

ОСОБЕННОСТИ ГЕНЕРАЦИИ 2-ДЕЗОКСИ-D-РИБОЗО-1-ФОСФАТА ОПУХОЛЮ, СВЯЗЬ С ПРОДУКЦИЕЙ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА

Бакурова Е.М.

Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького
пр. Ильича, 16, г. Донецк, 83003, Украина; e-mail: 32023@mail.ru

Поступила в редакцию: 01.07.2018.

Аннотация. Выполнено сравнительное исследование активности ферментов обмена тимидина, аденозина и антиоксидантной системы в 44 образцах тканей эпителиальных опухолей распространенного рака желудка и кишечника (ЖКТ), немелкоклеточного рака легких (НМКРЛ). В качестве индивидуального контроля использовали нетрансформированные ткани края резекции. Выявлено повышение опухолевой активности тимидинфосфорилазы (ТФ) в 1,8 раза ($p = 0,002$) и аденозиндезаминазы (АДА) в 1,7 – 1,9 раз ($p = 0,001$); установлена корреляция трансферазной активности ТФ и АДА ($p = 0,704$; $p < 0,001$). Это обеспечивает как продукцию 2-дезоксид-рибозо-1-фосфата (2-д-Д-Риб-1-Ф), так и ресинтез дезокситимидина, необходимого для синтеза дезокситимидилата по «запасному пути». При этом снижение активности глутатионпероксидазы способствует как усилению процессов гликирования в опухолях избыточной 2-д-Д-Риб, так и повышению уровней H_2O_2 . Сделан вывод, что данные особенности обмена способствуют резонированию эффектов гликативного и оксидативного стрессов, сопровождающих опухолевую прогрессию.

Ключевые слова: ферменты, 2-дезоксид-рибоза, перекись водорода, опухоль.

В настоящее время одним из промотеров опухолевой прогрессии считают гликативный стресс. В частности, с ним связывают активацию ангиогенеза, метастазирование, инвазию, устойчивость к апоптозу, иммуносупрессию [1]. Его реализуют конечные продукты неферментативного гликирования (гликозилирования, или «advanced glycation end products» - AGEs). Было установлено, что продукция дикарбониллов и AGEs может быть опосредована повышением уровней клеточной альдопентозы – 2-дезоксид-рибозы (2-д-Д-Риб) [2]. Существенный вклад в генерацию фосфорилированной 2-д-Д-Риб может иметь фермент «запасного пути» синтеза тимидилата – тимидинфосфорилаза [3]. Продукт обратимого фосфорилирования дезокситимидина – 2-дезоксид-рибозо-1-фосфат активирует ангиогенез [3], повышает продукцию активных форм кислорода (АФК) [4]. Параллельному увеличению продукции АФК и радикалов способствует ингибирование 2-д-Д-Риб синтеза глутатиона, необходимого клетке для детоксикации AGEs [5].

С индивидуальными особенностями экспрессии и активности ТФ связаны чувствительность опухоли к фторпиримидинам, усиление ангиогенеза, метастазирования, пролиферации, устойчивость к апоптозу [6]. Полифункциональность фермента обусловлена не только эффектами продуктов реакции, но и видами его активности. Образование дезокситимидина (субстрата для тимидинкиназы - маркера пролиферации) возможно преимущественно за счет его альтернативной трансферазной активности. В качестве косубстрата – донора фосфонтозы может быть использован пуриноклеозид. Считаем, что одновременное исследование классической фосфорилазной активности (катаболической, ТФк) вместе с трансферазной (анаболической, ТФан), позволит учитывать как ангиогенные, антиапоптотические эффекты ТФ, так и пропролиферативные. В условиях *in vivo* естественным поставщиком косубстрата для ТФан является аденозиндезаминаза (АДА) – фермент, лимитирующий клеточные уровни еще одной регуляторной молекулы – аденозина. Ранее нами была исследована метаболическая гетерогенность аденокарцином желудка, кишечника, немелкоклеточного рака легких. Установлена корреляция активности ТФан и АДА, а также ТФан и ТФк с индивидуальными особенностями пролиферации и ангиогенеза опухоли (соответственно, с уровнями Ki-67, CD34) [6]. В то же время исследования кумулятивного эффекта особенностей активности ТФ и усиления прооксидантных процессов в опухолях немногочисленны. В данной работе опухолевую активность ферментов обмена тимидина и аденозина изучали параллельно с активностью ферментов антиоксидантной системы (АОС) – супероксиддисмутазы (СОД) и глутатионпероксидазы (ГПО).

