

Министерство здравоохранения Донецкой Народной Республики
Государственная образовательная организация высшего
профессионального образования
«Донецкий национальный медицинский университет имени М. Горького»

На правах рукописи

Бакурова Елена Михайловна

**АКТИВНОСТЬ МЕТАЛЛОФЕРМЕНТОВ В КЛЕТКАХ КРОВИ И
ТКАНЯХ КАРЦИНОМ РАЗЛИЧНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ**

3.3.3. Патологическая физиология

Диссертация

на соискание ученой степени доктора медицинских наук

Научные консультанты –
доктор биологических наук, профессор
Борзенко Берта Георгиевна;
доктор медицинских наук, доцент
Пацкань Игорь Иванович

Экземпляр диссертации идентичен
по содержанию с другими экземплярами.
которые были представлены в диссертационный совет

Ученый секретарь диссертационного
совета Д 01.022.05
Кравченко А. И.

Донецк – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
РАЗДЕЛ 1 ФОРМИРОВАНИЕ АГРЕССИВНОГО ФЕНОТИПА	
КАРЦИНОМЫ. СОВРЕМЕННЫЕ АСПЕКТЫ (Обзор литературы).....	15
1.1 Современные представления о молекулярных механизмах, реализующих формирование агрессивных свойств опухоли.....	15
1.2 Морфо-биологические особенности эпителиально-мезенхимального перехода, реализуемого опухолью	19
1.3 Свойства и функции белка TP/PD-ECGF – фермента и фактора ангиогенеза в норме и при неопластической патологии	26
1.4 Активность металлоферментов катаболизма аденозина лимитирует его регуляторные эффекты	37
1.5 Некоторые особенности протекания прооксидантных процессов при опухолевом росте, роль металлов переменной валентности	49
1.6 Безъядерные клетки крови и процессы свободно-радикального окисления	62
РАЗДЕЛ 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	67
2.1 Общая характеристика больных и принципы формирования групп для исследований	67
2.2 Подготовка биоматериала к исследованиям	69
2.3 Патоморфологические и иммуногистохимические методы исследования ..	70
2.4 Биохимические методы исследования	72
2.5 Методы статистической обработки полученных результатов	97
РАЗДЕЛ 3 ОСОБЕННОСТИ АКТИВНОСТИ МЕТАЛЛОФЕРМЕНТОВ	
ОБМЕНА НУКЛЕОЗИДОВ В КАРЦИНОМАХ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО	
РАКА ЛЕГКИХ, АДЕНОКАРЦИНОМАХ ЖЕЛУДКА И КИШЕЧНИКА	99
3.1 Особенности активности тимидинфосфорилазы и аденозиндезаминазы в тканях карцином различных локализаций	99

3.2 Особенности активности тимидинфосфорилазы, аденозиндезаминазы в плазме крови при раке различных локализаций	114
РАЗДЕЛ 4 ОСОБЕННОСТИ ПРОЦЕССОВ СВОБОДНО-РАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ	125
РАЗДЕЛ 5 О ВЗАИМОСВЯЗИ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ ОПУХОЛИ С ЕЁ ПАТОМОРФОЛОГИЕЙ	147
РАЗДЕЛ 6 ОСОБЕННОСТИ МЕТАБОЛИЗМА ЭРИРОЦИТОВ У ПАЦИЕНТОВ С НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ ЛЕГКИХ, АДЕНОКАРЦИНОМАМИ ЖЕЛУДКА И КИШЕЧНИКА	159
6.1 Особенности обмена эритроцитов при раке до развития анемии	159
6.2 Особенности обмена эритроцитов при раке на фоне развития анемии	175
РАЗДЕЛ 7 ОСОБЕННОСТИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ МЕТАЛЛОВ ПЕРЕМЕННОЙ ВАЛЕНТНОСТИ В КЛЕТКАХ КРОВИ И ТКАНЯХ КАРЦИНОМ	191
РАЗДЕЛ 8 АНАЛИЗ И ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ..	214
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	242
ВЫВОДЫ	247
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	250
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	251
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	254

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

В мировой практике в структуре опухолевой патологии доминируют эпителиальные опухоли (карциномы) различных локализаций [160]. Среди причин онкологической смертности, как и прежде, первое место занимает рак легких, второе – рак желудка [300]. Низкая эффективность комбинированного лечения может быть обусловлена формированием индивидуальных агрессивных свойств опухоли, ведущих к химио-, иммуно-, радиорезистентности [205].

При этом наблюдается усиление ангиогенеза, угнетение апоптоза, формируется способность мигрировать, меняется пролиферативная активность клеток. В реализации этих программ роль сигнальных молекул могут играть активные формы кислорода (АФК), некоторые тканевые метаболиты, например, 2-дезоксид-Д-рибоза, аденозин [96, 192, 283, 317, 339]. Ферменты их обмена, такие как супероксиддисмутаза, тимидинфосфорилаза, аденозиндезаминаза, ксантиноксидаза, играют важную роль в развитии агрессивных свойств опухоли [241, 296, 319]. Поскольку они являются металлоферментами, то сами могут подвергаться модифицирующему воздействию АФК [13, 284]. Основными механизмами воздействия АФК считают взаимодействие с металлосодержащими белками или окисление их SH-групп [13, 59, 101]. Следовательно, изменения метаболизма опухоли сопряжены с формированием её агрессивного фенотипа. При этом карцинома реализует эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП).

Считают, что пероксид водорода (H_2O_2) способен запускать несколько ключевых для развития ЭМП онкогенных путей, в том числе стимулирующих ангиогенез, клеточную миграцию [102]. Именно за счет продукции H_2O_2 металлофермент супероксиддисмутазу (СОД) считают вовлеченной в развитие ЭМП [295]. Значительную роль в предотвращении стимулов пероксида водорода играют ферменты, разрушающие его, в частности, глутатионпероксидаза (ГПО) [19, 266, 276].

Формирование H_2O_2 может стимулировать 2-дезоксид-Д-рибоза (2-д-Д-Риб) [192]. Интересно, что они могут активировать общие факторы транскрипции, отвечающие за устойчивость клетки к апоптозу, запускающие процессы ангиогенеза [319]. Повышение уровней H_2O_2 наблюдали в клетках, интенсивно экспрессирующих тимидинфосфорилазу (ТФ) [317, 322]. Этот продуцирующий фосфорилированную 2-д-Д-Риб фермент считают показателем опухолевой агрессии, плохого прогноза [320]. ТФ также участвует в опухолевом метаболизме фторпиримидинов – препаратов, являющихся базовыми во многих схемах химиотерапии карцином различных локализаций [188, 301, 312 - 314].

