

ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ МЕТАБОЛИЗМА ПУРИНОВЫХ НУКЛЕОТИДОВ, ПРООКСИДАНТНОЙ И АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЖЕЛУДКА

Зуйков С.А., Хомутов С.А., Шатова О.П.

Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького

*пр. Ильича, 16, г. Донецк, 83003, Украина**e-mail: 83chem@mail.ru*

Аннотация. Изучено состояние прооксидантной и антиоксидантной систем у больных раком желудка в зависимости от возраста в опухолевых тканях и нетрансформированных тканях слизистой желудка, а также проведено сравнение изучаемых показателей между опухолевой тканью и слизистой желудка. Так же проанализирована взаимосвязь обменов антиоксидантной/прооксидантной систем и обмена нуклеотидов. Проведено исследование взаимосвязи между исследуемыми показателями в тканях. Материалом были опухолевые и смежные ткани желудка 35 больных в возрасте 40-79 лет. Изучили активность ферментов обмена пуриновых нуклеотидов – аденозиндеаминазу (АДА) и ксантиноксидазу (КО), которая также обладает прооксидантными свойствами; антиоксидантную защиту – глутатионпероксидазу (ГПО) и супероксиддисмутазу (СОД); уровень нитратов/нитритов (NO_x). Методом изучения активности ферментов и уровня NO_x была спектрофотометрия.

Нами установлено снижение глутатионового звена ферментативной защиты клетки при старении у больных РЖ в гомогенате тканей, на фоне усиления пуринового обмена и повышения уровня NO_x, при чем в опухолевой ткани эти изменения носят более выраженный характер по сравнению с неизменной тканью. Обнаружено системное влияние возраста на активность ферментативных и уровень не ферментативных показателей ПОС и АОС, а так на же характер их взаимосвязи между собой в нетрансформированных и опухолевых тканях. У больных РЖ в гомогенате тканей выявлены взаимосвязи между АДА/СОД, АДА/ГПО, СОД/ГПО, СОД/NO_x, ГПО/NO_x максимально тесно связанные между собой в опухолевых тканях.

Ключевые слова: возраст, пуриновые нуклеотиды, прооксиданты, антиоксиданты, активные формы кислорода, рак желудка.

AGE DEPENDENT FEATURES OF PURINE NUCLEOTIDE METABOLISM, PROOXIDANT AND ANTIOXIDANT SYSTEMS OF STOMACH CANCER PATIENTS

Zuikov S.A., Khomutov E.V., Shatova O.P.

Gorky Donetsk National Medical University

*Illich av., 16, Donetsk, 83003, Ukraine**e-mail: 83chem@mail.ru*

Abstract. The status of the pro- and antioxidant systems in the cancer and non-malignized tissues of patients with stomach cancer was studied in depend on age with the comparison the parameters of interest in tumor and stomach mucosa. Thus, the interrelations between pro/antioxidant systems and nucleotides metabolism were analyzed. The cancer and adjacent tissues of 35 patients 40-79 years aged were studied. The activity of purine metabolism enzymes – adenosine deaminase (ADA) and xanthine oxidase (XO), which has the prooxidant ability were determined as well as the activity of antioxidant defense enzyme – glutathione peroxidase (GP) and superoxide dismutase (SOD), and levels of nitrates/nitrites (NO_x). The activities of enzymes were measures by spectrophotometry.

We found the decreasing of the glutathione link of enzymatic defense system of cell in the hemolysate upon aging of patients with SC on background of intensification of purine metabolism and increasing of NO_x level, at that in tumor tissue these changes reveal more expressively in comparison with non-changed tissue. It was found that the age makes the systemic impact on the activity of enzymatic systems and the levels of non-enzymatic parameters of AOS and POS as well the behavior of their relationship in non-transformed and tumor tissues. For patients with SC the strong relationships were found for ADA/SOD, ADA/GPO, SOD/GPO, SOD/NO_x, GPO/NO_x

Key words: age, purines nucleotides, pro-oxidants, antioxidants, reactive oxygen species, gastric cancer.