Цель исследования: в опухолях различной локализации изучить особенности видов активности тимидинфосфорилазы, аденозиндезаминазы, сопоставив с активностью ферментов антиоксидантной системы – супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выполнено сравнительное исследование активности ферментов в 44 образцах тканей эпителиальных опухолей распространенного рака желудка и кишечника (ЖКТ), немелкоклеточного рака легких (НМКРЛ) T₃₋₄N_xM₀₋₁ стадий. Индивидуальным контролем служили нетрансформированные ткани края резекции. Виды активности ТФ определяли спектрофотометрически на СФ-46 при λ 300 и 267 нм по изменениям оптической плотности тимина (тимидина) в 0,01 нNaOH [7]. Активность аденозиндезаминазы исследовали по снижению оптической плотности аденозина при 265 нм [7]. Метод определения активности супероксиддисмутазы основан

на способности СОД тормозить автоокисление адреналина [8]. Активность глутатионпероксидазы (ГПО) оценивали по изменению содержания восстановленного глутатиона, определяя его конъюгаты с 2-нитро-5-тиобензоатом [8]. Статистическая обработка полученных результатов исследования проводилась с помощью лицензионных программ «MedStat» (Альфа) и «Statistica 5.5» (StatSoft). Для проверки распределения на нормальность применялся критерий W Шапиро-Уилка. При анализе данных для оценки генеральной совокупности использовались стандартные характеристики, проводился однофакторный анализ Крускалла-Уоллиса и медианный тест (χ^2).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Особенности видов активности ферментов изучали в сопоставлении с индивидуальным контролем в гомогенатах тканей немелкоклеточного рака легких (НМКРЛ), аденокарцином желудка и кишечника (ЖКТ) (табл. 1).

Таблица 1. Активность ферментов антиоксидантной системы, катаболизма тимидина и аденозина в тканях рака легких, желудка, кишечника, нмоль/мин·мг (медиана, первый и третий квартили)

	СОД		ГПО		ТФк		ТФан		АДА	
	К-ль	Рак	К-ль	Рак	К-ль	Рак	К-ль	Рак	К-ль	Рак
Легкие (n = 22)	0,99 (0,80; 1,14)	0,95 (0,69; 1,38)	3,38 (2,30; 5,12)	2,88 * (1,90; 4,16)	96,08 (78,88; 129,41)	171,06** (120,24; 211,88)	129,07 (106,70; 150,00)	201,73** (148,88; 264,49)	122,31 (103,24; 149,05)	202,30** (181,14; 231,14)
ЖКТ (n = 22)	1,18 (0,96; 1,47)	1,25 (1,00; 1,72)	2,23 (1,55; 2,99)	1,63 * (1,11; 2,12)	71,57 (62,72; 87,26)	130,07** (99,88; 145,11)	125,76 (103,00; 144,49)	203,09** (144,54; 245,71)	125,56 (107,44; 139,52)	234,39** (164,63; 276,24)

Примечание. * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,05$ по сравнению с индивидуальным контролем.

Сопоставление ферментативной активности в нетрансформированных тканях края резекции (контроли) в зависимости от локализации проводили с использованием U критерия Манна-Уитни. Установили, что активность ТФк в 1,3 раза, а ГПО в 1,5 раза выше в нетрансформированных тканях легкого по сравнению со слизистыми желудка и кишечника (ЖКТ) ($p = 0,003$ как для ТФк, так и для ГПО). Согласно ранговому коэффициенту корреляции Спирмена имеется обратная негативная связь средней силы как для активности ТФк ($p = -0,455$; $p = 0,002$), так и для ГПО ($p = -0,457$; $p = 0,002$) в слизистых ЖКТ в зависимости от локализации. Это также свидетельствует об их большей активности этих ферментов в легких, следовательно, о более высокой продукции в них 2-д-Д-Риб. Возможно, что повышение активности ГПО параллельно с ТФк снижает риски развития эффектов 2-д-Д-Риб. Поскольку помимо нейтрализации перекиси водорода (H_2O_2), восстановленный глутатион имеет решающее значение в детоксикации глиоксала и других дикарбониллов, а также конечных продуктов гликирования (AGEs), уровни которых коррелируют с 2-д-Д-Риб. Достоверных изменений активности остальных ферментов в нетрансформированных тканях в зависимости от локализации не выявлено. Установлена прямая связь средней силы между активностями ТФан и АДА ($p = 0,340$; $p < 0,024$) как в слизистых ЖКТ, так и в легких. Между активностями остальных ферментов достоверных корреляций не выявлено.

Особенности ферментативной активности в опухолях оценивали в сопоставлении с их индивидуальным контролем, используя непараметрический T-критерий Вилкоксона. Установлено нарастание активности ферментов катаболизма нуклеозидов. Как в гомогенатах немелкоклеточного рака легких (НМКРЛ), так и аденокарцином желудка и кишечника (ЖКТ) активность ТФк была выше индивидуальных контролей в среднем в 1,8 раза ($p = 0,002$ при РЛ; $p = 0,001$ в опухолях ЖКТ). В гомогенатах НМКРЛ она была выше, чем в карциномах ЖКТ (U критерий Манна-Уитни = 111,50, $Z = 3,06$, $p = 0,002$). При сопоставлении с их индивидуальными патоморфологическими характеристиками данная особенность ТФк может быть связана с наличием обширных очагов некроза в опухолях НМКРЛ, зачастую развивавшихся на фоне антракоза легких. Активность АДА в НМКРЛ была выше активности в контроле в 1,7 раза, а в опухолях желудка и кишечника еще значительно – в 1,9 раза ($p = 0,001$ как в РЛ, так и в опухолях ЖКТ). Следовательно, можно думать о повышении уровней метаболитов - продуктов их реакций, а именно, 2-деокси-Д-рибозо-1-фосфата (2-д-Д-Риб-1-Ф), тимина и дезоксиинозина в исследуемых опухолях. Наряду с этим имелось параллельное повышение в этих же образцах тканей трансферазной активности ТФан в 1,6 раза по сравнению с их контролями ($p = 0,002$ при РЛ; $p = 0,001$ в опухолях ЖКТ). Известно, что донором 2-д-Д-Риб может являться дезоксиинозин. О чем также свидетельствует усиление связи между активностями АДА и ТФан в опухолях ($p = 0,704$; $p < 0,001$). Вероятно, что повышение видов активности ТФ и АДА - универсальное свойство опухолей данных локализаций. В кооперации оба

фермента обеспечивают как продукцию 2-д-Д-Риб-1-Ф, так и ресинтез дезокситимидина (дТД), необходимого для синтеза дезокситимидилата (дТМФ) по «запасному пути».

При исследовании особенностей опухолевой активности ферментов АОС в сопоставлении с их контролем достоверных изменений активности СОД не выявлено ($p = 0,41$ при РЛ; $p = 0,35$ в опухолях ЖКТ). Активность ГПО при этом имела тенденцию к снижению в среднем в 1,3 раза ($p = 0,01$ при РЛ; $p = 0,02$ в опухолях ЖКТ). Установлена негативная связь изменений активности фермента с патологией, также указывающая на ее снижение в опухолях ($p = -0,465$; $p < 0,05$). Известно, что активность ГПО коррелирует с уровнями функционального (восстановленного) глутатиона (ГТ) [5]. Редукция окисленного ГТ может быть лимитирована уровнями НАДФН₂, потребляемого опухолью при формировании дезоксирибонуклеотидов, при восстановлении дигидрофолата, образующегося в тимидилатсинтазной реакции параллельно с дТМФ и пр. Повышение потребности опухоли в глутатионе на фоне продукции 2-д-Д-Риб и потребления глюкозы обусловлено его уникальными свойствами детоксикации AGEs, образующихся при усилении процессов гликирования. Также, возможно, что диссонанс между возросшими потребностями в глутатионе и отсутствием нарастания активности ГПО из-за его дефицита в опухолях легких, желудка, кишечника, могут быть связаны с ингибированием 2-д-Д-Риб регуляторного фермента синтеза глутатиона – глутамил-цистеин лигазы [5].

Причем в карциномах желудка и кишечника активность ГПО была ниже, чем в карциномах НМКРЛ ($U = 112,00$, $Z = -3,05$, $p = 0,002$). Следовательно, как и в норме, так и в гомогенатах НМКРЛ активности ТФк и ГПО выше, чем в опухолях желудка и кишечника. Между их активностями в гомогенатах опухолей выявлена прямая корреляция ($p = 0,376$; $p < 0,05$). Специфичность этих особенностей метаболизма в зависимости от локализации опухоли подтвердили по результатам рангового однофакторного анализа Крускала-Уоллиса и медианного теста (χ^2). Так для активности ТФк значения критерия $H = 9,38$ ($p = 0,002$), ($\chi^2 = 9,09$; $p = 0,003$), для ГПО, соответственно, $H = 9,31$ ($p = 0,003$), ($\chi^2 = 9,09$; $p = 0,002$). Согласно результатам анализа для остальных ферментов особенности их опухолевой активности не зависели от ее локализации. Для СОД критерий $H = 3,35$ ($p = 0,067$), ($\chi^2 = 0,36$; $p = 0,547$). Для АДА: $H = 0,530$ ($p = 0,467$), ($\chi^2 = 0,36$; $p = 0,547$), для активности ТФан различия также недостоверны.

В опухолях на фоне повышения активности ТФк и АДА не наблюдалось повышения активности ГПО по сравнению с нетрансформированными контрольными тканями. Данный дисбаланс может способствовать как усилению процессов гликирования в опухолях, так и повышению уровней H₂O₂. В результате, развитие оксидативного стресса резонирует эффекты гликативного и карбонильного, сопровождающих опухолевую прогрессию.

ВЫВОДЫ

1. Нарастание видов активности ТФ и АДА в тканях НМКРЛ, аденокарциномах желудка и кишечника – универсальное свойство опухолей данных локализаций, обеспечивающее как продукцию 2-д-Д-Риб-1-Ф, так и ресинтез дезокситимидина, необходимого для синтеза дезокситимидилата по «запасному пути».

2. Снижение активности ГПО на фоне нарастания 2-д-Д-Риб в опухоли может способствовать усилению процессов гликирования и свободно-радикального окисления в опухолях. Это может способствовать формированию агрессивного фенотипа опухоли.

Список литературы / References:

1. Lee K.J., Yoo J.W., Kim Y.K., Choi J.H., Ha T.Y., Gil M. Advanced glycation end products promote triple negative breast cancer cells via ERK and NF- κ B pathway. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 2018, vol. 15, no. 495 (3), pp. 2195-2201.
2. Koh G., Yang E.J., Kim J.Y., Hyun J., Yoo S., Lee S.A. Intracellular glutathione production, but not protein glycation, underlies the protective effects of captopril against 2-deoxy-D-ribose-induced β -cell damage. *Mol. Med. Rep.*, 2015, vol. 12 (4), pp. 5314-5320.
3. Javaid S., Ishtiaq M., Shaikh M., Hameed A., Choudhary M. Thymidine esters as substrate analogue inhibitors of angiogenic enzyme thymidine phosphorylase in vitro. *Bioorg. Chem.*, 2017, no. 70, pp. 44-56.
4. Vara D., Watt J.M., Fortunato T.M. [et al]. Direct Activation of NADPH Oxidase 2 by 2-Deoxyribose-1-Phosphate Triggers Nuclear Factor Kappa B-Dependent Angiogenesis. *Antioxid. Redox. Signal*, 2018, vol. 10, no. 28 (2), pp. 110-130.
5. Backos D.S., Fritz K.S., McArthur D.G. [et al.] Glycation of glutamate cysteine ligase by 2-deoxy-d-ribose and its potential impact on chemoresistance in glioblastoma. *Neurochem. Res.*, 2013, no. 38 (9), pp. 1838-1849.
6. Бакурова Е.М. Взаимосвязь активности тимидинфосфорилазы с индивидуальными особенностями пролиферации и ангиогенеза опухолей основных локализаций. *Новообразование (Neoplasm)*, 2017, № 1 (16), с. 69-72. [Bakurova E.M. Interaction of thymidine phosphorylase activity with individual features of proliferation and angiogenesis of tumors of the main localizations. *Novoobrazovanie (Neoplasm)*, 2017, no. 1 (16), pp. 69-72. (In Russ.)]
7. Borzenko B.G., Bakurova E.M., Mironova K.A. A Double-Function of PD-ECGF/TP Protein that Predict Response to Target Chemotherapy. *Metabolomics*, 2015, 5:e136. doi:10.4172/2153-0769.1000e136.
8. Зуйков С.А., Борзенко Б.Г., Зуйкова О.В. Исследование соотношения прооксидантной и антиоксидантной систем при опухолях кишечника. *Сибирский онкологический журнал*, 2014, № 2 (62), с. 24-27. [Zuikov S.A.,

Borzenko B.G., Zuikova O.V. The relation between prooxidant and antioxidant systems in the intestinal tumors. *Siberian J. of Oncology*, 2014, no. 2 (62), pp. 24-27. (In Russ.)]

**THE FEATURES OF TUMORAL 2-DEOXY-D-RIBOSE-1-PHOSPHATE GENERATION,
ASSOCIATION WITH PRODUCTION OF REACTIVE OXYGEN SPECIES**

Bakurova E.M.

Maksim Gorky National Medical University
pr. Il'icha, 16, Donetsk, 83003, Ukraine; e-mail: 32023@mail.ru

Abstract. A comparative study of the enzymes activity of thymidine, adenosine metabolism and the activity of antioxidant defense enzymes in tumors of different localizations was carried out. Aim: to evaluate the relevance of thymidine phosphorylase (TP), adenosine deaminase (ADA) in 2-deoxy-D-ribose (2-d-D-R-1-P) formation and their association with superoxide dismutase, glutathione peroxidase activity in tumors. We demonstrated that tumor TP activity is higher by 1,8 times ($p = 0,002$), ADA activity is higher by 1,7-1,9 times ($p = 0,001$) as compared to non-neoplastic tissues of resection margin. The positive correlation between the intensity of TP and ADA activity was shown (the index of Spearman's rank correlation, i.e. $\rho = 0,704$; $p < 0,001$). So, tumors can increase the levels of 2-deoxy-D-ribose (2-d-D-R) and can stimulate of deoxythymidilate synthesis by the «salvage pathway» in one time. The nucleoside enzymes activity changes being accompanied by decrease of glutathione peroxidase activity in the tumors. Conclusion: It could be suggested that in cancers of different localizations the glycation by 2-d-D-R being associated with hydrogen peroxide formation. Here, we provide evidence on the impact and cooperation of glycativ stress and oxidative stress in promoting human cancer progression.

Key words: *enzymes, 2-deoxy-D-ribose, hydrogen peroxide, cancer.*