Несмотря на вклад ряда металлоферментов в развитие агрессивных свойств карцином, особенности метаболизма при этом изучены мало. Исследование биохимических особенностей патогенеза ЭМП является актуальной проблемой.

Степень разработанности темы

Традиционно при изучении особенностей канцерогенеза отдают предпочтение одному из методов, например, биохимическому или морфологическому, или генетическому. Так, хорошо изучены взаимосвязи процессов пролиферации с особенностями активности ферментов запасного пути синтеза пиримидинов. Проф. Борзенко Б. Г. показана информативность исследования сывороточной активности маркера пролиферации – тимидинкиназы (ТК) и ТФ для индивидуального мониторинга. Систематизированы многочисленные эффекты ТФ. Этот содержащий кобальт фермент *in vivo* реализует деградацию дезокситимидина до тимина и 2-дезоксид-Д-рибозо-1-фосфата (обозначим условно как катаболическая, ТФк). ТФ, являясь полифункциональным белком [157], кроме антиапоптозных и ангиогенных стимулов (она тромбоцитарный фактор роста эндотелиоцитов, PD-ECGF), реализует пропролиферативные свойства. За счет трансферазной активности (условно – анаболической, ТФан) поставляет субстрат маркеру пролиферации [146]. Однако данный вид активности ТФ практически не исследуется. Также, формирование дезоксинуклеотидов, необходимых для репликации, может

регулировать аденозин, поэтому актуально исследование активности ключевого фермента его обмена - содержащей цинк аденозиндезаминазы (АДА) [7].

Изучение морфо-биологических особенностей ЭМП начато в 2000-е (Nieto M. A., 2009; Thiery J. P. et al., 2009; Schmitt F. et al., 2012). Одним из первых ученых в СНГ, активно исследовавших мезенхимальный переход, была проф. Василенко И. В. (с 2010 г.). Она создала карту генетических взаимодействий при ЭМП (2012г.), предложила классификацию перехода. С 2012 г. нами проводились совместные исследования по изучению биохимических особенностей пролиферации и ангиогенеза при ЭМП.

Известно о стимуляции ЭМП рядом стромальных компонентов и клетками микроокружения опухоли [56, 243], что опухолевые клетки на её протяжении гетерогенны [36]. В тоже время описываемые регуляторные эффекты АФК, 2-д-D-Риб исследуются преимущественно в культурах искусственно культивируемых опухолевых клеток. Считаем, что одновременное изучение особенностей активности ряда металлоферментов в опухолевых гомогенатах и клетках крови представляет научный интерес. Комплексное исследование в карциномах различной локализации обмена метаболитов, влияющих на процессы ангиогенеза, пролиферации, апоптоза, расширит представления об особенностях патогенеза ЭМП при раке.

Связь исследований с научными программами, планами, темами

Работа выполнена согласно плану НИР ГОО ВПО ДОННМУ ИМ. М. ГОРЬКОГО для кафедр биохимии, патологической анатомии, онкологии. Является фрагментом научно-исследовательских тем: «Метаболизм экзогенных и эндогенных предшественников ДНК, особенности их распределения в тканях и клетках крови в патогенезе разных типов пролиферации» (№ государственной регистрации 0108U001351, шифр УН 08.01.05); «Клинические, метаболические, молекулярно-генетические особенности при злокачественных новообразованиях» (№ государственной регистрации 02010698, шифр УН 16.01.05); «Морфологические и биохимические проявления взаимных влияний паренхимы и стромы раков основных локализаций (желудка, легких, печени, почек) в оценке агрессивности опухоли».

Цель исследования: изучить активность металлоферментов в клетках крови и тканях карцином различной локализации, выявить патогенетическую взаимосвязь между особенностями прооксидантных процессов, активностью ферментов обмена нуклеозидов и формированием индивидуальных агрессивных свойств карциномы.

Для реализации поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Исследовать особенности активности некоторых металлоферментов обмена нуклеозидов в карциномах различной локализации по сравнению с нетрансформированными тканями края резекции.
2. Изучить взаимосвязь особенностей фосфорилазной и трансферазной активности ТФ в опухоли с их индивидуальными уровнями экспрессии маркеров пролиферации (Ki-67) и ангиогенеза (CD34).
3. Сопоставить особенности активности ферментов обмена нуклеозидов в тканях опухоли с их активностью в плазме венозной крови и плазме, богатой тромбоцитами, оценить возможность использования для клинических исследований более доступного биоматериала.
4. Выявить особенности образования пероксида водорода в опухоли, определяя активность СОД и ГПО в нетрансформированных тканях края резекции и в опухолях немелкоклеточного рака легких, аденокарциномах желудка и кишечника, сопоставить с содержанием металлов переменной валентности.
5. Изучить особенности прооксидантных процессов в организме при раке, исследовав активность СОД, ГПО, АДА, КСО в эритроцитах крови.
6. Исследовать взаимосвязь образования H_2O_2 , изменений обмена нуклеозидов в эпителиальной опухоли с формированием её агрессивного фенотипа, исследуя карциномы различной локализации.
7. На основании комплексного анализа полученных данных определить наиболее значимые метаболические факторы патогенеза эпителиально-мезенхимального перехода.

Объект исследования: эпителиально-мезенхимальная трансформация (переход), реализуемая карциномами различных локализаций.

Предмет исследования: особенности формирования пероксида водорода, обмен нуклеозидов в опухолях немелкоклеточного рака легких, аденокарциномах желудка и кишечника; их взаимосвязь с формированием агрессивного фенотипа карциномы.

Научная новизна исследования

В карциномах легких, желудка, кишечника впервые одновременно исследованы оба вида активности ТФ, установлено, что по сравнению с фосфорилазной активностью (ТФк), её трансферазная активность (ТФан) также может оказывать значимый эффект на клеточные уровни дезокситимидина.

– впервые выявлены корреляционные связи показателя ангиогенеза и дедифференцировки CD34 и ТФк; маркера пролиферации Ki-67 и ТФан.

– уточнены и обобщены кооперативные эффекты между изменениями активности АДА и ТФан, (выявлены положительные корреляционные связи как в нетрансформированных тканях, так и в карциномах различных локализаций), указывающие на существующий путь ресинтеза дезокситимидина при потреблении продукта реакции, катализируемой АДА, в качестве косубстрата для трансферазной реакции ТФан.