Злокачественные новообразования являются одной из основных жизнеугрожающих проблем во всём мире, а в России, считаются второй по значимости причиной смертности среди населения, после заболеваний сердечнососудистой системы [1]. В структуре общемировой онкологической заболеваемости 4-е место среди злокачественных новообразований занимает рак желудка (РЖ), а в России – 2-е место [2]. При этом пик заболеваемости РЖ приходится на возраст 65±5 лет, однако, в последние годы наметилась тенденция по существенному омоложению РЖ [3]. Установлено, что показатель смертности очень зависит от ранней диагностики онкозаболевания, возраста больных, клинической стадии, успеха лечения и, конечно же, понимания биологии опухолевого роста [4]. Известно, что с возрастом ухудшаются защитные функции организма, снижается активность антиоксидантной системы (АОС), изменяется скорость обмена белков и нуклеотидов, усиливаются процессы катаболизма и при этом одновременно накапливается большое количество токсических веществ, в том числе и канцерогенных [5]. Есть данные, что старение защищает организм от рака с помощью механизмов запрограммированной гибели клеток, в которых участвуют активные формы кислорода (АФК), но развивающийся при этом оксидативный стресс, в свою очередь, может способствовать

возникновению новообразований. Таким образом, старение является одним из ключевых факторов риска развития онкопатологии [6].

Целью работы, стало сравнительное изучение изменений в работе прооксидантной системы (ПОС) и АОС, а так же их взаимосвязь с обменом пуриновых нуклеотидов (ПНТ) в организме больных РЖ в зависимости от возраста. Нами была изучена активность ключевых ферментов распада ПНТ – аденозиндезаминазы (АДА) и ксантиноксидазы (КО), которые способны нарабатывать АФК, а также активности ферментов первой линии антиоксидантного звена защиты от АФК: супероксиддисмутазы (СОД) и глутатионпероксидазы (ГПО) [7]. Так же, мы исследовали уровень нитратов/нитритов (NO_x) – который является не только показателем метаболизма оксида азота (NO), обладающего свободнорадикальными свойствами, но так же важным источником его в клетках [8]. Значения этих показателей в плазме крови мы определяли для изучения статуса ПОС и АОС при РЖ

Материалы и методы. Исследование изучаемых показателей проводили в гомогенате опухолевой ткани и неизменной ткани слизистой оболочки желудка (СОЖ). Под неизменной тканью 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 с I-IV стадией, в возрасте от 40 до 79 лет. В результате исследований все больные были разделены на две группы в зависимости от возраста: 1-я группа – онкобольные возрастом от 40 до 59 лет, 2-я группа – от 60 до 79 лет. При проведении статистического анализа сравнения показателей обмена ПНТ, ПОС и АОС, достоверных отличий по гендерному признаку нами обнаружено не было, ни для одного из показателей. Определение всех ферментативных и не ферментативных показателей проводили спектрофотометрически и регистрировали 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.

Результаты и их обсуждение. При определении исследуемых показателей у больных РЖ в ткани СОЖ было обнаружено повышение активностей ферментов обмена ПНТ – АДА и КО с возрастом, однако статистически значимых отличий, не обнаружено. Исследуя ферментативное звено АОС в ткани СОЖ, было установлено повышение активности СОД после 59 лет, но достоверно это не подтвердилось (см. табл. 1), при этом обнаружено, что с возрастом в ткани СОЖ происходит достоверное снижение активности ГПО (при $p = 0,005$). Таким образом, можно предположить, что у больных РЖ в нетрансформированных тканях происходит накопления пероксида водорода с возрастом вследствие нарушения его утилизации ГПО. Так же нами установлено достоверное повышение уровня NO_x (при $p = 0.007$) в ткани СОЖ у более пожилых пациентов, т.е. в возрастной группе 60-79 лет по сравнению с группой больных РЖ 40-59 лет.

