

ИССЛЕДОВАНИЕ СООТНОШЕНИЯ ПРООКСИДАНТНОЙ И АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМ ПРИ ОПУХОЛЯХ КИШЕЧНИКА

С.А. Зуйков, Б.Г. Борзенко, О.В. Зуйкова

*Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького» г. Донецк
83003, Украина, г. Донецк, пр. Ильича, 16, e-mail: 83chem@mail.ru*

Исследована взаимосвязь обмена пуриновых нуклеотидов с антиоксидантной системой у больных раком толстой кишки, а также влияние ключевых ферментов распада пуринов на пул образования активных форм кислорода. В ходе исследования были определены ферментативные показатели прооксидантной системы: аденозиндезаминаза и ксантинооксидаза, а также уровень оксида азота. Показателем антирадикальной системы служили супероксиддисмутаза и глутатионпероксидаза. Было обследовано 22 больных колоректальным раком (КРР) I–IV стадий, в возрасте 40–59 лет. Установлено значимое повышение показателей прооксидантной системы в гомогенате опухолевой ткани относительно неизменной ткани слизистой кишечника у больных КРР и неоднозначное изменение активности антиоксидантной системы в зависимости от стадии заболевания. Выявлено, что при окислительном стрессе и в условиях гипоксии на более поздних стадиях рака антиоксиданты могут способствовать лучшему выживанию опухолевых клеток и более быстрому прогрессированию опухоли.

Ключевые слова: ксантинооксидаза, аденозиндезаминаза, оксид азота, супероксиддисмутаза, глутатионпероксидаза, колоректальный рак.

CORRELATION OF PRO-OXIDANT WITH ANTIOXIDANT SYSTEMS IN CASE OF COLORECTAL TUMORS

S.A. Zuikov, B.G. Borzenko, O.V. Zuikova

Donetsk National Medical University, Donetsk

16, Illycha Avenue, 83003-Donetsk, Ukraine, e-mail: 83chem@mail.ru

Correlation between purinenucleotides exchange and antioxidant system in patients with colorectal cancer (CC), as well as influence of key enzymes of purine decomposition on formation of active forms of oxygen were studied. During the process of study, enzymatic indicators of prooxidant system – adenosine deaminase and xanthineoxidase, as well as the level of nitric oxide were identified. Superoxidedismutase and glutathione peroxidase were the indicator of antiradical system. 22 patients aged 40–59 years with colorectal cancer of different stage were examined. A significant increase in indicators of prooxidant system in tissue homogenate of patients with CC and ambiguous changes in the activity of the antioxidant system, depending on the stage of the disease, were established. It was established that during the oxidative stress and in conditions of hypoxia, at the later stages of cancer, antioxidants may contribute to better survival ability of tumor cells and to more rapid tumor progression.

Key words: xanthine oxidase, adenosine deaminase, nitric oxide, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, homogenate, colorectal cancer.

Онкологические заболевания являются актуальной проблемой в Украине и во всем мире, а опухоли кишечника занимают одно из первых мест в структуре данной патологии [2]. Известно, что при раке толстой кишки происходит нарушение кровотока в слизистой оболочке, приводящее к гипоксическим явлениям различной выраженности, с последующим нарушением утилизации кислорода и усиленной генерацией свободных радикалов [10]. Такие факторы, как активация гликолиза, усиление синтеза компонентов нуклеиновых кислот и клеточных структур: нуклеотидов, белков, компонентов мембран, как правило, связаны с высокой

пролиферативной активностью. Установлено, что онкологическим больным присуща серия метаболических нарушений, тесно связанных между собой [6]. При этом изменения в нуклеиновом, углеводном, энергетическом обменах и в антиоксидантной системе могут быть обусловлены репарационными процессами и быть этапом в развитии онкологической патологии [1].

Целью исследования являлось изучение обмена нуклеотидов и его взаимосвязи с прооксидантной (ПОС) и антиоксидантной системами (АОС) в гомогенате опухолевых тканей больных колоректальным раком (КРР) различной стадии.

