

УДК: 546.172.6:616.33-006-018.2

ИРИНА МИХАЙЛОВНА ВАСИЛЬЕВА¹, НИКОЛАЙ ВИЛЛЕНОВИЧ КРАСНОСЕЛЬСКИЙ²,
ЮРИЙ АЛЕКСЕЕВИЧ ВИННИК³, ВИКТОР ИВАНОВИЧ ЖУКОВ¹,
АННА ВАЛЕРИЕВНА ПОЛИКАРПОВА¹

¹ Харьковский национальный медицинский университет

² ГУ «Институт медицинской радиологии им. С. П. Григорьева НАМН Украины», Харьков

³ Харьковская медицинская академия последипломного образования

СОСТОЯНИЕ NO-СИНТАЗНОЙ ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ И СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ У БОЛЬНЫХ ГАСТРОКАНЦЕРОГЕНЕЗОМ

Цель работы. Изучение состояния NO-синтазной окислительной системы и структурно-метаболического состояния соединительной ткани у больных гастроканцерогенезом.

Материалы и методы. Клинически обследованы 44 пациента с аденокарциномой желудка в возрасте 43–68 лет. Программа исследования предусматривала изучение состояния NO-синтазной окислительной системы и соединительной ткани у больных раком желудка. В сыворотке крови как больных, так и здоровых пациентов определялось содержание продуктов окисления оксида азота — нитритов, нитратов, S-нитрозотиола и активность эндотелиальной и индуцибельной NO-синтазы. Для оценки состояния соединительной ткани в плазме крови определялось содержание гликозаминогликанов, активность ферментов эластазы и коллагенолитическая активность сыворотки крови.

Результаты. Изучение активности NO-синтазной окислительной системы выявило у больных повышение содержания в сыворотке крови нитритов, нитратов, S-нитрозотиолов и активности эндотелиальной и индуцибельной NO-синтазы. Изучение состояния соединительной ткани у больных гастроканцерогенезом обнаружило повышение активности в сыворотке крови эластазы, коллагенолитической активности, что свидетельствует о структурно-метаболических нарушениях в соединительной ткани.

Выводы. Анализ полученных результатов подтверждает, что канцерогенез сопровождается увеличением количества активных форм кислорода, которые в клетке способны трансформировать эффекты NO из защитных в цитотоксические. Результаты исследования показали, что гастроканцерогенез сопровождается глубокими нарушениями метаболического обмена соединительной ткани, сопряженными с активацией протеиназ и накоплением в сыворотке крови гликозаминогликанов.

Ключевые слова: гастроканцерогенез, NO-синтаза, эластаза, гликозаминогликаны.

Биологическое окисление и кооперативное взаимодействие окислительных и восстановительных процессов как важнейшего компонента гомеостаза при многочисленных заболеваниях и патологических состояниях нарушается и представляет собой актуальную медико-биологическую проблему. Все более проявляется роль кислорода как более универсального яда, разрушающего все классы органических соединений и биологических структур, с одной стороны, и источника энергии в живых системах, своего рода «мотора жизненной машины» — с другой [1, 2]. Структурно-метаболические процессы протекающие в аэробных условиях организма, сопряжены с образованием небольших концентраций целого ряда активных интермедиатов кислорода, таких как супероксидный анион-радикал ($O_2^{\cdot-}$), гидроксильный ($^{\cdot}OH$), алкоксильный (RO^{\cdot}), пероксидный (ROO^{\cdot}) радикалы,

перекись водорода (H_2O_2), синглетный кислород ($^{\cdot}O_2$), гипохлорная кислота ($HOCl$), окись азота ($^{\cdot}NO$), пероксинитрит ($ONOO^{\cdot}$) [1, 2]. Все эти реакционноспособные активные формы кислорода (АФК) обладают широким спектром действия. С одной стороны, некоторые из них принимают участие в процессах сигнальной транскрипции и в регуляции ряда важных функций организма, с другой стороны, в силу своей высокой химической активности АФК обладают ярко выраженным гено- и цитотоксическим действием и вследствие этого, представляют серьезную опасность для организма. Чтобы предотвратить повреждающее действие АФК и поддержать клеточный гомеостаз в аэробных организмах, эволюционно выработалась система антиоксидантной защиты, включающая в себя мембраносвязанные и цитозольные ферменты — каталазу, супероксиддисмутазу (СОД), глутатионпероксидазу (ГП) и целый ряд низкомолекулярных антиоксидантов (АО) — витамины А, Е, С, глутатион,