Таблица 1 – Показатели обмена ПНТ, ПОС и АОС в гомогенате тканей больных РЖ в зависимости от возраста ($M \pm \sigma$)

Показатели	Ткань СОЖ		Опухолевая ткань	
	40-59 лет	60-79 лет	40-59 лет	60-79 лет
АДА (нмоль/мин*мг)	12.1±1.42	12.9±2.19	22.1±2.30	24.7±2.61**
КО (мкмоль/мин*мг)	1.99±0.63	2.12±0.70	6.55±1.97	6.77±1.61
СОД (ед/мг)	50.8±3.71	54.3±8.43	66.0±56.5	86.1±68.1
ГПО (мкмоль/мин*мг)	23.7±2.20	21.7±1.87*	16.1±1.37	14.3±1.68**
NO_x (мкмоль/л)	2.01±0.34	2.29±0.20*	3.43±0.67	3.95±0.83***

Примечание: * - достоверные отличия для СОЖ по сравнению с группой 40-59 лет, $p < 0.05$;

** - достоверные отличия для опухолевой ткани по сравнению с группой 40-59 лет, $p < 0.05$;

***- достоверные отличия для опухолевой ткани по сравнению с группой 40-59 лет, $p < 0.001$.

При определении исследуемых показателей у больных РЖ в ткани опухоли было установлено достоверное повышение активности АДА с возрастом (при $p = 0.0034$). Так же установлено, возрастное повышение активности КО в ткани опухоли больных РЖ, однако достоверных отличий обнаружено не было. Исследуя изменения ферментативного звена АОС в опухолевой ткани у больных РЖ, было обнаружено достоверное снижение активности ГПО в зависимости от возраста (при $p = 0.0012$), при этом активность СОД повышалась, но не достоверно. Содержание NO_x в ткани опухоли у больных РЖ в возрасте 60-79 лет было достоверно выше, по сравнению с группой больных 40-59 лет (при $p = 0.00021$).

При проведении корреляционного анализа изменения исследуемых показателей в зависимости от возраста больных РЖ были установлены следующие корреляции: прямые у NO_x ($r = 0.52$, $p < 0.05$) в ткани СОЖ и опухолевой ткани ($r = 0.45$, $p < 0.05$), у АДА ($r = 0.42$, $p < 0.05$) только в ткани опухоли, при этом обратная взаимосвязь с возрастом была установлена для ГПО ($r = -0.43$, $p < 0.05$) в ткани СОЖ и опухолевой ткани ($r = -0.60$, $p < 0.001$). В результате полученных данных, установлено, что АДА при старении меняет свою активность лишь в опухолевой ткани, тогда как активность ГПО и уровень NO_x однонаправленно изменяются в зависимости от возраста, как в неизменных, так и в опухолевых тканях. Следовательно, определение изменение этих показателей в тканях может расцениваться как биомаркеры не только физиологического, но и патологического старения.

Проведя сравнение исследуемых показателей между опухолевыми тканями и тканями СОЖ, в разных возрастных группах, установлено, что в ткани опухоли активность АДА выше в 1.8 раза ($p < 0.001$), относительно СОЖ, а у более пожилых больных РЖ (60-79 лет) - в 1.9 раза ($p < 0.001$). При этом в группе больных возрастом 40-59 лет активность КО в опухолевой ткани в 3.3 раза выше, чем в ткани СОЖ ($p < 0.001$), а в группе более пожилых пациентов (60-79 лет) она выше в 3.2 раза ($p < 0.001$). Проведя сравнительное исследование между изменением активности СОД в опухолевой ткани и в ткани СОЖ у больных РЖ в 2-х возрастных группах, достоверных отличий в изменении активности фермента установлено не было, ни для одной из групп. Сравнив, активности ГПО нами обнаружено, что независимо от возраста, активность фермента в 1.5 раза ниже в ткани опухоли, чем в ткани СОЖ ($p < 0.001$). При сравнении содержания NOx между тканью СОЖ и опухолевой тканью установлено, что в последней уровень NOx в 1.7 раза выше, чем в СОЖ, причем как в 1-й возрастной группе, так и во 2-й ($p < 0.001$). Из полученных данных видно, что динамика изменения всех исследуемых показателей в гомогенате тканей практически одинакова и не зависит от возраста.