– впервые доказано, что опухоли одной локализации и патоморфологического типа метаболически неоднородны по активности антиоксидантных ферментов (СОД, ГПО) и фосфорилазной активности ТФ.

– *in vitro* выявлены патогенетические взаимосвязи метаболических изменений обмена нуклеозидов и H_2O_2 с формированием индивидуальных агрессивных черт среди опухолей одной локализации и морфологии.

– впервые установлена возможность одновременного стимулирования ЭМП тканевыми метаболитами - H_2O_2 и 2-д-Д-Риб-1-Ф, исследована и разработана частная схема патогенеза ЭМП.

Теоретическая и практическая значимость работы

В диссертационной работе достигнуто новое решение научной проблемы по установлению патогенетической значимости для формирования агрессивных свойств опухоли изменений активности металлоферментов обмена нуклеозидов и ферментов антиоксидантной системы в карциномах различной локализации. Проблема решена путем определения указанных метаболических особенностей при эпителиально-мезенхимальном переходе (ЭМП) карцином. Данный подход помог установить и описать патогенетическую взаимосвязь между особенностями прооксидантных процессов, продукцией 2-дезоксид-рибозо-1-фосфата и формированием индивидуальных агрессивных свойств среди опухолей одной морфологии и локализации.

Уточнена и расширена концепция патогенеза эпителиально-мезенхимального перехода, путем определения возможности его метаболического стимулирования в опухолях вследствие повышения активности металлоферментов обмена нуклеозидов и дисбаланса антиоксидантных ферментов, способствующих одновременному формированию 2-д-Д-Риб-1-Ф и H_2O_2 .

Также расширено представление о патогенезе эритроцитарной дисфункции и «синдроме старения эритроцитов» у онкологических больных. Одновременное выраженное снижение активности АДА и ГПО в эритроцитах ведет к неблагоприятному повышению уровней аденозина и пероксида водорода, токсичных для красных клеток крови.

Предложенное изучение двух видов активности ТФ повышает информативность этого ферментативного теста. Нами предложен «Способ ранней диагностики опухолевого процесса». ТФ участвует в метаболизме фторпиримидинов, поэтому определение ферментативной активности в плазме крови, оттекающей от органа, получаемой во время операции, перспективно для индивидуализации адьювантной химиотерапии многочисленными препаратами фторпиримидиновой группы. Поскольку ферментативный тест характеризует интенсивность пролиферации, то может быть исследован в периферической крови

для мониторинга эффективности проводимого лечения, для скрининга рецидива опухоли.

Личный вклад соискателя

Представленные в диссертационной работе экспериментальные данные получены лично автором, либо при его непосредственном участии на всех этапах исследований, включая планирование и проведение экспериментов, обработку, оформление и публикацию результатов.

Диссертация является самостоятельной научной работой соискателя. Автором разработан и реализован проект исследования. Все биохимические методы исследования выполнены лично. Иммуногистохимические исследования в этом же материале проведены на кафедре патологической анатомии ГОО ВПО ДонНМУ им. М. Горького под руководством профессора Василенко И. В. Совместно с профессором Василенко И. В. автором сопоставлены результаты биохимических и патоморфологических исследований. Дальнейший статистический анализ, поиск корреляций проводился самостоятельно. Автором выделены и систематизированы особенности метаболизма, сопровождающие развитие ЭМП. Полученные результаты представлены в виде научных публикаций в профессиональных журналах и самостоятельно изложены докторантом в диссертационном исследовании. В работах, выполненных в соавторстве, реализованы научные идеи соискателя. В процессе выполнения диссертационной работы не использованы идеи и разработки соавторов, в неё не вошли материалы кандидатской диссертации.

Методология и методы исследования

Последовательное применение методов научного познания составило методологическую основу диссертационной работы, выполненной в дизайне сравнительного исследования с использованием биохимических, морфологических, анамнестических, статистических методов. Для решения поставленных задач проведено открытое, когортное проспективное исследование. На этапе планирования начато изучение данных литературы, разработаны критерии включения и исключения больных.

В ходе исследования использовались методы: биохимические (определение активностей ферментов – ТФан, ТФк, АДА, КСО, СОД, ГПО); физико-химические (определение содержания металлов переменной валентности в биоматериале); иммуногистохимический метод (особенности экспрессии маркеров: эпителиальных (панцитокератин AE1/AE3, цитокератин 18), клеточно-клеточной адгезии (Е-кадгерин), мезенхимальных маркеров (виментина, альфа-гладкомышечного актина). Для оценки и интерпретации полученных данных использовался статистический метод (описательная статистика, однофакторный дисперсионный анализ ANOVA, метод множественных сравнений, корреляционный анализ).

Основные положения, выносимые на защиту

1. Повышение активности ТФ и АДА – универсальное свойство карцином исследованных локализаций. Сочетанная активность ферментов может обеспечивать как ресинтез дезокситимидина, так и продукцию 2-дезокси-D-рибозо-1-фосфата.

2. По активности антиоксидантных ферментов (СОД, ГПО) карциномы метаболически неоднородны. Выявлены подгруппы, в которых наряду с повышением активности СОД и низкой активностью ГПО было характерно повышение содержания железа. В совокупности это ведет к формированию активных форм кислорода. Для тканей этих подгрупп снижение активности ГПО было генерализованным, характерным и для нетрансформированных контрольных тканей.

3. Наряду с тканями выявлено усиление прооксидантных процессов в эритроцитах крови пациентов. Следовательно, усиление процессов свободно-радикального окисления в организме онкологических больных носит распространенный характер. Выявленные дисметаболические процессы в эритроцитах сопряжены с сокращением периода их эффективной циркуляции, являются факторами патогенеза анемического синдрома.

4. Предполагаем, что выраженное повышение фосфоорилазной активности ТФ на фоне дисбаланса активности ферментов антиоксидантов могут формировать

условия для стимулирования тканевыми метаболитами (2-д-D-Риб-1-Ф и H_2O_2) сигнальных путей, обеспечивающих формирование агрессивных свойств опухоли, т.ч. реализующих эпителиально-мезенхимальный переход.

