

С. А. Зуйков, Г. Е. Полуни

Исследование возрастных изменений свободнорадикального окисления у больных раком толстой кишки

ГОО ВПО Донецкий национальный медицинский университет имени М. Горького

Цель: сравнить изменения свободнорадикального окисления (СРО) в плазме крови здоровых людей и больных раком толстой кишки (РТК) в зависимости от возраста.

Материалы и методы: материалом была плазма крови 80 здоровых добровольцев в возрасте от 40 до 80 лет, не имеющих онкопатологий желудочно-кишечного тракта и 26 больных РТК с I–II стадиями заболевания. Гистологической формой РТК являлась аденокарцинома. Изучили активность ключевых ферментов катаболизма пуриновых нуклеотидов — аденозиндезаминазу (АДА) и ксантиноксидазу (КО) — которые являются стимуляторами СРО. В качестве продуктов, показателей интенсивности СРО исследовано суммарное содержание нитратов/нитритов (NO_x) и уровень 2,4-динитрофенилгидразонов. Для изучения антиоксидантной системы (АОС), исследованы активности ферментов первой линии защиты — супероксиддисмутазы (СОД) и глутатионпероксидазы (ГПО). Методом исследования всех показателей была спектрофотометрия.

Результаты: в плазме крови у здоровых людей при старении установлено увеличение ферментативных активностей АДА и КО, а так же содержание NO_x и 2,4-динитрофенилгидразонов — показателей окислительной модификации белков. Аналогичные результаты изменения изучаемых показателей обнаружены и при опухолевой трансформации. Так же установлено, что при РТК происходит более выраженная интенсификация СРО с последующим формированием окислительного стресса (ОС). Выявлены корреляционные связи между ферментами пуринового обмена в плазме крови у здоровых людей и больных РТК.

Выводы: полученные данные, свидетельствуют об усилении катаболизма пуринов, как при старении, так и при опухолевой трансформации, что может быть использовано в качестве прогностических факторов риска РТК.

Ключевые слова: аденозиндезаминаза, ксантиноксидаза, оксид азота, окислительная модификация белков, рак толстой кишки, старение, окислительный стресс.

Введение.

Рак толстой кишки (РТК) — является широко распространенной в мире патологией и находится на третьем месте после рака молочной железы и легкого, занимая вторую позицию в структуре смертности от рака, как среди мужчин, так и женщин [1]. Ежегодно в мире регистрируется более 1500000 новых случаев РТК, причем, согласно прогнозам, абсолютное число случаев РТК будет увеличиваться в течение как минимум двух следующих десятилетий в результате старения населения как развитых, так и развивающихся стран [2–4].

Общезвестно, что старение является одним из основополагающих факторов риска развития РТК [5]. Биологическое старение представляет собой сложный и многофакторный процесс, молекулярные механизмы которого, лежащие в основе инициации заболеваний и их дальнейшего прогрессирования, остаются еще, до конца не изученными [6]. Однако считается, что с возрастом заболеваемость раком резко возрастает, вероятнее всего, из-за снижения эффективности механизмов обновления клеток, нарушения метаболических процессов и регуляторных систем, а так же формирования окислительного стресса (ОС) по мере старения человека [7].

Одной из актуальных проблем здравоохранения является проблема повышения эффективности лечения и диагностики злокачественных новообразований. Из всего арсенала применяемых методов лечения рака в настоящее время основным остается хирургический с применением химио- и лучевой терапии [8], однако до конца не изученным остается вопрос о применении агонистов или антагонистов антиоксидантной/прооксидантной систем в терапии онкологических больных. При этом, низкая радиочувствительность опухоли, ее химиорезистентность, а так же до конца не изученные биохимические и патохимические особенности опухоли, включая механизмы влияния про- и антиоксидантов на опухолевые клетки, могут значительно ухудшить прогноз заболевания [9,10].

Для биохимических методов диагностики наиболее доступным и относительно информативным материалом является плазма крови. Известно, что изменение активности большинства ферментов в плазме крови отражает их тканевую активность [11].