Так же в ткани СОЖ в возрастной группе 40-59 лет нами установлены взаимосвязи между исследуемыми показателями: прямо пропорционально коррелируют между собой СОД/ГПО ($r = 0,71$, $p < 0,001$) и обратно пропорционально - АДА/ГПО ($r = -0,73$, $p < 0,001$), КО/СОД ($r = -0,55$, $p < 0,05$). В группе 60-79 лет нами были установлены прямые положительные взаимосвязи между АДА/NOx ($r = 0,80$, $p < 0,001$), АДА/СОД ($r = 0,71$, $p < 0,001$), СОД/NOx ($r = 0,77$, $p < 0,001$), а так же обратные корреляции между АДА/ГПО ($r = -0,81$, $p < 0,001$), СОД/ГПО ($r = -0,67$, $p < 0,05$), ГПО/NOx ($r = -0,70$, $p < 0,05$). Соответственно, в ткани СОЖ от возраста зависит соотношение между КО/СОД, со средней степенью взаимосвязи, характерное для группы больных возрастом 40-59 лет, при этом установленные нами соотношения между АДА/NOx, АДА/СОД, СОД/NOx, ГПО/NOx с высокой степенью взаимосвязи, характерны только для больных в возрасте 60-79 лет. Установленная связь между СОД/ГПО присуща двум возрастным группам, однако для данной взаимосвязи обнаружен интересный факт, в возрасте 40-59 лет связь по характеру оказалась прямой, а для группы больных РЖ возрастом 60-79 лет – обратной. Следовательно, для данных показателей проявляется влияние возраста на характер связи между этими ферментами в ткани СОЖ. При этом установленная взаимосвязь между АДА/ГПО в ткани СОЖ от возраста не зависит.

При проведении сравнительного анализа исследуемых показателей в опухолевой ткани в группе 40-59 лет нами установлены прямые взаимосвязи между АДА/NOx ($r = 0,49$, $p < 0,05$), АДА/КО ($r = 0,60$, $p < 0,05$), АДА/СОД ($r = 0,66$, $p < 0,05$), КО/NOx ($r = 0,68$, $p < 0,05$), КО/СОД ($r = 0,57$, $p < 0,05$), СОД/NOx ($r = 0,60$, $p < 0,05$). Одновременно были обнаружены обратные взаимосвязи между АДА/ГПО ($r = -0,61$, $p < 0,05$), КО/ГПО ($r = -0,60$, $p < 0,05$), ГПО/NOx ($r = -0,57$, $p < 0,05$), СОД/ГПО ($r = -0,96$, $p < 0,001$). В группе больных РЖ 60-79 лет в опухолевой ткани обнаружены прямые корреляции между АДА/NOx ($r = 0,56$, $p < 0,05$), АДА/СОД ($r = 0,84$, $p < 0,001$), СОД/NOx ($r = 0,80$, $p < 0,001$) и обратные связи между АДА/ГПО ($r = -0,81$, $p < 0,001$), СОД/ГПО ($r = -0,94$, $p < 0,001$), ГПО/NOx ($r = -0,80$, $p < 0,001$). Следовательно, в опухолевой ткани больных РЖ от возраста зависят соотношения между: АДА/КО, КО/NOx, КО/СОД, КО/ГПО – со средней степенью взаимосвязи и проявляются они лишь у онкобольных более молодого возраста (40-59 лет). Установленные взаимосвязи в опухолевой ткани больных РЖ между АДА/NOx, АДА/СОД, АДА/ГПО, СОД/ГПО, СОД/NOx, ГПО/NOx, от возраста не зависят, однако в группе более пожилых больных коэффициент корреляции между этими показателями оказался намного выше.