Степень достоверности полученных данных

Достоверность полученных результатов достигнута путем тщательного планирования исследования, репрезентативностью и достаточным объемом выборок, проведения исследований по стандартным методикам на метрологически поверенном оборудовании. При проведении биохимических исследованиях использовались сертифицированные реактивы (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Германия). При иммуногистохимических исследованиях использовали систему визуализации EnVision FLEX (Dako, Дания). Математическая обработка результатов и статистический анализ проводились с использованием Microsoft Office Excel (v. 14.0.7237.5000, номер продукта: 02260-018-0000106-48881, Microsoft Corporation, 2010) и адаптированной для медико-биологических исследований программы MedStat v. 5.2 (Copyright © 2003-2019) и «Statistica 10.0» Statsoft, USA.

Апробация результатов исследований

Основные положения диссертационной работы были представлены и обсуждались: на 6-м Международном конгрессе патофизиологов (Монреаль, Канада, 2010); VIII Парнасовской конференции по биохимии (Варшава, Польша, 2011); VII Львовско-Люблинской конференции «Сучасні аспекти експериментальної та клінічної біохімії» (Львов, Украина, 2013); 17-м ЕССО Европейском конгрессе по проблемам изучения рака (Нидерланды, 2013); Международной научно-практической конференции «Инновационные перспективы здравоохранения Донбасса» (Донецк, 2015); VIII Всероссийской научной конференции с международным участием «Современные направления биохимии человека» (Санкт-Петербург, 2015); XIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты» памяти А. Ю. Барышникова (Москва, 2016); Всероссийской научной конференции «Университетская наука: взгляд в

будущее» (Курск, 2016); Межрегиональной научно-практической конференции «Диагностика и лечение анемий в XXI веке» (Рязань, 2017), 2-й Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Современные достижения химико-биологических наук в профилактической и клинической медицине» (Санкт-Петербург, 2021); Международной научно-технической конференции «Актуальные вопросы биологической физики и химии» (Севастополь, 2022).

Личный вклад соискателя

Представленные в диссертационной работе экспериментальные данные получены лично автором, либо при его непосредственном участии на всех этапах исследований, включая планирование и проведение экспериментов, обработку, оформление и публикацию результатов.

Диссертация является самостоятельной научной работой соискателя. Автором разработан и реализован проект исследования. Все биохимические методы исследования выполнены лично. Иммуногистохимические исследования в этом же материале проведены на кафедре патологической анатомии ГОО ВПО ДонНМУ им. М. Горького под руководством проф. Василенко И. В. Совместно с проф. Василенко И. В. автором сопоставлены результаты биохимических и патоморфологических исследований. Дальнейший статистический анализ, поиск корреляций проводился самостоятельно. Автором выделены и систематизированы особенности метаболизма, сопровождающие развитие ЭМП. Полученные результаты представлены в виде научных публикаций в профессиональных журналах и самостоятельно изложены докторантом в диссертационном исследовании. В работах, выполненных в соавторстве, реализованы научные идеи соискателя. В процессе выполнения диссертационной работы не использованы идеи и разработки соавторов, в неё не вошли материалы кандидатской диссертации.

Внедрение результатов исследования

Основные результаты диссертационного исследования внедрены в практическую деятельность учреждений здравоохранения: «Республиканский

онкологический центр им. проф. Бондаря Г. В. Министерства здравоохранения Донецкой Народной Республики», «Донецкое клиническое территориальное медицинское объединение Министерства здравоохранения Донецкой Народной Республики»; а также в учебную деятельность кафедр ГОО ВПО ДОННМУ ИМ. М. ГОРЬКОГО: патологической физиологии, биологической химии, патологической анатомии.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 49 научных работ, в том числе: 23 статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных Высшими аттестационными комиссиями Донецкой Народной Республики, Украины, Российской Федерации для публикации основных результатов диссертаций на соискание ученых степеней кандидата и доктора наук., 1 декларационный патент, т.ч. 8 статей, опубликованных без соавторов.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на русском языке Диссертационная работа изложена на русском языке на 293 страницах печатного текста и состоит из «Введения», «Обзора литературы», «Материалов и методов исследования», 5 разделов собственных исследований, раздела «Анализ и обсуждение результатов исследования», «Выводов», «Практических рекомендаций», списка использованной литературы. Работа иллюстрирована, включает 39 рисунков и 42 таблицы. Список использованной литературы содержит 343 научных источника (из них 248 – латиницей).

РАЗДЕЛ 1
ФОРМИРОВАНИЕ АГРЕССИВНОГО ФЕНОТИПА КАРЦИНОМЫ.
СОВРЕМЕННЫЕ АСПЕКТЫ
(Обзор литературы)

**1.1. Современные представления о молекулярных механизмах,
реализующих формирование агрессивных свойств опухоли**

Высокие уровни смертности при раке различных локализаций обусловлены его агрессивными свойствами, связаны с метастатическим распространением опухолевых клеток, а также их резистентностью к методам комбинированного лечения [327]. При этом во всём мире заболеваемость раком только растёт. Данные тенденции делают актуальными исследования особенностей патогенеза при формировании агрессивного фенотипа опухоли.

Метастатический потенциал раковых клеток зависит от их взаимодействия с гомеостатическими факторами, которые способствуют росту раковых клеток, выживанию, ангиогенезу, инвазии и метастазированию [93, 94, 219, 236].

Было обнаружено, что сигнальные пути ERK/NF-κB [295], ERK/MAPK и JAK2-STAT1 [327] регулируют экспрессию CXCL1. В частности, сигнальный путь JAK-STAT тесно связан с контролем клеточной пролиферации, дифференцировки, апоптоза и иммунной регуляции [327, 331].

Фосфорилирование тирозиновых фрагментов STAT1 киназой JAK2 стимулируют цитокины и факторы роста. Однако в настоящее время в литературе имеются данные, которые указывают на то, что активные формы кислорода (АФК) являются дополнительным регулятором сигнального пути JAK2 [289, 294].

Так, известно, что стимулирование экспрессии CXCL1 (chemokine (C-X-C motif) ligand 1, лиганд 1 хемокина (мотив CXC) (CXCL1)) за счет активации рецептора – фермента «янус киназы-2» (JAK2 - Janus kinase 2) необходимо для подвижности опухолевых клеток различных линий. Liu J. с соавторами продемонстрировали, что их способность к перемещению регулируется по JAK2-

STAT1-CXCL1 сигнальному пути. Стимулируемые при этом белковые факторы транскрипции STAT1 (Signal transducers and activators of transcription 1, преобразователи сигналов и активаторы транскрипции) стимулируют экспрессию специфического лиганда хемокина, отвечающего за подвижность опухолевых клеток. Уровень CXCL1 быстро повышался. Активация JAK2-STAT1-CXCL1 пути связана с регуляторными эффектами активных форм кислорода (АФК). Последние вызывают окислительную модификацию специфических протеинфосфатаз и их последующую инактивацию, что способствует длительной стимуляции этого каскада [327]. Например, модифицирующее действие АФК за счет окисления и, как следствие, дальнейшей инактивации тирозиновой протеинфосфатазы PTP_{1B} ((Protein Tyrosine Phosphatase 1B) стимулирует подвижность опухолевых клеток различных линий.