Цель исследования.

Сравнить изменения свободнорадикального окисления (СРО) в плазме крови здоровых людей и больных РТК в зависимости от возраста.

Таблица 1.

Показатели СРО в плазме крови здоровых людей и больных РТК в зависимости от возраста (М±σ)

Показатели	Здоровые		Больные РТК	
	1-я группа (n=44)	2-я группа (n=36)	1-я группа (n=10)	2-я группа (n=16)
АДА	2,20±0,41	2,75±0,54*	3,89±0,33	4,44±0,22*
КО	0,286±0,120	0,414±0,136*	0,521±0,072	0,660±0,056*
СОД	0,212±0,029	0,141±0,016*	0,137±0,011	0,125±0,020
ГПО	7,10±0,71	6,36±0,21*	7,91±0,19	7,74±0,41
NO _x	3,35±0,54	3,89±0,28**	8,70±1,88	8,94±1,25
КДНФГ(нейтр)	1,64±0,24	1,87±0,06*	3,65±0,36	3,99±0,14**
АДНФГ(нейтр)	1,28±0,08	1,47±0,07*	3,23±0,20	3,33±0,33**
КДНФГ(основ)	0,47±0,07	0,63±0,07*	1,72±0,38	2,07±0,23
АДНФГ(основ)	0,29±0,05	0,38±0,03**	0,56±0,14	0,73±0,08*

Примечание:

* – значения показателя достоверны для 2-й группы, относительно 1-й группы при $p < 0,001$;** – значения показателя достоверны для 2-й группы, относительно 1-й при $p < 0,05$.

Материалы и методы.

Исследование изучаемых показателей проводили в плазме крови 80 здоровых добровольцев в возрасте от 40 до 80 лет, не имеющих онкопатологий желудочно-кишечного тракта и 26 больных РТК I–II стадией заболевания. Гистологической формой РТК являлась аденокарцинома. Для исследования возрастной динамики изменения всех показателей, здоровые добровольцы и онкобольные были разделены на 2 возрастные группы — 40–59 лет (1-я гр.) и 60–80 лет (2-я гр.).

В качестве показателей прооксидантной системы (ПОС) нами была изучена активность ферментов распада пуриновых нуклеотидов — АДА (КФ 3.5.4.4), который не только относится к системе СРО, но и является признанным фактором роста, а так же КО (КФ 1.17.3.2) — общеизвестный генератор свободных радикалов (СР) в клетке. Активность АДА определяли по методу Н. М. Kalcar в модификации G. L. Tritsch и выражали в нмоль/(мин×мг) [12]. Определение активности КО (в мкмоль/(мин×мг)) основано на способности фермента генерировать O_2^- , о содержании которого судили по скорости восстановления нитросинего тетразолия в формазан [13]. В качестве продуктов, показателей интенсивности ОС мы исследовали суммарное содержание нитратов/нитритов (NO_x) — отражающих метаболизм оксида азота (NO), обладающего СР свойствами, а так же выступающие важным его источником в клетках, и уровень кетондинитрофенилгидразонов (КДНФГ) и альдегиддинитрофенилгидразонов (АДНФГ) нейтрального и основного характера. Эндогенный уровень NO_x (в мкмоль/л) определяли с помощью классической реакции Грисса [14], а содержание динитрофенилгидразонов (в мкмоль/мг) — показателей окислительной модификации белков (ОМБ),

оценивали по методу R. L. Levine в модификации Е. Е. Дубининой [15]. Определение общего белка проводили в соответствии с методикой описанной Лоури [16].

Для изучения антиоксидантной системы (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 — адrenoхрома с пиком поглощения на 480 нм [17]. Определение активности ГПО определяли по методу V. M. Moin и выражали в мкмоль/(мин×мг) [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 Хельсинкской декларации Всемирной Медицинской Ассоциации, не нарушает интересы пациента и не вредит его здоровью (Комиссия по биоэтике ГОУ ВПО «Донецкого национального медицинского университета им. М. Горького»). Авторы сообщают (заявляют), что не имеют конкурирующих интересов.

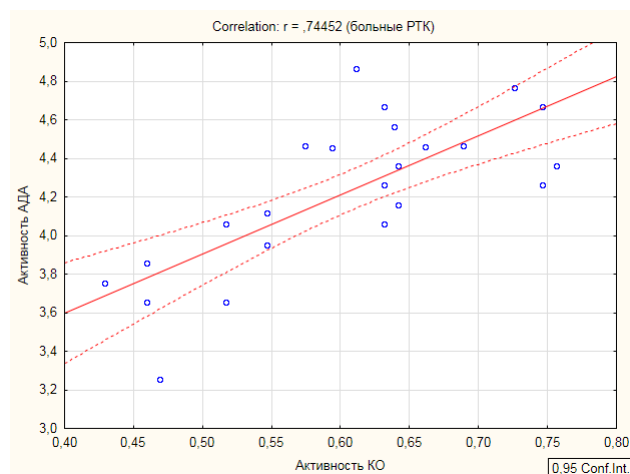
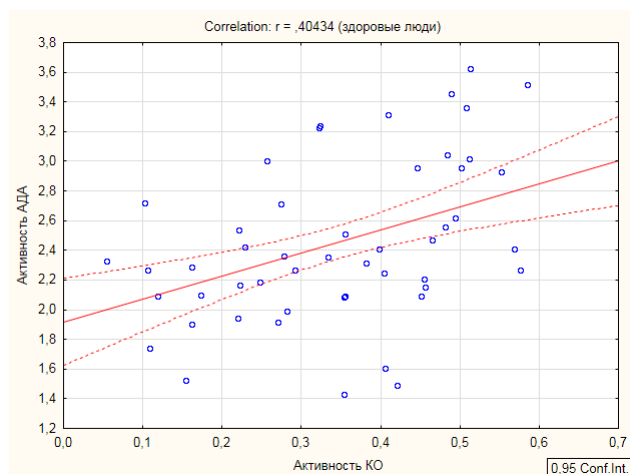


Рисунок 1. Взаимозависимость активностей АДА и КО в плазме крови у здоровых людей и больных РТК, значения всех коэффициентов корреляции статистически достоверны при $p < 0,001$.

Результаты и их обсуждение.

Установлено, что с возрастом у здоровых людей в плазме крови происходит достоверное повышение активностей ферментов ПОС, тогда как в работе ферментативного звена АОС наблюдается статистически значимое снижение всех показателей с возрастом. Полученные нами данные позволяют предположить, что повышение активностей ферментов пуринового обмена при старении организма, способствуют усиленной наработке АФК, которые по механизму обратной связи, еще больше стимулируют данный метаболизм и подавляют ферментативное звено системы антиоксидантной защиты (Табл. 1). Так же было установлено достоверное повышение метаболитов СРО — уровня NO_x и продуктов ОМБ с возрастом, что так же является одной из причин угнетения ферментативного звена АОС, способствуя окислению тиоловых белков, еще больше повышая продукцию свободных радикалов. Это в свою очередь свидетельствует о постепенном снижении антиоксидантного потенциала плазмы крови у пожилых людей, что не противоречит имеющимся представлениям [19].

Исследовав возрастные изменения СРО в плазме крови больных РТК, установлено достоверное повышение активностей АДА и КО, что так же как и в группе здоровых людей, свидетельствует в пользу усиления ферментативного звена ПОС плазмы крови, на фоне угнетения активностей ферментов АОС — СОД и ГПО, однако для данных показателей достоверных отличий обнаружено не было. Так же не установлено достоверных отличий в изменении уровня NO_x с возрастом, хотя и прослеживалась динамика повышения данных показателей, тогда как уровень всех метаболитов ОМБ статистически значимо был выше во 2-й группе больных РТК относительно 1-й группы (Табл. 1).