Нами была изучена активность ключевых ферментов распада пуриновых нуклеотидов: аденозиндезаминазы (АДА) и ксантинооксидазы (КО), которые являются ферментативными источниками образования активных форм кислорода (АФК), оказывающих существенное влияние на пул прооксидантов [13], а также неферментативного представителя ПОС – оксида азота (NO), способного проявлять свободнорадикальные свойства. Для изучения антиоксидантного звена защиты нами были определены активности ее ключевых ферментов: супероксиддисмутазы (СОД) и глутатионпероксидазы (ГПО) [12]. Значения этих показателей в гомогенатах тканей мы определяли для изучения действия ПОС и АОС при РТК.

Материал и методы

Исследование показателей проводилось в гомогенате ткани опухоли. Контролем служила неизменная ткань слизистой оболочки кишечника – ткань края резекции, отдаленная от опухоли (min 30 мм от опухолевого инфильтрата) и не имеющая признаков злокачественной трансформации. Материал для исследования был взят после радикальной операции. Обследовано 22 больных (15 мужчин и 7 женщин) в возрасте от 40 до 59 лет, средний возраст составил 52 года. Основной гистологической формой КРР была умереннодифференцированная аденокарцинома (G2), выявленная в 11 случаях, низкодифференцированная аденокарцинома (G3) диагностирована у 7, высокодифференцированная аденокарцинома (G1) – у 4 больных. Пациенты были разделены на две группы в зависимости от стадии рака: в 1-ю группу были включены 12 человек с I–II стадией, во 2-ю группу – 10 человек с III–IV стадией рака. При проведении статистического анализа исследуемых показателей ПОС и АОС по гендерному признаку значимых отличий нами не обнаружено.

Активность АДА определяли по изменению оптической плотности реакционной смеси при длине волны 265 нм, обусловленному накоплением инозина при гидролитическом распаде аденозина [11]. Определение активности КО основано на способности фермента генерировать супероксид-анион-радикал, о содержании которого судили по скорости восстановления нитросинего тетразолия в формазан [3]. Эндогенный уровень NO в форме нитрит-аниона (NO_2^-) после ферментативного восстановления нитратов в нитриты определяли с по-

мощью классической реакции Грисса и обозначали как NO_x [4]. Активность СОД определялась по торможению аутоокисления адреналина, окисляющегося самопроизвольно в щелочной среде с образованием окрашенного соединения – адrenoхрома с пиком поглощения на 480 нм. Активность СОД выражалась в единицах активности на мг белка (ед/мг). За 1 условную единицу активности СОД принимают количество фермента, необходимое для замедления реакции аутоокисления адреналина в 2 раза. Определение активности ГПО основано на измерении скорости окисления восстановленного глутатиона (GSH) в присутствии фермента и НАДФН, регистрируемого спектрофотометрически по изменению оптической плотности среды в процессе реакции, 1 мкМ НАДФН соответствует 1 мкМ GSH. Все исследуемые показатели определялись спектрофотометрически и регистрировались на спектрофотометре Specord-200. Статистическая обработка данных проводилась с помощью программы «Statistica 10.0» Statsoft. Для проверки распределения данных на нормальность использовался критерий W Шапиро – Уилка. Корреляционный анализ проводился с помощью критерия ранговой корреляции Спирмена.

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 заявляют, что не имеют конкурирующих интересов.

Результаты исследования

При исследовании ферментативных и неферментативных представителей ПОС у больных КРР нами было установлено увеличение всех показателей в опухолевой ткани относительно слизистой как в первой, так и во второй группе онкобольных. Одновременно исследовав активность ферментов АОС, мы установили снижение всех показателей в опухолевой ткани относительно неизменной ткани слизистой (таблица). Полученные данные свидетельствуют об ослаблении антиоксидантной системы в опухолевой ткани относительно неизменной слизистой, что проявляется снижением активности ее ферментативных представителей СОД и ГПО, при этом обнаруженное увеличение