В частности, АФК-модулированный JAK2 сигнальный путь связан с прогрессированием рака желудка, метастазированием рака кишечника [294].

О существенном влиянии процессов свободно-радикального окисления на формирование агрессивных свойств рака также свидетельствует тот факт, что восстановленный глутатион (Г-SH) устранял стимулирующее действие АФК на фосфорилирование JAK2-STAT1 и экспрессию CXCL1, а также подвижность клеток.

Накапливающиеся данные свидетельствуют о том, что экзогенные, формируемые микроокружением опухолевых клеток АФК могут функционировать как сигнальные молекулы для участия в различных патологических процессах, включая пролиферацию и подвижность опухолевых клеток [102]. Zeng J. и соавт. показали влияние АФК на клеточный цикл и подвижность в клетках колоректального рака через онкогенный сигнальный путь CXCL14. Zhao J. и соавт. выявили суперэкспрессию CXCL5 в опухолевых тканях на поздних стадиях метастазирующего колоректального рака, ассоциированную с плохим прогнозом [331]. Сверхэкспрессия CXCL5 усиливала миграцию и инвазию клеток колоректального рака за счёт активации путей ERK/Elk-1/Snail и AKT/GSK3 β / β -катенина.

Можно отметить, что хемокины (СХС) представляют собой многофункциональное суперсемейство небольших белков, которые взаимодействуют с рецепторами, например, CXCR2, связанными с G-белками в клетках-мишенях. Эта связь белка-лиганда CXCL5 с рецептором CXCR2 опосредует различные клеточные процессы, включая транспорт нейтрофилов, миграцию опухолевых клеток и инвазию [331, 332].

Для всех сигнальных путей, стимулируемых с участием многочисленных протеинкиназ ключевым универсальным механизмом, необходимым для дальнейшего транслирования сигнала, является ковалентная модификация чувствительных белков путём их фосфорилирования. Например, PI3K/AKT, JAK2-STAT1, ERK/NF- κ B, ERK/MAPK – запускаются киназами инозитол-3-фосфат зависимой, янус киназой 2, а также внеклеточной, регулирующей сигнал киназой (Extracellular signal-regulated kinase, ERK) [295].

В клетках нетрансформированных имеется система сдерживания сигнала - антагонисты протеинкиназам – протеинфосфатазы. Они считаются супрессорами опухолевого роста и продвижения – это достаточно многочисленная группа, в которую, например, входят фосфатаза и гомолог тензина (PTEN), протеин-тирозинфосфатаза 1B (PTP1B), протеинфосфатаза 2 (PP2) и другие. Так, PTEN (гомолог фосфатазы и тензина) является опухолевым супрессором, ответственным за негативную регуляцию передачи сигналов PI3K/AKT [283]. Потеря экспрессии PTEN или мутации в гене, а также нарушение регуляции сигнального пути PI3K/AKT часто обнаруживались во многих опухолях.

В настоящее время имеются данные о способности пероксида водорода (H_2O_2) обратимо окислять тиоловые группы в остатках цистеина целого ряда специфических протеинфосфатаз, что является механизмом их инактивации и способствует более длительному сохранению чувствительных протеинкиназ фосфорилированными [276].

Согласно Kumari S. и соавт. для выживания опухолевых клеток H_2O_2 как сигнальная молекула обратимо окисляет цистеинтиоловые группы фосфатаз, таких как фосфатаза и гомолог тензина (PTEN), протеин-тирозинфосфатаза 1B

(PTP1B) и протеин-фосфатаза 2 (PP2), которые при этом теряют свою дефосфорилирующую активность. Это способствуют активации пути выживания PI3K/Akt/mTOR. Более того, инактивация PTEN опосредует активирующий эффект пероксида водорода на Ras и передачу сигналов фактора роста. Было показано, что АФК регулируют многочисленные сигнальные пути (например, пути MAPK и PI3K/Akt), а также транскрипционные стимулы белковых факторов (например, HIF и Snail). В частности, окислительная модификация пролилгидроксилазы (PHD2) вызывает стабилизацию HIF1 во время гипоксии, что важно для ангиогенеза и метастазирования рака.

Перечень стимулируемых АФК протеинкиназ был бы неполным, если не указать, что могут активироваться протеинкиназы: CaMKII, PKG, PKA, ERK, PI3K, Akt, PKC, PDK, JNK, p38. Маслов Л. Н. и соавт. предполагают, что активация может быть следствием подавления активности фосфатаз [3, 257, 338].

Уточняя роль АФК в качестве сигнальных молекул, авторы также указывают, что АФК вызывают активацию транскрипционного фактора NF-κB и его сигнального пути, путём их более длительного существования в фосфорилированной форме из-за ОМБ протеинфосфатаз.

АФК и прежде всего H₂O₂ ингибируют фермент PHD2, что ведет к стабилизации белка HIF-α и образованию гетеродимера между субъединицами HIF-α и HIF-β с образованием активного транскрипционного фактора HIF [3]. Реализация антиапоптотических, ангиогенных эффектов HIF крайне важна для выживания клеток растущей опухоли [102].

Суммируя регуляторные эффекты АФК, можно сделать вывод, что их реализация необходима для усиления миграции и инвазии раковых клеток.

Активные формы кислорода играют жизненно важную роль на каждой стадии развития рака, включая инициацию, промоцию и прогрессирование. Повышение внутриклеточных уровней АФК может приводить к активации онкогенов и онкогенных сигналов, включая конститутивно активные мутантные Ras, Bcr-Abl и c-Myc, которые участвуют в клеточной пролиферации и

инактивации генов, подавляющих опухоль, а также участвуют в ангиогенезе и митохондриальной дисфункции [293].

Передача сигналов, опосредованных АФК, может регулироваться антиоксидантной защитой [19, 276]. Ключевую роль в трансдукции сигналов формируемых наиболее стабильной и долгоживущей по сравнению с иными АФК молекулой H_2O_2 может играть глутатионпероксидаза (ГПО). Этот тандем между активностью ГПО и уровнями H_2O_2 называют окислительно-восстановительным ретрансляционным механизмом. Поскольку перекиси играют двойную роль в канцерогенезе, считают, что наиболее оптимально для жизнедеятельности клетки, если до 90% общего глутатиона содержится в восстановленной форме Г-SH и менее 10% в дисульфидной, то есть окисленной, не функциональной форме (Г-SS-Г). Есть мнение, что изменение соотношения указывает на окислительный стресс [85, 276].

1.2. Морфо-биологические особенности эпителиально-мезенхимального перехода, реализуемого опухолью

Учитывая описанные выше эффекты активации сигнальных путей, обеспечивающих клеткам опухоли выживание, возможность распространения за счёт метастазирования и инвазии, считаем необходимым проследить морфологические изменения, которые при этом может претерпевать эпителиальная опухоль. Результаты показали, что H_2O_2 способствует размножению и миграции клеток колоректального рака, регулируя прогрессирование клеточного цикла и переход от эпителия к мезенхиме [102]. Эта же АФК обеспечивает инвазивные способности раковых клеток поджелудочной железы [295].

Эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) был признан не только физиологическим механизмом развития и ремоделирования тканей, но и патологическим механизмом прогрессирования рака. Во время перехода клетки теряют свои поляризованные эпителиальные признаки и приобретают

мезенхимальные характеристики, такие как пониженная экспрессия эпителиальных маркеров, маркеров клеточно-клеточной адгезии Е-кадгерина и повышенная экспрессия мезенхимальных N-кадгерина, α -гладкомышечного актина, виментина, которые формируют агрессивный фенотип, индуцируют подвижность [148, 295]. Это событие повышает устойчивость опухоли к современным методам лечения [284]. Доказано, что повышенные количества АФК стимулируют несколько путей, обеспечивающих клеточную миграцию, ангиогенез и метастазирование при различных типах рака [102].

При этом оказалось, что различные стимуляторы, такие как эпидермальный фактор роста и трансформирующий фактор роста- β , также могут индуцировать ЭМП посредством генерации АФК [295].

Сам процесс ЭМП очень сложен, имеет различные уровни его регуляции в клетке: активацию многих факторов роста и их рецепторов, цитокинов, включение различных, связанных друг с другом, путей сигнальной трансдукции, изменения активности очень многих факторов транскрипции, запускающих различные генетические программы, что в итоге определяет многообразие морфологических проявлений и клинических особенностей ЭМП [205].

Обособление опухолевых клеток, подвижность, часто сопровождается изменением их формы, приобретением фибробластоподобной формы с инвазией в строму. Этот признак хорошо виден уже при рутинной окраске препаратов гематоксилином и эозином.

Наиболее характерным признаком ЭМП является потеря опухолевыми клетками маркеров эпителия - цитокератинов, например, панцитокератина AE1/AE3 в тяжах эпителия, врастающих в строму при сохранении его экспрессии в основном пласте. Иногда он экспрессируется в части цитоплазмы опухолевых клеток. В участках с потерей экспрессии цитокератина одновременно можно видеть и приобретение опухолевыми клетками вытянутой, фибробластоподобной формы [63]. Однако эти признаки не всегда совпадают. Иногда возможно сохранение экспрессии цитокератинов в резко вытянутых фибробластоподобных клетках и потеря ее в опухолевых клетках

солидных или железистых структур. Характерна также потеря экспрессии цитокератина 18 в опухолевых клетках при ЭМП, так как этот цитокератин является мишенью фактора транскрипции Snail, запускающего многие генетические программы ЭМП, в том числе и репрессию E-кадгерина [63]. Обособливающиеся клетки, приобретая вытянутую фибробластоподобную форму способны транслировать мезенхимальные белки, обеспечивающие им подвижность, например, α -гладкомышечный актин. Морфологически визуализируется формирование сосудистой сети, однако капилляры с признаками атипии и незрелости. Клетки экспрессируют маркеры эндотелиоцитов CD34, CD31, также являющиеся маркерами стволовых клеток. Появление последних закономерно для дедифференцировки. Известно, что случаи CD34-положительных фибробластов в строме характеризовались морфологическими признаками агрессии [63]. Это связано с тем, что данный маркер может экспрессироваться и прогениторными стволовыми клетками, незрелыми клетками кроветворных тканей, эмбриональными фибробластами.

Утрата признаков эпителия также сопровождается сменой режимов пролиферации, а именно её снижением. Одним из её показателей является ядерная экспрессия Ki-67. Для ЭМП характерно снижение экспрессии Ki-67 [63, 66].

Среди компонентов стромы также появляются модифицированные клетки. Наиболее важными для формирования метастатического потенциала и инвазивных свойств опухоли являются ассоциированные с опухолевыми клетками фибробласты (CAFs), макрофаги и др. [63, 65].

CAFs представленные в опухолях бывают двух типов. У второго подтипа CAF II (или CAF-D) проканцерогенные эффекты наиболее выражены, в частности, помимо иммуносупрессивных свойств, они экспрессируют α -гладкомышечный актин, сами являются подвижными [63].

Помимо опухолевых клеток, ассоциированные с раком фибробласты также выделяют внеклеточный H_2O_2 , который индуцирует окислительный стресс в нормальных фибробластах, вызывая их перепрограммирование на CAFs и

способствуя развитию рака на местах, трансформации и росту эпителиальных клеток, а также агрессивности рака [283]. Следовательно, компоненты опухолевой стромы – трансформированные фибробласты, макрофаги способны генерировать внеклеточный пероксид водорода, который может запускать внеклеточный сигнально-регулируемый киназный путь (Extracellular signal-regulated kinase, ERK), наиболее специфичный для мессенджерной роли АФК.

Являясь одним из наиболее классических сигнальных путей, внеклеточный сигнально-регулируемый киназный путь (ERK) является важным сигнальным каскадом, запускаемым АФК, который участвует в миграции и инвазии опухоли [295].

Перечень стромальных компонентов, активно генерирующих АФК, достаточно велик. Так, иммунные клетки, такие как клетки-супрессоры миелоидного происхождения (myeloid-derived suppressor cells, MDSCs), ассоциированные с опухолью макрофаги (tumor-associated macrophages, TAMs), регуляторные Т-клетки (regulatory T cells, Tregs), нейтрофилы, эозинофилы и мононуклеарные фагоциты также могут генерировать АФК (главным образом H_2O_2) в микроокружении опухоли [237,248, 269].