Сравнив динамику возрастных изменений активностей АДА и КО было установлено, что у здоровых людей наблюдается повышение на 25% и 45%, тогда как у больных РТК — на 14% и 27% соответственно. При этом изменения в ферментативном звене АОС так же были более выражены у здоровых людей, по сравнению с больными РТК. Так активность

СОД с возрастом снижается на 50% у здоровых людей и на 10% у онкобольных, а ГПО — на 12% и на 2% соответственно.

Следовательно, как у больных РТК, так и у здоровых людей при старении происходит повышение интенсификации СРО, однако возрастной темп изменения активностей ферментов ПОС и АОС в плазме крови у здоровых людей имеет более выраженную динамику изменения, по сравнению с больными РТК.

В то же время, сравнив между собой все показатели СРО в плазме крови больных РТК и здоровых людей разного возраста, установили, что в 1-й возрастной группе ферментативные активности АДА и КО у больных РТК выше в 1,8 раза по сравнению с людьми, не имеющими онкозаболеваний, а во 2-й возрастной группе в 1,8 раза ($p < 0,001$) соответственно. При этом уровень метаболитов, показателей интенсивности СРО составил: в 1-й возрастной группе содержание NO_x было в 2,6 раза выше, КДФГ(нейтр) в 2,6 раза, АДНФГ(нейтр) в 2,2 раза, КДФГ(основ) в 3,7 раза и АДНФГ(основ) в 2 раза выше у онкобольных относительно здоровых (при $p < 0,001$), а во 2-й группе NO_x в 2,3 раза, КДФГ(нейтр) в 2,1 раза, АДНФГ(нейтр) в 2,7 раза, КДФГ(основ) в 3,3 раза и АДНФГ(основ) в 2 раза соответственно ($p < 0,001$ для всех показателей). Тогда как возрастные изменения активностей ферментов АОС составили: СОД у больных РТК в 1-й группе была в 1,5 раза ($p < 0,001$) и во 2-й группе в 1,2 раза ниже относительно здоровых ($p < 0,05$), а активность ГПО наоборот была выше у онкологических больных относительно здоровых в 1,2 раза ($p < 0,05$) в двух возрастных группах.

Проведя статистический анализ на выявления связи между ферментами системы СРО окисления у здоровых и больных РТК мы получили интересный результат — установлены корреляционные связи между активностями ферментов ПОС — АДА и КО как у здоровых, так и у больных РТК, однако в плазме последних связь была более тесной (Рис. 1).

Исследуя взаимосвязь между ферментами АОС, статистически значимые результаты были получены только у здоровых людей (Рис 2.), тогда как у онко-

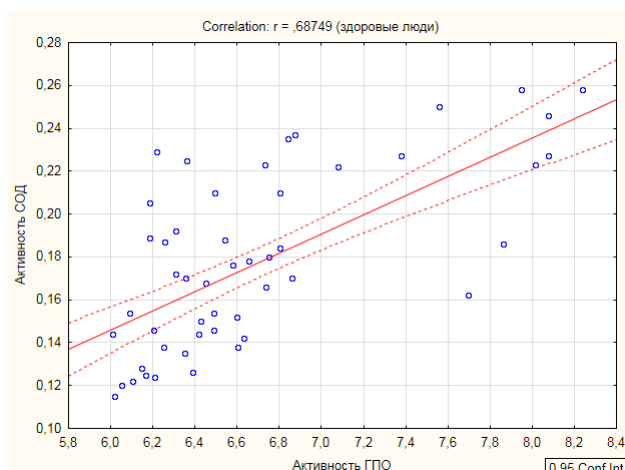


Рисунок 2. Взаимозависимость активностей СОД и ГПО в плазме крови у здоровых людей, значения всех коэффициентов корреляции статистически достоверны при $p < 0,001$.

больных корреляционной зависимости между активностями СОД и ГПО в плазме крови не обнаружено.

Следовательно, при старении как у здоровых людей, так и у больных РТК происходит однонаправленное изменение в системе СРО — снижение АОС на фоне повышения ПОС и уровня ее конечных метаболитов. Это в свою очередь свидетельствует об усилении катаболизма пуринов с последующей стимуляцией СРО при старении организма, приводя к повышению уровня 2,4-динитрофенилгидразонов и NO_x , тем самым способствуя формированию ОС.

Однако нами выявлено, что при онкопатологии динамика изменений в ПОС имеет более выраженный характер, по сравнению со здоровыми людьми, тогда как активности ферментов первой линии АОС имеют разнонаправленные изменения у больных РТК и здоровых людей, что характеризует сбой в системе защиты от АФК не только при старении но при канцерогенезе.

Заключение.

Таким образом, при старении организма, происходит повышение прооксидантного статуса плазмы крови, что сочетается с нарушением в работе АОС, связанной с изменениями в обмене нуклеотидов. Такая взаимосвязь способствует угнетению антиоксидительного потенциала плазмы крови, следовательно, может служить одним из факторов на этапе развития онкологической патологии. Так же между ферментами пуринового обмена выявлены тесные взаимосвязи, что способствует интенсификации ОС — одного из ключевых факторов патогенеза канцерогенеза, способствуя возникновению и последующему росту злокачественной опухоли.

Следовательно, контроль за динамикой изменения активностей ферментов ПОС и АОС в плазме крови может быть использован в клинической онкологии и выступать одним из прогностических факторов риска РТК. Дальнейшее изучение этой проблемы необходимо для совершенствования диагностических возможностей, с учетом сведений о биологических особенностях РТК.

Список литературы.

1. Dubovichenko D.M., Valkov M.Iu., Merabishvili V.M. i dr. Zabolevaemost i smertnost ot raka priamoj kishki (obzor literatury i sobstvennoe issledovanie). *Voprosy onkologii*. 2019;65(6):816–824. (In Russ.).
2. Dubovichenko D.M., Valkov M.Iu., Merabishvili V.M. i dr. Epidemiologicheskaja otsenka vyzhivaemosti pri rake priamoj kishki: obzor literatury i sobstvennoe issledovanie. *Voprosy onkologii*. 2020;66(1):36–41. (In Russ.).
3. GLOBOCAN2018: estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012 [accessed 03.11.2018]. Available at: <http://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie>.
4. Hultcrantz R. Aspects of Colorectal cancer screening, methods, age and gender. *J Intern Med*. 2020. doi:10.1111/joim.13171
5. Kaprin A.D., Starinskii V.V., Petrova G.V. Zlokahestvennye novoobrazovaniya v Rossii v 2017 godu (zabolevaemost' i smertnost'). M.: MNIOI im. P.A. Gertsena, filial FGBU «NMITS radiologii». 2018:250. (In Russ.).
6. Goldsmith T. Evolution of aging theories: Why modern programmed aging concepts are transforming medical research. *Biochemistry (Moscow)*. 2016;81(12):1406–1412. doi:10.1134/s0006297916120026
7. Zuikov, S.A. Study of nucleotide metabolism and its interrelation with pro-oxidant and antioxidant systems in people of different ages. *Advances in Gerontology*. — 2015;5(2):84–88.
8. Costas-Chavarri A, Nandakumar G, Temin S, et al. Treatment of Patients With Early-Stage Colorectal Cancer: ASCO Resource-Stratified Guideline. *J Glob Oncol*. 2019;5:1–19. doi:10.1200/JGO.18.00214
9. Singh K, Bhoir M, Kasu YA, Bhat G, Marar T. Antioxidants as precision weapons in war against cancer chemotherapy induced toxicity — Exploring the armoury of obscurity. *Saudi Pharm J*. 2018;26(2):177–190. doi:10.1016/j.jsps.2017.12.013
10. Choi DG, Venkatesan J, Shim MS. Selective Anticancer Therapy Using Pro-Oxidant Drug-Loaded Chitosan-Fucoidan Nanoparticles. *Int J Mol Sci*. 2019;20(13):3220. doi:10.3390/ijms20133220
11. Evalde N, James P, Onuora O et al. Clinical Diagnosis of Disease States Using Enzymes and Proteins (Review). *Asian Journal of Biochemistry, Genetics and Molecular Biology*. 2019:1–6. doi:10.9734/ajbgbmb/2018/v1i329642
12. Tritsch G.L. Validity of the continuous spectrophotometric assay of Kalckar for adenosine deaminase activity. *Anal. Biochem*. 1983;129(1):207–209.
13. Meditsinskie laboratornye tekhnologii: rukovodstvo po klinicheskoi laboratornoi diagnostike: v 2 t. / [V.V. Alekseev i dr.]; pod red. A.I. Karpishchenko. 3-e izd., pererab. i dop. M.: GEOTAR-Media, 2013;2:40–41. (In Russ.).

14. Mazhitova M. V. Spektrofotometricheskoe opredelenie urovnya metabolitov monooksida azota v plazme krovi i tkani mozga belykh krys. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2011;3. Available on: <http://www.science-education.ru/97-4655>. (In Russ.).
15. Unanyan L. S., Sotskii P., Khachatryan L. G. [et al.]. Okislitel'naya modifikatsiya belkov syvorotki krovi belykh krys pod vliyaniem shuma i α 2-adrenoblockatorov. *Biolog. zhurn. Armenii*. 2010;1(62):79–83. (In Russ.).
16. 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.
17. Makarevich O. P., Golikov P. P. Aktivnost' superoksidodismutazy krovi v ostryi period razlichnykh zabolevaniy. *Lab. delo*. 1983;6:24–27. (In Russ.).
18. Moin V. M. A simple and specific method for determining glutathione peroxidase activity in erythrocytes. *Lab. Delo*. 1986;12:724–727.
19. Fransen M, Nordgren M, Wang B, Apanasets O, Van Veldhoven PP. Aging, age-related diseases and peroxisomes. *Subcell Biochem*. 2013;69:45–65. doi: 10.1007/978-94-007-6889-5_3

S. A. Zuikov, G. E. Polunin

Research of age changes of free radical oxidation in patients with colon cancer

State Educational Institution of Higher Professional Education "M. Gorky Donetsk National Medical University"

Aim: compare changes in free radical oxidation (FRO) in blood plasma of healthy people and patients with colon cancer (CC) depending on age.

Materials and Methods: the material was the blood plasma of 80 healthy people aged 40 to 80 years without oncopathologies of the gastrointestinal tract and 26 patients CC with stages I–II of the disease. The histological form of CC was adenocarcinoma. We studied the activity of key enzymes of purine nucleotide catabolism — adenosine deaminase (ADA) and xanthine oxidase (XO) — which are a recognized growth factor and stimulants of FRO. The total content of nitrates / nitrites (NO_x) and the level of 2,4-dinitrophenylhydrazones were studied as products, indicators of the intensity of FR processes. To study the antioxidant system (AOS), the activities of the first line of defense enzymes — superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPO) — were studied. The method of research of all indicators was spectrophotometry.

Results: an increase in the enzymatic activities of ADA and XO, as well as the content of 2,4-dinitrophenylhydrazones, indicators of protein oxidative modification, has been established in blood plasma in healthy people during aging. Similar results of changes in the studied parameters were found during tumor transformation. It was also found that with CC, a more pronounced intensification of FRO occurs with the subsequent formation of oxidative stress (OS). Correlations between the enzymes of purine metabolism in blood plasma in healthy people and patients with CC were revealed.

Conclusion: the data obtained indicate an increase in purine catabolism, both during aging and during tumor transformation, which can be used as prognostic risk factors for CC.

Keywords: adenosine deaminase, xanthine oxidase, nitric oxide, oxidative modification of proteins, colon cancer, aging, oxidative stress.