Вывод. Таким образом, у больных РЖ в гомогенате тканей при старении происходит снижение глутатионового звена ферментативной защиты клетки, на фоне усиления пуринового обмена и повышения не ферментативных показателей ПОС, при чем в опухолевой ткани эти изменения носят более выраженный характер по сравнению с неизменной тканью. Установлено, что активности КО и СОД в гомогенате тканей (неизменной и опухолевой) при РЖ от возраста не зависят, а значит, могут выступать в качестве биохимических констант. Обнаружены специфические особенности влияния одних показателей на другие в зависимости от возраста, при этом установленные соотношения в тканях больных РЖ между АДА/СОД, АДА/ГПО, СОД/ГПО, СОД/NOx, ГПО/NOx максимально тесно связаны между собой, что более выражено в опухолевых тканях онкобольных пожилого возраста. Следовательно нами обнаружено системное влияние возраста на активность ферментативных и уровень не ферментативных показателей ПОС и АОС, а так же на характер их взаимосвязи между собой в нетрансформированных и опухолевых тканях.

Список литературы / References:

1. Иванилов А.К. Заболеваемость злокачественными новообразованиями в мире, РФ и отдельных её регионах (обзор литературы). *Молодой ученый*, 2014, т. 2, с. 337-339. [Ivanilov A.K. The literature review of the state of disease in the world, Russia and its regions over the last decade malignancies. *Young scientist*, 2014, vol. 2, pp. 337-339. (In Russ.)]
2. Надеев А.П., Чернова Т.Г., Матина С.Т., Матин И.А., Козьяев М.А. Структура онкологической заболеваемости по данным исследований гастробиопсий. *Медицина и образование в Сибири*, 2014, № 3. [Nadeev A.P., Chernova T.G., Matina S.T., Matin I.A., Kozyaev M.A. The structure of cancer incidence according to research gastric biopsy. *Medicine and Education in Siberia*, 2014, no. 3, (In Russ.)]
3. *Злокачественные новообразования в России в 2013 году (Заболеваемость и смертность)*. Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена. Филиал ФГБУ «ФМИЦ им. П.А. Герцена» Минздрава России, 2015, 250 с. [Caprin A.D., Starinskaya V.V., Petrova G.V. (editors). *Malignancies*

in Russia in 2013 (morbidity and mortality). Moscow: P. Herzen Moscow Oncology Research Institute; Russian Ministry of Health, 2015, 250 p. (In Russ.)]

4. Зуйков С.А., Шатова О.П., Хомутов Е.В., Каплун Д.С. Исследование метаболизма пуриновых нуклеотидов, прооксидантной и антиоксидантной систем у больных раком желудка. *Евразийский Союз Ученых (ЕСУ)*, 2015, т. 8, № 17, ч. 3, с. 143-146. [Zuikov S.A., Shatova O.P., Khomutov E.V., Kaplyn D.S. Study of metabolism of purine nucleotides, prooxidant and antioxidant system in patients with gastric cancer. *Eurasian Scientific Union (ESU)*, 2015, vol. 8, no. 17, iss. 3, pp. 143-146. (In Russ.)]

5. Анисимов В.Н. Молекулярные и физиологические механизмы старения: В 2 т. Т. 1. 2-е изд., перераб. и доп., СПб.: Наука, 2008, 481 с. [Anisimov V. N. Molecular and Physiological Mechanisms of Aging, vol 2, 2nd ed. St. Petersburg: Publishing house Nauka, 2008, vol. 1, 481 p. (In Russ.)]