Микроокружение опухолевых клеток реализует взаимодействие с ними за счёт непосредственных контактов (по типу клетка-клетка или клетка-внеклеточный матрикс) [332].

Также взаиморегулирующие стимулы стромы и опухоли реализуются путём секреции множества растворимых факторов [283]. Это многочисленные факторы роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factors, VEGFs), факторы роста фибробластов (fibroblast growth factors, FGFs), эпидермальный (epidermal growth factor, EGFs), ангиопоэтины (angiopoietins, ANGs), трансформирующие факторы роста (transforming growth factors, TNFs), АФК, хемокины (CXCL1, CXCL5, CXCL14), цитокины, экзосомы, микроРНК, Са.

В частности, Kefei Yuan и соавт. удалось установить, что высокие уровни тиоредоксину подобного белка в опухолевой строме (thioredoxin-like protein, TXNDC12) в тканях гепатоцеллюлярной карциномы коррелировали с

повышенными уровнями ядерного β -катенина и с плохим прогнозом. Они продемонстрировали, что TXNDC12 может активировать β -катенин посредством межбелкового взаимодействия и способствовать его дальнейшему перемещению в ядро и активировать Wnt/ β -катенинзависимый путь (Wnt/ β -catenin signaling), запускающий развитие ЭМП и метастазирование, инвазию [332].

Это далеко не единственный пример непосредственного стимулирования ЭМП белковыми молекулами. Эти же эффекты демонстрируют и хемокины. Так, согласно мнения Zhao J. и соавторов комплекс CXCL5 с рецептором CXCR2 стимулирует миграцию клеток колоректального рака путем индукции ЭМП. Действительно, было показано, что суперэкспрессия CXCL5 в опухолевых клетках приводила к снижению экспрессии эпителиальных маркеров, в частности, Е-кадгерина и повышению экспрессии мезенхимальных маркеров N-кадгерина и виментина [331].

В настоящее время не вызывает сомнения факт о том, что микроокружение опухоли играет важную роль в инициации, прогрессировании и метастазировании опухоли [276, 283].

А также оно участвует в формировании резистентности к таргетной терапии, лучевой и химиотерапии, а также чувствительности к иммунотерапии [272].

Относительно стабильные АФК, такие как H_2O_2 , которые интенсивно вырабатываются опухолевыми клетками, могут диффундировать во внеклеточное пространство. H_2O_2 может свободно проникать через мембраны; однако клетки, по-видимому, регулируют транспорт H_2O_2 путем изменения липидного состава мембран, тем самым поддерживая клеточный уровень H_2O_2 , обеспечивая устойчивую стимуляцию его сигнальных путей [241].

Это важно для биологии опухолевого роста. Поскольку, согласно Kumari S и соавт. АФК сопровождают реализацию всех стадий канцерогенеза – инициацию, промоцию, прогрессию [276]. Иногда эффекты АФК необходимы для реализации биологических эффектов других молекул, например, металлопротеиназ.

Ранее Kumari S. и соавт. сообщалось, что повышенная экспрессия матриксных металлопротеиназ (MMPs) является предиктором агрессивности

опухоли, метастазирования и плохой выживаемости пациентов. В последнее время MMP_S считаются важным фактором, запускающим эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) [276, 283].

Экспрессия MMP-2, 3, 9 и 28 при ЭМП из-за потери интактного E-кадгерина увеличивала подвижность и инвазивность, снижала регуляцию эпителиальных маркеров и повышала регуляцию мезенхимальных маркеров. Исследования показали, что существует участие Ras в передаче сигналов для перестройки цитоскелета и в опосредовании передачи сигналов интегрином. Было продемонстрировано, что АФК могут генерироваться путем интегрин - Ras стимулов, что это в свою очередь приводит к миграции и инвазии опухолевых клеток. MMP-3 индуцированная ЭМП, по-видимому, опосредуется индукцией АФК и повышенной экспрессией Ras1b. Агент, подавляющий АФК, N-ацетилцистеин (НАС) эффективно ингибировал ЭМП, индуцированную MMP-3. Авторы высказывают предположение, что ингибиторы MMP-3 или ингибиторы АФК могут быть полезны для сдерживания ЭМП или уничтожения клеток, уже прошедших трансформацию, что приведет к снижению агрессивности опухоли [276].

Таким образом, можно считать, что некоторые метаболиты, нарабатываемые как самими клетками опухоли, так и её клеточными компонентами непосредственно участвуют в стимуляции злокачественных черт при опухолевой прогрессии. Безусловно, это не только АФК, но и ряд других, например, редуцирующие сахара, чьё производство в опухолях возрастает и также ассоциировано с плохим прогнозом [192]. Постараемся уделить им внимание в последующих подразделах. Особенный интерес представляют однонаправленные изменения уровней метаболитов. В частности, известно, что специфическая альдопентоза 2-дезоксид-рибоза (2-д-Д-риб) преимущественно формируется в ткани при деградации ДНК и её нуклеотидов. Она является продуктом реакции, катализируемой тимидинфосфорилазой. Причём многочисленные эффекты этого белка связывают непосредственно с продуктами реакции. Это обратимая реакция фосфоролиза дезокситимидина в тимин и соответствующую фосфо-пентозу.

Оказалось, что катаболизм дезокситимидина сопряжён с нарастанием уровней пероксида водорода [192,].

Таким образом, реализация ЭМП - это результат реализации опухолью многочисленных регуляторных сигналов, формируемых, в том числе и низкомолекулярными метаболитами, например, АФК. Также это результат взаимодействия клеток опухоли и стромы, зачастую взаимно стимулирующий. Клеточный компонент стромы также при этом трансформируется, утрачивает физиологические функции, начинает демонстрировать зачастую противоположные эффекты, как например, TAMs, CAFs и другие. Так, например, тимидинфосфорилаза (ТФ) может секретироваться тромбоцитами наряду с многочисленными факторами роста. Она считается ангиогенным фактором тромбоцитарного происхождения (platelet-derived endothelial cell growth factor, PD-ECGF). Усиление её экспрессии в растущей опухоли неизменно связывают с развитием агрессивных свойств, плохим прогнозом выживаемости [320, 322].

До настоящего времени не было публикаций, непосредственно указывавших бы на связь особенностей экспрессии ТФ с развитием ЭМП. В то время как некоторые другие ферменты считаются непосредственно вовлечёнными в трансформацию эпителиального фенотипа карциномы в мезенхимальный, например, матриксные металлопротеиназы или супероксиддисмутазы (СОД) [241, 276, 295].