© И. М. Васильева, Н. В. Красносельский, Ю. А. Винник,
В. И. Жуков, А. В. Поликарпова, 2015

цистеин, селен и др. Антиоксидантная система защиты организма обеспечивает нейтрализацию клетками АФК и поддержание клеточного гомеостаза, то есть выполняет наиболее важное условие нормальной физиологической деятельности и выживания организма. Имеются данные о наличии кооперативного взаимодействия антиоксидантной системы с системой ферментов метаболизма и детоксикации ксенобиотиков. Вместе с тем, под действием различных эндогенных и экзогенных факторов, баланс между антиоксидантной системой и АФК в клетках может нарушаться либо вследствие снижения уровня антиоксидантов, либо вследствие гиперпродукции АФК. Такое состояние резко нарушенного окислительно-восстановительного статуса клеток, когда АФК не могут адекватно блокироваться антиоксидантной системой, получило название окислительного стресса [1, 2]. При этом некоторые АФК, обладая исключительно высокой химической активностью, могут неспецифически атаковать любые молекулы, находящиеся в радиусе их чрезвычайно короткого диффузионного пробега, и вызывать окислительную модификацию нуклеиновых кислот, белков, углеводов, индуцировать перекисное окисление липидов (ПОЛ) в мембранах, увеличивать внутриклеточный уровень кальция, активировать протеазы, нуклеазы, фосфорилазы. В целом эти нарушения приводят либо к гибели клеток, либо к их трансформации, включая злокачественную, и к развитию патологических процессов. Оксидативный стресс среди других видов стресса наиболее распространен и опасен и, вероятно, является своего рода «платой» аэробных организмов за существование в кислородсодержащей атмосфере. Следует отметить, что некоторые типы клеток, осуществляющих в организме функции иммунного надзора (макрофаги, нейтрофилы), используют АФК и оксидативный стресс в борьбе с патогенами (бактерии, вирусы, раковые клетки и др.), предотвращая таким образом развитие заболеваний и патологических состояний.

Целью работы было изучение состояния NO-синтазной окислительной системы и структурно метаболического состояния соединительной ткани у больных гастроканцерогенезом.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Клинически обследованы 44 больных аденокарциномой желудка в возрасте от 43 до 68 лет, которые находились на лечении в областном онкологическом центре г. Харькова. Клиническими, лабораторно-инструментальными и гистоморфологическими методами у 14 пациентов (6 женщин, 8 мужчин) диагностирована вторая, у 17 пациентов (8 женщин, 9 мужчин) третья и у 13 (6 женщин, 7 мужчин) — четвертая стадия гастроканцерогенеза. Группа сравнения была представлена условно-здоровыми пациентами, не имеющими онкологической патологии в возрасте от 40 до 65 лет (6 женщин, 9 мужчин). Все исследования проводились в первые сутки после госпитализации больных, до патогенетической терапии. Программа исследования предусматривала изучение

состояния NO-синтазной окислительной системы и соединительной ткани у больных раком желудка (РЖ). В сыворотке крови как больных, так и здоровых пациентов определялось содержание продуктов окисления оксида азота — нитритов (NO_2), нитратов (NO_3), S-нитрозотиола и активность эндотелиальной (eNOS) и индуцибельной (iNOS) NO-синтазы в соответствии с методическими рекомендациями «Диагностика эндотелиальной функции — оценка вазоактивного пула оксиду азоту» (МОЗ України, Київ. 2007. — 20 с.). Для оценки состояния соединительной ткани в плазме крови определялось содержание гликозаминогликанов (ГАГ), активность ферментов эластазы и коллагенолитическая активность (КЛА) сыворотки крови, которые способны дать ценную информацию о состоянии структурно-метаболических и обменных процессов в данной ткани при онкопатологии желудка. Источником КЛА могут быть ферменты протеазы, коллагеназы органов пищеварения и форменных элементов крови [3, 4]. Было показано, что коллагеназа играет пусковую роль в ферментативном расщеплении коллагена. Оценивалась КЛА плазмы крови по суммарному количеству (при ферментативном гидролизе) свободного и пептидно-связанного оксипролина в диагностируемой пробе. Для этого находили по калибровочной кривой соответствующие оптической плотности значения количества оксипролина при длине волны $\lambda = 570$ мкм. Величину КЛА сыворотки крови выражали в микромолях оксипролина на 1 л плазмы крови за 1 час (мкмоль/(л · ч)) [4]. Суммарные гликозаминогликаны (кислые мукополисахариды) определяли в сыворотке крови с использованием трихлоруксусной кислоты и известной карбазольной реакции, которая обеспечивает фиолетово-розовое окрашивание. Фотометрирование исследуемых проб осуществлялось при длине волны $\lambda = 530$ нм. Содержание ГАГ выражали через гексуроновые кислоты в мкмоль/л [5]. Эластаза в сыворотке крови исследовалась иммуноферментным методом с использованием моноклональных антител и тест-системы (Human PMN Elastase Elisa RD 191021100) по прилагаемой инструкции фирмы «Biovendor», Германия.

Статистическая обработка результатов исследования проводилась с использованием t-критерия Стьюдента–Фишера.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение активности NO-синтазной окислительной системы выявило повышение содержания в сыворотке крови нитритов, нитратов, S-нитрозотиолов и активности эндотелиальной и индуцибельной NO-синтазы (табл. 1). Так, нитриты повышались на 52,47, 64,71 и 98,62 %; нитраты — на 91,57, 148,70 и 189,21 %; S-нитрозотиолы — на 92,85, 160,71 и 242,85 %; эндотелиальная NOS — на 19,44, 30,55 и 77,77 %; индуцибельная NOS — на 51,11, 95,55 и 160,0 % относительно при II, III и IV стадиях развития рака желудка. Согласно современным представлениям, газобразный химический медиатор NO играет универсальную роль модулятора физиологических функций

Таблица 1

Активность NO-синтазной окислительной системы у больных гастроканцерогенезом

| Показатель | Группа наблюдения, М ± m, стадия рака | | | |
|-----------------------------|---------------------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|
| | условно-здоровые (n = 15) | II стадия (n = 14) | III стадия (n = 17) | IV стадия (n = 13) |
| NO ₂ (мкмоль/л) | 17,4 ± 1,38 | 26,53 ± 1,47* | 28,66 ± 2,10* | 34,56 ± 2,73* |
| NO ₃ (мкмоль/л) | 21,6 ± 2,23 | 41,38 ± 2,65* | 53,72 ± 3,46* | 62,47 ± 4,25* |
| S-нитрозотиол (ммоль/л) | 0,28 ± 0,05 | 0,54 ± 0,06* | 0,73 ± 0,07* | 0,96 ± 0,08* |
| эNOS (пмоль/мин · мг белка) | 0,72 ± 0,08 | 0,86 ± 0,08 | 0,94 ± 0,07* | 1,28 ± 0,09* |
| иNOS (пмоль/мин · мг белка) | 0,45 ± 0,04 | 0,68 ± 0,05* | 0,88 ± 0,07* | 1,17 ± 0,08* |

Примечание: * — различия достоверны, $p < 0,05$.

сердечно-сосудистой, нервной, иммунной, мышечной, дыхательной, пищеварительной и других систем организма. Этот мессенджер вовлечен во множество патологических процессов: он выступает как патогенетический, регуляторный и медиаторный фактор формирования нарушений гомеостатической функции организма, как аутокринная сигнальная молекула.

Оксид азота участвует в проведении сигнала от мембранных рецепторов к молекулам внутриклеточных структур, в том числе, и по гуанилатциклазному пути; как паракринный эффектор, NO вносит вклад в согласованную работу близлежащих клеток, участвуя в образовании молекулярных систем межклеточной сигнализации [6, 7]. Вместе с тем, оксид азота — потенциально токсичная молекула, которая широко представлена при гипертензии, сахарном диабете, новообразованиях, нейродегенеративных процессах, атеросклерозе, циррозе печени, заболеваниях почек и других патологических состояниях организма. Эта молекула может быть чувствительной как для клеток, включая раковые, так и для внутриклеточных патогенных микроорганизмов. Установлено, что цитотоксичность NO является результатом образования большого количества этих молекул, которые обеспечивают инициацию апоптоза. Результаты исследования свидетельствуют, что при гастроканцерогенезе отмечается значительное накопление оксида азота и его метаболитов обмена — нитритов, нитратов, S-нитрозотиилов, которые сопряжены с накоплением возможно и других активных форм кислорода. Установлено, что оксид азота действует как важный регулятор таких общих клеточных процессов, как экспрессия генов и функциональная активность митохондрий. Известно, что в организме NO синтезируется из аминокислоты L-аргинина. Этот процесс представляет собой комплексную окислительную систему, катализируемую ферментом NOS.

Исследования показали существенное увеличение активности эндотелиальной и индуцибельной NO-синтазы, что свидетельствует о повышении количества оксида азота, который быстро взаимодействует с молекулярным кислородом, супероксидным анион-радикалом и металлами гемсодержащих и негемовых белков. Непосредственно с SH-группами белков взаимодействует NO⁺, который образуется из NO[°] после восстановления или взаимодействия с металлами. В результате в клетке при достаточном количестве тиолов под влиянием NO происходит нитрозилирование

и изменение активности металлосодержащих белков, а также белков, имеющих активные цистеиновые центры. Регуляция активности белков нитрозилированием — один из способов контроля функции белков в клетке. В случае образования больших количеств NO последний под действием NOS может реагировать с супероксидным анионом, образуя другую активную форму кислорода — пероксинитрит (ONOO[°]), который способен вступать в реакцию восстановления с глутатионом и углекислым газом. При этом образуется нитрозопероксикарбонат (ONO₂CO₂[°]), который может вызывать химическую модификацию реактивных остатков тирозина в белках, что сопровождается изменением их активности. Кроме этого, токсичный пероксинитрит способен неинзиматически продуцировать высокие реакционноспособные гидроксильные радикалы (OH[°]), включая, таким образом, NO в образование новых активных форм кислорода, которые способны окислять белки, липиды, разрушать структуру биологических мембран [6]. В основе широкого разнообразия NO-эффектов в клетке лежат изменения редокс-формы молекулы NO, а также дополнительные реакции с металлами, тиолами и остатками тирозина в составе белков. Анализ полученных результатов свидетельствует, что канцерогенез сопровождается увеличением количества активных форм кислорода, которые в клетке способны трансформировать эффекты NO из защитных в цитотоксические. Последние могут возникать не только при индукции NOS эндотоксинами, но и при истощении в клетке резерва тиолов, увеличении концентрации АФК, что приводит к уменьшению скорости нитрозилирования белков.

Изучение состояния соединительной ткани у больных гастроканцерогенезом обнаружило повышение активности в сыворотке крови эластазы, коллагенолитической ее активности, что свидетельствует о структурно-метаболических нарушениях в соединительной ткани. Важно отметить, что от состояния соединительной ткани в организме зависит возможность развития злокачественных опухолей костной ткани, легких, молочной железы, простаты, желудочно-кишечного тракта и др. [7]. По мнению многих авторов, рак не может развиваться в организме, в котором система соединительной ткани сохранила свою реактивность, при этом формирование и рост опухолевого процесса происходит всегда на фоне ее угнетения [6, 7]. Так, исследования показали увеличение в сыворотке крови содержания гликозаминогликанов

Состояние соединительной ткани у больных гастроканцерогенезом

| Показатель | Группа наблюдения, М ± m, стадия рака | | | |
|--|---------------------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|
| | условно-здоровые (n = 15) | II стадия (n = 14) | III стадия (n = 17) | IV стадия (n = 13) |
| Эластаза (пг/мл) | 26,18 ± 1,43 | 69,44 ± 3,15* | 164,33 ± 6,47* | 243,65 ± 8,27* |
| Гликозаминогликаны (мкмоль/л) | 36,84 ± 2,35 | 47,32 ± 2,68* | 84,37 ± 4,25* | 108,65 ± 5,24* |
| Коллагенолитическая активность (мкмоль оксипролина/(л · час)) | 7,45 ± 0,63 | 18,24 ± 1,36* | 33,42 ± 2,64* | 68,93 ± 4,66* |

Примечание: * — различия достоверные, $p < 0,05$.

на 28,44, 129,01 и 194,92 %, а также активности эластазы на 165,24, 527,69 и 796,29 %, коллагенолитической активности на 144,83, 348,59 и 825,23 %, соответственно при II, III и IV стадиях развития гастроканцерогенеза (табл. 2). Наиболее высокие уровни активности протеиназ отмечались у больных РЖ при IV стадии развития опухолевого процесса и были сопряжены с накоплением значительных концентраций в сыворотке крови гликозаминогликанов.

ВЫВОДЫ

Таким образом, результаты исследования свидетельствуют, что гастроканцерогенез сопровождается глубокими нарушениями метаболического обмена соединительной ткани, которые сопряжены с активацией

протеиназ и накоплением в сыворотке крови гликозаминогликанов. Высокая корреляционная связь между динамикой активности эластазы и коллагенолитической активностью сыворотки крови при II, III и IV стадиях опухолевого процесса позволяет использовать эти показатели в качестве прогностически значимых в динамике и мониторинге проводимой патогенетической терапии. Анализ содержания оксида азота и активности NO-синтазной окислительной системы обнаружил прямую связь между деструктивными процессами в соединительной ткани и уровнем активации NO-синтазной окислительной системы в условиях развития гастроканцерогенеза, что имеет патогенетическое значение в трансформации онкогенеза и проводимой патогенетической терапии.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Winslow R. M. Oxygen: the poison is in the dose / R. M. Winslow // *Transfusion*. — 2013. — Vol. 53, N 2. — P. 424–437.
2. Bitterman H. Bench-to bedside review: Oxygen as a drug / H. Bitterman // *Critical Care*. — 2009. — Vol. 13, N 1. — P. 205.
3. *Self-Etching Adhesives Increase Collagenolytic Activity in Radicular Dentin* / F.R. Tay, D.H. Pashley, R.J. Loushine [et al.] // *J. Endod.* — 2006. — Vol. 32, N 9. — P. 862–868.
4. *Relaxin Enhances the Collagenolytic Activity and In Vitro Invasiveness by Upregulating Matrix Metalloproteinases in Human Thyroid Carcinoma Cells* / J. Bialek, U. Kunanuvat, S. Hombach-Klonisch [et al.] // *Mol. Cancer res.* — 2011. — Vol. 9. — P. 673.
5. *Метод определения гликозаминогликанов в биологических жидкостях* / П. Н. Шараев, В. Н. Пишков, Н. И. Соловьева [и др.] // *Лаб. дело*. — 1987. — №5. — С. 330–332.
6. *Nitric oxide-mediated regulation of connexin43 expression and gap junctional intercellular communication in mesangial cells.* / N. Hiramatsu, Y. Zhu, T. Morioka [et al.] // *J. Am. Soc. Nephrol.* — 2005. — Vol. 16, N 1. — P. 58–67.
7. *Melino G. Nitric oxide: NO apoptosis or turning it ON?* / G. Melino, B. Brüne // *Cell Death and Differentiation*. — 2003. — Vol. 10. — P. 864–869.

Статья поступила в редакцию 11.03.2015.

I. M. ВАСИЛЬЄВА¹, М. В. КРАСНОСЕЛЬСЬКИЙ², Ю. О. ВІННИК³, В. І. ЖУКОВ¹, Г. В. ПОЛІКАРПОВА¹

¹ Харківський національний медичний університет

² ДУ «Інститут медичної радіології ім. С. П. Григор'єва НАМН України», Харків

³ Харківська медична академія післядипломної освіти

СТАН NO-СИНТАЗНОЇ ОКИСНОЇ СИСТЕМИ ТА СПОЛУЧНОЇ ТКАНИНИ У ХВОРИХ НА ГАСТРОКАНЦЕРОГЕНЕЗ

Мета роботи. Вивчення стану NO-синтазної окисної системи і структурно-метаболического стану сполучної тканини у хворих на гастроканцерогенез.

Матеріали та методи. Клінічно обстежено 44 хворих на аденокарциному шлунка віком 43–68 років. Програма дослідження передбачала вивчення стану NO-синтазної окисної системи та сполучної тканини у хворих на рак шлунка. У сироватці крові як хворих, так і здорових пацієнтів визначали вміст продуктів окиснення оксиду азоту — нітритів, нітратів, S-нітрозотіолу і активність ендотеліальної та індукційної NO-синтази. Для оцінки стану сполучної тканини у плазмі крові визначали вміст глікозаминогликанів, активність ферментів еластази і колагенолітичну активність сироватки крові.

Результати. Вивчення активності NO-синтазної окисної системи виявило підвищення вмісту в сироватці крові нітритів, нітратів, S-нітрозотіолів та активності ендотеліальної та індукційної NO-синтази.

Вивчення стану сполучної тканини у хворих на гастроканцерогенез виявило підвищення активності в сироватці крові еластази, колагенолітичної активності, що свідчить про структурно-метаболичні порушення у сполучній тканині.

Висновки. Аналіз отриманих результатів свідчить, що канцерогенез супроводжується зростанням кількості активних форм кисню, які в клітині здатні трансформувати ефекти NO із захисних у цитотоксичні. Гастроканцерогенез супроводжується глибокими порушеннями метаболічного обміну сполучної тканини, які пов'язані з активацією протеїназ і накопиченням у сироватці крові глікозаміногліканів.

Ключові слова: гастроканцерогенез, NO-синтаза, еластаза, глікозаміноглікани.

I. M. VASYLYEVA¹, N. V. KRASNOSELSKEY², YU. A. VYNNIK³, V. I. ZHUKOV¹, A. V. POLIKARPOVA¹

¹ *Kharkiv National Medical University*

² *SI «Institute of Medical Radiology named after S. P. Grigoriev of Academy of the Medical Sciences of Ukraine», Kharkiv*

³ *Kharkiv Medical Academy of Postgraduate Education*

STATE OF OXIDIZING NO SYNTHASE SYSTEM AND CONNECTIVE TISSUE IN PATIENTS WITH GASTROCANCEROGENESIS

Purpose. A study of the NO synthase oxidative system and structural metabolic connective tissue state in patients with gastrocancerogenesis.

Materials and methods. 44 patients with gastric adenocarcinoma aged 43 to 68 years are subjected to clinical examination in the paper. The research program includes the investigation of the state of NO synthase oxidizing system and connective tissue in patients with gastric cancer. In the serum of patients as well as healthy subjects the content of the oxidation products of nitric oxide — nitrites, nitrates, S-nitrosothiols and activity of endothelial and inducible NO synthase were determined. To assess the state of the connective tissue in blood plasma was measured the glycosaminoglycans, enzymes elastase activity content and collagenolytic activity of serum.

Results. The study of NO synthase oxidative system activity revealed elevated levels of serum nitrite, nitrate, S-nitrosothiols and activity of endothelial and inducible NO synthase. The examination of connective tissue state in patients with gastrocancerogenesis showed the increased activity of serum elastase and its collagenolytic activity, to indicate the structural and metabolic abnormalities in the connective tissue.

Conclusions. Analysis of the results indicates that cancerogenesis is accompanied with increased amounts of reactive oxygen species (ROS), th be able to transform the NO protective effects into cytotoxic within the cell. The findings suggest that gastrocancerogenesis I connected with profound metabolic disorders of connective tissue metabolism associated with the activation of proteases and accumulation of glycosaminoglycans in the serum.

Keywords: gastrocancerogenesis, NO-synthase, elastase, glycosaminoglycans.

Контактная информация:

Жуков Виктор Иванович

д. биол. н., д. мед. н., профессор, заведующий кафедрой биохимии ХНМУ

пр. Ленина, 4, г. Харьков, 61022, Украина

тел.: +38 (057) 707-73-71