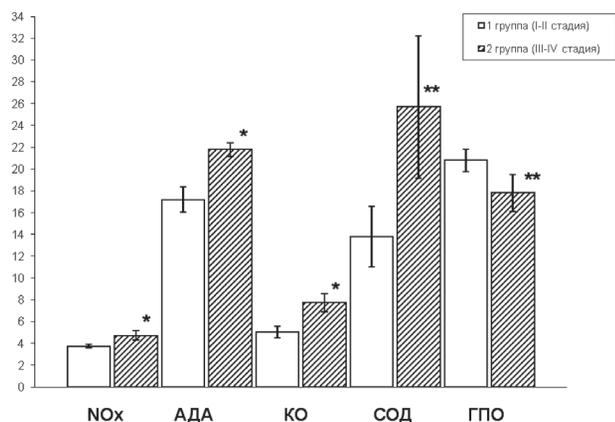


Рис. 1. Сравнение исследуемых показателей прооксидантной и антиоксидантной систем в гомогенате опухолевых тканей у больных КРП при разной стадии заболевания ($M \pm \sigma$): по оси X – исследуемые показатели ПОС и АОС в гомогенате ткани опухоли, по оси Y – активности исследуемых показателей.

Примечание: * – различия статистически значимы по сравнению с показателями 1-й группы (КРП I–II стадий), $p < 0,001$; ** – различия статистически значимы по сравнению с показателями 1-й группы (КРП I–II стадий), $p < 0,05$

активности ферментативных и уровня неферментативных показателей ПОС способствует усилению окислительного стресса у онкобольных.

Обсуждение

При сравнении исследуемых показателей в гомогенате опухолевой ткани в зависимости от стадии рака было обнаружено значимое увеличение всех представителей ПОС у больных КРП на более поздних стадиях заболевания. Однако в работе АОС наблюдались неоднозначные изменения: обнаружено, что активность СОД увеличивалась в опухолевой ткани во второй группе относительно первой практически в 2 раза, при этом фермент

второй линии защиты ГПО сохранял тенденцию к снижению (рис. 1).

Такую динамику можно объяснить следующим. Повышение содержания АФК сопровождается истощением активности ферментов АОС, а именно, известно, что АФК наиболее интенсивно атакуют тиоловые белки, окисляя SH-группы, что приводит к их структурной модификации. Такими белками являются ключевые ферменты метаболизма углеводов, нуклеотидов и системы антирадикальной защиты, один из которых ГПО [5]. Причем данная модификация приводит к переходу КО из дегидрогеназной формы, которая работает в физиологических условиях, в оксидазную, образующую супероксиданион радикал (O_2^-), что еще больше способствует усиленному образованию АФК [7].

Известно, что при данной патологии наблюдаются гипоксические процессы в клетке, стимулирующие нитратредуктазную активность, и, как следствие, возрастание уровня NO_x , необходимых для генерации NO. Избыточный синтез NO, сочетающийся с гиперпродукцией O_2^- , приводит к взаимодействию этих метаболитов друг с другом с синтезом пероксинитрита ($ONOO^-$), способного к образованию нитрозаминов, обладающих канцерогенными свойствами, что, в свою очередь, препятствует гибели раковых клеток по механизму апоптоза, но способствует усилению метастазирования опухолевых клеток [8], так как опухолевый процесс связан с усиленной генерацией активных форм кислорода, которые играют двоякую роль в канцерогенезе, выступая, с одной стороны, фактором прогрессии опухоли, а с другой – при очень высокой концентрации могут необратимо повредить и саму раковую клетку [9].

Таблица

Показатели прооксидантной и антиоксидантной систем в гомогенате тканей у больных КРП в зависимости от стадии заболевания ($M \pm \sigma$)

Показатели	1-я группа, I–II стадия (n=12)		2-я группа, III–IV стадия (n=10)	
	Неизменная слизистая	Опухоль	Неизменная слизистая	Опухоль
NO _x , мкмоль/л	2,02 ± 0,22	3,74 ± 0,16**	2,56 ± 0,38	4,74 ± 0,42**
АДА, нмоль/мин×мг	10,2 ± 0,87	17,2 ± 1,17**	12,6 ± 0,81	21,8 ± 0,63**
КО, мкмоль/мин×мг	2,88 ± 0,29	5,06 ± 0,52*	3,58 ± 0,34	7,75 ± 0,83**
СОД, ед/мг	46,7 ± 8,06	13,8 ± 2,79**	57,7 ± 6,40	25,7 ± 6,52**
ГПО, мкмоль/мин×мг	26,3 ± 1,15	20,8 ± 1,02*	22,6 ± 0,99	17,8 ± 1,66**