6. Fransen M., Nordgren M., Wang B., Apanasets O., Van Veldhoven P.P. Aging, age-related diseases and peroxisomes. *Subcell. Biochem*, 2013, vol. 69, pp. 45-65.

7. 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, no. 6, pp. 385-388.

8. Totzeck M., Hendgen-Cotta U.B., Kelm M., Rassaf T. Crosstalk between Nitrite, Myoglobin and Reactive Oxygen Species to Regulate Vasodilation under Hypoxia. *PLoS ONE.*, 2014, vol. 9, no. 8, p. e105951.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АННИГИЛЯЦИОННОЙ ЗАМЕДЛЕННОЙ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ЗОНДА ДЛЯ ОЦЕНКИ СОДЕРЖАНИЯ КИСЛОРОДА В ОПУХОЛЯХ

Ишемгулов А.Т., Летута С.Н., Муханова А.Ф., Пашкевич С.Н., Сокабаева С.С.

Оренбургский государственный университет

пр. Победы, 13, г. Оренбург, 460018, РФ

e-mail: azamat.ischemgulov@yandex.ru, letuta@com.osu.ru

Аннотация. В работе представлены результаты измерения кинетики длительной люминесценции эритрозина в опухолях и здоровых тканях молочной железы лабораторных мышей. Обнаружен эффект тушения замедленной флуоресценции в режиме строб-периодического возбуждения люминесценции, зависимый от частоты следования лазерных импульсов. Установлена связь описанного эффекта с уменьшением вклада в свечение реакций кросс-аннигиляции триплет-возбуждённого люминофора и синглетного кислорода. Проанализировано влияние тушения замедленной флуоресценции на интенсивность фосфоресценции зонда. Показано, что с помощью описанного явления можно оценить расходование тканевого кислорода в ходе фотодинамических процессов.

Ключевые слова: замедленная флуоресценция, биологические ткани, синглет-триплетная аннигиляция, синглетный кислород

ANNIHILATION DELAYED FLUORESCENCE OF PROBES AS A TUMOR OXYGEN LEVEL INDICATOR

Ishemgulov A.T., Letuta S.N., Mukhanova A.F., Pashkevich S.N., Sokabaeva S.S.

Orenburg State University

Pobedy av., 13, Orenburg, 460018, Russia

e-mail: azamat.ischemgulov@yandex.ru, letuta@com.osu.ru

Abstract. The decay kinetics of erythrosine delayed luminescence in malignant and healthy biological tissues of laboratory mice was investigated. Upon periodical pulse excitation of luminescence an effect of delayed fluorescence suppression was discovered. The glow quenching value is dependent on the laser pulses repetition period. It is shown that the effect is associated with the decrease in the contribution of luminescence via photogenic annihilation reaction of triplet sensitizer and singlet oxygen excited states. In addition, the oxygen-dependent fluorescence decay affecting to the phosphorescence intensity is discussed. The obtained data suggest that it is possible to evaluate intensive oxygen consumption into a tissue using annihilation delayed fluorescence.

Key words: delayed fluorescence, biological tissues, singlet-triplet annihilation, singlet oxygen

В основе фотодинамического эффекта лежит реакция переноса энергии с триплет-возбуждённой молекулы сенсibilизатора на кислород:



где T_1 – молекула сенсibilизатора в триплетном возбуждённом состоянии; S_0 , S_1 – в основном и первом возбуждённом синглетных состояниях, ${}^3\Sigma_g(O_2)$ – кислород в основном состоянии, ${}^1\Delta_g(O_2)$ – синглетный кислород (СК). Молекула кислорода при этом переходит в синглетное возбуждённое состояние и в определенных условиях может вступить в реакцию с непотушенными возбуждёнными состояниями люминофора, инициируя при этом синглет-триплет-аннигиляционную (СТА) замедленную флуоресценцию (ЗФ) [1, 2]: