии, воспалении и травмах [1].

Уровень аденозина ограничивается его фосфорилированием до АМФ аденозинкиназой или дальнейшим разрушением до инозина с участием аденозиндезаминазы. По-видимому, необратимая реакция, катализируемая АДА, является лимитирующим этапом деградации аденозина [2]. АДА также проявляет плеiotропные свойства, влияя на различные звенья клеточного иммунного ответа [5].

В организме человека существует два изофермента АДА: АДА1 — в виде мембраноассоциированной и цитозольной молекулярных форм, а так же внеклеточная АДА2. АДА1 присутствует во всех тканях и составляет большую часть общей аденозиндезаминазной активности. АДА2 в большинстве клеток находится в незначительном количестве, однако, в норме АДА2 является преобладающим изоферментом сыворотки, что объясняется ее экспрессией на моноцитарно-макрофагальной клеточной системе [3].

Основной функцией обеих молекулярных форм АДА1 является дезаминирование аденозина, высокие концентрации которого подавляют активность и пролиферацию лимфоцитов. Помимо этого мем-

браносвязанная АДА1 (ЛАДА), путем формирования комплекса с аденозиновыми рецепторами, способна изменять их сродство к сигнальной молекуле аденозину [4].

АДА2, являясь внеклеточной молекулой, обладает гораздо меньшей, по сравнению с АДА1, каталитической активностью в нормальных для клетки условиях. Данный изофермент характеризуется низким значением оптимума pH (6,5) и сродства к аденозину. Мигрирующая в очаги ацидоза с пулом иммунных клеток АДА2 снижает в них концентрацию аденозина, и дополнительно способствует пролиферации CD4+Т-клеток, индуцирует дифференциацию моноцитов в макрофаги с их последующей пролиферацией [5]. Можно предполагать, что инфильтрирующие опухоль лимфоциты будут значительно повышать удельную активность АДА2 среди всех изоформ этого фермента в опухоли. Это предположение в целом подтверждается в работе [6], однако приводимые в ней данные указывают на значительное преобладание активности АДА2 над АДА1, что, на наш взгляд, весьма нехарактерно для этого «минорного» изофермента. Одним из возможных объяснений данного факта может быть недостаточная селективность ингибиторов, используемых авторами упомянутой работы для раздельной оценки активностей изоферментов АДА.

В данной работе представлены результаты исследования особенностей распределения активности изоферментов аденозиндезаминазы в аденокарциноме молочной железы.

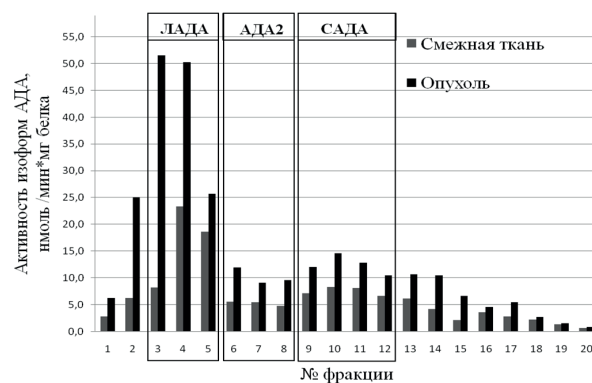


Рисунок 1. Активность АДА во фракциях после гель-фильтрации.

Материалы и методы

Исследования проведены в биоптатах опухолевых узлов и смежной с опухолью злокачественно нетрансформированной железистой ткани, взятых у 9 больных с аденокарциномой молочной железы (ТхNxМх). Навески биоптатов гомогенизировали с добавлением 0,9% NaCl в соотношении 1:2, центрифугировали 15 мин при 3000 об/мин. Разделение изоферментов АДА1и АДА2 проводили методом гель-фильтрации. Для этого на колонку 10х250мм, заполненную SephadexG100, наносили 0,5 мл белкового экстракта с концентрацией белка 10 мг/мл. Элюцию проводили трис-буфером (рН=7,0). Элюент фракционировали с шагом 1 мл.

Аденозиндезаминазную активность во фракциях определяли по приросту инозина после добавления субстрата — аденозина (конечная концентрация в пробе 0,1 мМ) и инкубации в течение 30 мин при 37 °С в трис-буфере с рН=7,4 (для определения активности АДА1) и рН=6,5 (для определения активности АДА2). Концентрацию инозина измеряли спектрофотометрически на приборе Specord-200 при длине волны 265 нм по методике Lu J., Grenache DG. (2012) [6].

Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения Statistica 10. Достоверность различия значений определяли с помощью Т-теста Стьюдента. Результаты представлены в виде средних значений и их среднеквадратических отклонений ($M \pm \sigma$).

Результаты и обсуждение

Результаты анализа активности АДА показали, что средний показатель общей активности изученного фермента в биоптатах опухолевых узлов составил $67,1 \pm 24,6$ (минимум = 30,0, максимум = 96,0) нмоль /мин*мг белка, что более чем в 2 раза пре-

вышает соответствующее значение для смежной с опухолью железистой ткани — $31,3 \pm 12,8$ (минимум = 17,0, максимум = 55,0) нмоль /мин*мг белка ($p < 0,001$).

Полученные данные подтверждают сложившиеся представления об усилении экспрессии аденозиндезаминазы при злокачественной трансформации эпителиальной ткани [7,8,9,10].

В результате гель-фильтрации белковых экстрактов исследуемых образцов (рисунок 1) аденозиндезаминазная активность, выявленная во фракциях № 3–5, соответствует высокомолекулярной изоформе АДА1 — ЛАДА (298 кД). Активность фермента, зарегистрированная во фракциях № 6–8 соответствует изоферменту АДА2 (100–114 кД). На фракции № 9–12 приходится активность мономерной изоформы АДА1– САДА (34–36 кД).

По результатам гель-фильтрации, обнаруженная в узлах аденокарциномы высокая активность АДА обусловлена гиперэкспрессией обеих ее изоферментов (табл. 1). Так, активности АДА1 и АДА2 в опухолевых узлах в среднем превышают таковые в смежной ткани в 2,1 ($p = 0,001$) и 2,2 раза ($p = 0,005$), соответственно.

Установлено, что и в опухолевых узлах, и в смежных с ними тканях преобладает экспрессия АДА1. В биоптатах смежной ткани в среднем ее активность в 5,5 раз превышает соответствующий показатель для АДА2 ($p < 0,001$). В узлах опухолевой ткани активность АДА1 в среднем выше активности АДА2 в 4,9 раза ($p < 0,001$).

Таким образом, независимо от наличия малигнизации клеток, основной вклад в аденозиндезаминазную активность изученных биоптатов молочной железы вносит именно АДА1. Эти данные противо-

Таблица 1

Активность изоферментов АДА в биоптатах аденокарциномы молочной железы, нмоль/мин*мг белка ($M \pm \sigma$)

образец	АДА1	АДА2	t-Стьюдента
смежная ткань	$25,9 \pm 10,2$	$5,4 \pm 3,2$	$p < 0,001$
опухолевый узел	$55,3 \pm 20,2$	$11,8 \pm 5,0$	$p < 0,001$
	$p = 0,001$	$p = 0,005$	

речат результатам, представленным в работе [7], где авторы говорят о преобладающей доле активности АДА2. Этот факт можно объяснить различными методиками измерения активности изоферментов АДА.

Предложенный нами метод прямого разделения изоферментов методом гель-фильтрации представляется более надежным, нежели применение ингибиторов. Однако эти же исследователи подчеркивают, что активность общей АДА и ее изофермента АДА2 значительно увеличены как в злокачественных, так и доброкачественных опухолях молочной железы. При этом активность АДА в доброкачественных опухолях значимо ниже, чем в злокачественных, что может быть полезным в дифференциальной диагностике пролиферации [7].

Полученные нами данные об изоферментном профиле АДА согласуются с результатами, представленными в работе [1], где авторы определяли активность изоферментов аденозиндеаминазы в лизатах моноцитов периферической крови. По их данным, у здоровых обследованных людей АДА1 обеспечивает около 80% общей активности фермента. При туберкулезе — напротив, зарегистрировано снижение активности АДА1 и рост АДА2 в сыворотке периферической крови [11]. Показанная нами высокая активность обоих изоферментов аденозиндеаминазы является характерной именно для озлокачествленной железистой ткани.

Выводы

1. Характерная для малигнизированных тканей повышенная активность АДА обеспечивается гиперэкспрессией обоих изученных изоферментов.

2. Основной вклад, до 80%, в аденозиндеаминазную активность биоптатов молочной железы вносит АДА1.

Показатель соотношения активностей изоферментов АДА1 и АДА2 сохраняется на одном уровне как в опухолевом узле, так и в смежных с ним тканях, не имеющих признаков злокачественной трансформации.

Список литературы

1. Liu H., Xia Y. Beneficial and detrimental role of adenosine signaling in diseases and therapy. *Journal of Applied Physiology*. 2015;119(10):1173–1182. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4839494/> doi: 10.1152/japplphysiol.00350.2015
2. Lizuka H, Koizumi H, Kamikagi K, et al. Two forms of adenosine deaminase in pig epidermis. *J Dermatol* 1981;18:91e95. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1346-8138.1981.tb02573.x/full> doi: 10.1111/j.1346-8138.1981.tb02573.x
3. Gakis C. Adenosine deaminase (ADA) isoenzymes ADA1 and ADA2: diagnostic and biological role. *EurRespir J* 1996;9:623–4. <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.832.5171&rep=rep1&type=pdf> doi: 10.1183/09031936.96.09040632
4. Spychala J. Tumor-promoting functions of adenosine. *PharmacolTher*. 2000 Aug-Sep;87(2–3):161–73. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11007998> doi: 10.1016/S0163-7258(00)00053-X
5. Zavialov AV, Gracia E, Glaichenhaus N, Franco R, Zavialov AV, Lauvau G. Human adenosine deaminase 2 induces differentiation of monocytes into macrophages and stimulates proliferation of T helper cells and macrophages. *J Leukoc Biol*. 2010 Aug;88(2):279–90 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20453107> doi: 10.1189/jlb.1109764
6. Lu J, Grenache DG. Development of a rapid, microplate-based kinetic assay for measuring adenosine deaminase activity in body fluids. *ClinChimActa*. 2012 Oct9;413(19–20):1637–40. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22579767> doi: 10.1016/j.cca.2012.05.001
7. Aghaei M., Karami-Tehrani F., Salami S., Atri M.. Diagnostic value of adenosine deaminase activity in benign and malignant breast tumors // *Archives of Medical Research*. 2010. № 41(1). С. 14–8 doi: 10.1016/j.arcmed.2009.10.012
8. Chen Y, Wang H, Lin W, Shuai P. ADAR1 overexpression is associated with cervical cancer progression and angiogenesis. *DiagnPathol*. 2017 Jan 21;12(1):12. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5251241/> doi: 10.1186/s13000-017-0600-0
9. Kelgandre DC, Pathak J, Patel S, Ingale P, Swain N. Adenosine Deaminase — a Novel Diagnostic and Prognostic Biomarker for Oral Squamous Cell Carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2016;17(4):1865–8. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27221867>
10. Шатова О. П., Борзенко Б. Г., Зинкович И. И. и др. Лактатдегидрогеназная, аденозиндеаминазная и тимидинфосфорилазная активности крови и тканей при опухолях молочной железы. *Укр. Біохм. Журнал*. — 2009. — Т. 81, № 4. — С. 88–93.
11. Дьякова М. Е., Журавлев В. Ю., Эсмедяева Д. С., Перова Т. Л. Ферменты пуринового метаболизма в иммунопатогенезе фиброзно-кавернозготуберкулезалегких. *Медицинская иммунология*, 2016. Т. 18, № 1. С. 85–90. <https://cyberleninka.ru/article/n/fermenty-purinovogo-metabolizma-v-immunopatogeneze-fibroznokavernoznotuberkulezalegkih> doi: 10.15789/1563-0625-2016-1-85-90

Izoenzyme profile of adenosine deaminase in breast adenocarcinoma

M.Gorky Donetsk National Medical University

Summary. The change in ADA activity is associated with many pathological processes, including malignancy. In the human body there are two isoforms of ADA that function and exhibit pleiotropic properties: ADA1 and ADA2.

The aim of the work is to investigate the features of distribution activity of the isoenzymes of ADA in breast adenocarcinoma and adjacent tissue.

Materials and methods. The material was biopsies of breast adenocarcinoma and adjacent tissue (TxNxMx). The investigated isoenzymes were isolated by gel filtration, the enzymatic activity was determined spectrophotometrically.

Results. The high activity of ADA detected in the nodes of adenocarcinoma is due to the overexpression of both of its isoenzymes. Thus, the activities of ADA1 and ADA2 in tumor nodes on average exceed those in adjacent tissue by 2.1 and 2.2 times, respectively. It was established that expression of ADA1 prevails in both groups of studied samples (tumor node and adjacent tissue). In biopsies of adjacent tissue, on average, its activity is 5.5 times higher than the corresponding index for ADA2. In the nodes of tumor tissue, the activity of ADA1 is on average higher than the activity of ADA2 by 4.9 times.

The conclusion. The high activity of both isoenzymes of ADA shown by us is characteristic for malignant glandular tissue. The ratio of the activity of the isoenzymes ADA1 and ADA2 remains at the same level both in the tumor node and in adjacent tissues that do not show signs of malignant transformation.

Key words: adenosine deaminase, isoenzyme, adenocarcinoma