Примечание: * – различия статистически значимы по сравнению неизменной тканью слизистой оболочки кишечника ($p < 0,05$); ** – различия статистически значимы по сравнению с неизменной тканью слизистой оболочки кишечника ($p < 0,001$).

Таким образом, можно говорить о том, что при сходном уровне генерации супероксида (безусловно, повышенном), у больных 2-й группы в опухоли имеется значительное усиление антирадикальной защиты, что может способствовать лучшему выживанию опухолевых клеток и более быстрому прогрессированию опухоли (это согласуется с клиническим течением заболевания у данной группы больных).

Заключение

Установленные нарушения работы АОС в гомогенате ткани опухоли оказывают существенное влияние на жизнеспособность опухолевой клетки и её функциональную полноценность, что более характерно на поздних стадиях заболевания. Такие нарушения вызывают дисбаланс между ПОС и АОС, которые тесно связаны с ферментативными изменениями в обмене нуклеотидов, способствуют регуляции друг друга по принципу обратной связи, что приводит к развитию окислительного стресса и, как следствие, структурной модификации, прежде всего, биомембран, ферментов и нуклеотидов. От степени выраженности этих нарушений, в свою очередь, зависит интенсивность обменных процессов и патогенетическая перестройка на клеточном уровне. Следовательно, баланс между окислителями и антиоксидантами является ключевым вопросом в развитии рака, который остается актуальным до настоящего времени.

ЛИТЕРАТУРА

1. Анисимов В.Н. Молекулярные и физиологические механизмы старения: в 2 т. СПб.: Наука. 2008. Т. 2. 434 с.
2. Денисенко В.Л., Гаин Ю.М. Осложнения колоректального рака: проблемы и перспективы // Новости хирургии. 2011. Т. 19, № 1. С. 103–111.
3. Карпищенко А.И. Медицинские лабораторные технологии: Руководство по клинической лабораторной диагностике: в 2 т. М., 2013. Т. 2. С. 40–41.
4. Мажитова М.В. Спектрофотометрическое определение уровня метаболитов монооксида азота в плазме крови и ткани мозга белых крыс // Современные проблемы науки и образования. 2011. № 3. URL: www.science-education.ru/97-4655
5. Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К., Бондарь И.А., Круговых Н.Ф., Труфакин В.А. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты. М.: Фирма «Слово», 2006. 556 с.
6. Georg T. Redox-Directed Cancer Therapeutics: Molecular Mechanisms and Opportunities // Wondrak Antioxidants & Redox Signaling. 2009. Vol. 11 (12). P. 3013–3069.
7. Harrison R. Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? // Free Radic. Biol. Med. 2002. Vol. 33 (6). P. 774–797.
8. Kamat J.P. Peroxynitrite: a potent oxidizing and nitrating agent. // Indian J. Exp. Biol. 2006. Vol. 44 (6). P. 436–447.
9. Kariya S., Sawada K., Kobayashi T., Karashima T., Shuin T., Nishioka A., Ogawa Y. Combination treatment of hydrogen peroxide and X-rays induces apoptosis in human prostate cancer PC-3 cells // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 2009. Vol. 75 (2). P. 449–454. doi: 10.1016/j.ijrobp.2009.04.092.
10. Rainis T., Maor I., Lanir A., Shnizer S., Lavy A. Enhanced oxidative stress and leucocyte activation in neoplastic tissues of the colon // Dig. Dis. Sci. 2007. Vol. 52 (2). P. 526–530.
11. Shatova O.P., Borzenko B.G., Zinkovich I.I., Sedakov I.E. Lactate dehydrogenase, adenosine deaminase and thymidine phosphorylase activity of blood and tissues in breast cancer // Ukr. Biokhim. Zh. 2009. Vol. 81 (4). P. 88–93.
12. Singh K., Singh N., Chandy A., Manigauha A. In vivo antioxidant and hepatoprotective activity of methanolic extracts of *Daucus carota* seeds in experimental animals // Asian Pac. J. Trop. Biomed. 2012. Vol. 2 (6). P. 385–388. doi: 10.1016/S2221-1691(12)60061-6.
13. Zhou F.L., Zhang W.G., Wei Y.C., Meng S., Bai G.G., Wang B.Y., Yang H.Y., Tian W., Meng X., Zhang H., Chen S.P. Involvement of oxidative stress in the relapse of acute myeloid leukemia // J. Biol. Chem. 2010. Vol. 285 (20). P. 15010–15015. doi: 10.1074/jbc.M110.103713.

Поступила 28.12.13

REFERENCES

1. Anisimov V.N. Molecular and physiological mechanisms of aging. SPb.: Nauka, 2008. Vol. 2. 434 p. [in Russian]
2. Denisenko V.L., Gain Ju.M. Complications of colorectal cancer: problems and prospects // Novosti hirurgii. 2011. Vol. 19 (1). P. 103–111. [in Russian]
3. Karpishhenko A.I. Medical laboratory technologies: Clinical Laboratory Practice Guidelines in two volumes. M., 2013. Vol. 2. P. 40–41. [in Russian]
4. Mazhitova M.V. Spectrophotometric determination of the level of metabolites of nitrogen monoxide in blood plasma and brain tissue of white rats // Современные проблемы науки и образования. 2011. № 3. URL: www.science-education.ru/97-4655 [in Russian]
5. Men'shnikova E.B., Lankin V.Z., Zenkov N.K., Bondar' I.A., Krugovyh N.F., Trufakin V.A. Oxidative stress. Pro-oxidants and oxidants. M.: Firma «Slovo», 2006. 556 p. [in Russian]
6. Georg T. Redox-Directed Cancer Therapeutics: Molecular Mechanisms and Opportunities // Wondrak Antioxidants & Redox Signaling. 2009. Vol. 11 (12). P. 3013–3069.
7. Harrison R. Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? // Free Radic. Biol. Med. 2002. Vol. 33 (6). P. 774–797.
8. Kamat J.P. Peroxynitrite: a potent oxidizing and nitrating agent. // Indian J. Exp. Biol. 2006. Vol. 44 (6). P. 436–447.
9. Kariya S., Sawada K., Kobayashi T., Karashima T., Shuin T., Nishioka A., Ogawa Y. Combination treatment of hydrogen peroxide and X-rays induces apoptosis in human prostate cancer PC-3 cells // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 2009. Vol. 75 (2). P. 449–454. doi: 10.1016/j.ijrobp.2009.04.092.
10. Rainis T., Maor I., Lanir A., Shnizer S., Lavy A. Enhanced oxidative stress and leucocyte activation in neoplastic tissues of the colon // Dig. Dis. Sci. 2007. Vol. 52 (2). P. 526–530.
11. Shatova O.P., Borzenko B.G., Zinkovich I.I., Sedakov I.E. Lactate dehydrogenase, adenosine deaminase and thymidine phosphorylase activity of blood and tissues in breast cancer // Ukr. Biokhim. Zh. 2009. Vol. 81 (4). P. 88–93.
12. Singh K., Singh N., Chandy A., Manigauha A. In vivo antioxidant and hepatoprotective activity of methanolic extracts of *Daucus carota* seeds in experimental animals // Asian Pac. J. Trop. Biomed. 2012. Vol. 2 (6). P. 385–388. doi: 10.1016/S2221-1691(12)60061-6.
13. Zhou F.L., Zhang W.G., Wei Y.C., Meng S., Bai G.G., Wang B.Y., Yang H.Y., Tian W., Meng X., Zhang H., Chen S.P. Involvement of oxidative stress in the relapse of acute myeloid leukemia // J. Biol. Chem. 2010. Vol. 285 (20). P. 15010–15015. doi: 10.1074/jbc.M110.103713.