Итак, ЭМП четко верифицируется, является морфологическим свидетельством агрессивных свойств конкретной опухоли. ЭМП свидетельствует об активации миграционных процессов, необходимых клеткам для инвазии и метастазирования, также о формировании устойчивости в апоптозу, о развитии резистентности к химио- и радиотерапии, направленных на преимущественно пролиферирующие клетки [66].

Поэтому исследование ЭМП в раках различной локализации и различного гистологического строения актуально, позволит проследить особенности его патогенеза. Это особенно перспективно, учитывая огромные возможности иммуно-гистохимических методов исследования.

1.3. Свойства и функции белка TP/PD-ECGF – фермента и фактора ангиогенеза в норме и при неопластической патологии

Исследование метаболизма предшественников ДНК позволило выделить ключевые ферменты её обмена. Особый интерес вызвали ферменты «запасного» пути синтеза тимидинмонофосфата (ТМФ), - тимидинкиназа (ТК) и тимидинфосфорилаза (ТФ). С 1981 по 1992 год благодаря многочисленным исследованиям основного (de novo) и «запасного» (salvage) путей метаболизма ТМФ было показано, что химиотерапевтические препараты, ингибирующие основной путь синтеза ТМФ, 5-фторурацил (5-FU), фторофур, метатрексат могут быть малоэффективны из-за повышающейся при этом активности ферментов «запасного» пути – ТК и ТФ [320, 322].

На протяжении долгого периода на кафедре биохимии ранее Донецкого Государственного медицинского института, а затем, университета имени М. Горького под руководством профессора Борзенко Б. Г. велись исследования особенностей активности ТК и ТФ при раках различной локализации и стадий. Исследования стали возможны благодаря сотрудничеству с тогда Областным Онкоцентром, возглавлявшимся профессором Бондарем Г. В. Благодаря тесному взаимодействию с клиницистами был накоплен многолетний опыт по исследованию особенностей теперь уже признанного маркера пролиферации – тимидинкиназы и тимидинфосфорилазы. Данные согласуются с мнением о том, что в тканях опухолей с высоким пролиферативным потенциалом их активность повышается [108]. Проф. Борзенко Б. Г. была в числе пионеров, доказавших, что тканевая активность ТК коррелирует с её свороточной активностью, что позволило ей рекомендовать этот доступный материал для онкомониторинга пациентов, контроля эффективности проводимого лечения. [108, 156, 159].

Также параллельно получены данные об обратной корреляции высоких уровней сывороточной активности ТК, на фоне которой активность ТФ, наоборот, при патологии была снижена [108, 146].

Причем низкая активность в сыворотке для ТФ сочеталась с развитием химиорезистентности к 5-фторурацилу (5-FU) у пациенток, страдающих раком молочной железы [108, 156]. Также сопоставили сывороточную активность ферментов в динамике после оперативного лечения. В случае полной эрадикации опухоли при радикальных оперативных вмешательствах ферментативная активность стремилась к норме. Такие тенденции отсутствовали у пациенток с паллиативными оперативными вмешательствами. Подобные результаты описаны и другими исследователями [227, 312].

Полученные результаты позволяли рекомендовать применение в клинике данных тестов индивидуального мониторинга.

Нами была изучена динамика активности ТК и ТФ в сыворотке здоровых людей в возрасте от 23 до 70 лет. При этом установлено увеличение активности этих ферментов, прямо коррелирующее с возрастом обследуемых и подтверждающее мнение многих учёных о том, что «возраст является фактором онкологического риска» [1]. Необходимо отметить дисбаланс ферментативной активности, появляющейся с возрастом у больных в группах повышенного риска (язвенная болезнь желудка, мастопатия) [6].

В тоже время оставались неразрешенными вопросы, связанные с полифункциональностью тимидинфосфорилазы [336]. Действительно, фермент активно секретируют тромбоциты, установлено, что это сопряжено со стимуляцией ангиогенеза [298, 319, 324]. Причём ангиогенные и некоторые другие эффекты фермента, скорее связаны с его продуктами реакции обратимого фосфоролиза дезокситимидина [149, 312].

Вначале, всеобщее внимание было направлено на изучение ТК и поиск путей снижения её активности, но с 1987 года не меньший интерес вызывает ТФ. Данная часть обзора посвящена её многочисленным эффектам, в том числе, сопряженным с развитием агрессивных свойств опухоли [323, 325].

Фермент экспрессируют многочисленные клетки организма в норме, а также опухолевые клетки при патологии. Причем эта выражена и в стромальном

компоненте опухоли, например, в клетках, инфильтрирующих строму [2716 301].

Согласно литературе, в 1954 году впервые появились данные о выделенном из различных источников (гомогенаты животных тканей, растений, бактерий) ферменте, катализирующем обратимую реакцию превращения тимидина в тимин. Фермент был назван тимидинфосфорилазой (КФ 2. 4. 2. 4). Его пространственная структура была описана позже – в 1990-е установили, что ТФ гомодимер, состоящий из двух идентичных субъединиц [39], также является кобальтсодержащим металлоферментом.

Изучение структурных особенностей фермента, выделенного из *E.coli*, и его активного центра позволило объяснить особенности его каталитической активности. Была установлена аминокислотная последовательность активного центра, а также тот факт, что при определённых условиях аминокислоты объединены в два белковых домена. Эти белковые субъединицы могут изменять своё пространственное положение, создавая уникальную структуру активного центра фермента [39].

Необходимо отметить, что изменение пространственной конфигурации может быть обусловлено влиянием условий протекания реакции. Возможно, это объясняется тем, что ТФ проявляют два типа активности. Первый тип - фосфорилазная реакция – обратимый фосфоролиз дезокситимидина до тимина и 2-дезоксидрибозо-1-фосфата (D-dRP) и его синтез из тимина и неорганического фосфата. Второй тип: дезоксирибозилтрансферазная реакция [314].

Фермент имеет низкую субстратную специфичность . Это подтверждается его сходством со специфичностью уридинфосфорилазы (УФ). Выявлено, что активность ТФ и УФ и их субстратная специфичность в некоторых тканях находятся в одном диапазоне. Исследователи используют ингибиторы для ТФ и УФ, которые помогают определить различную фосфоролитическую активность в разных тканях [193, 305, 306, 318].

Установлено, что УФ участвует в превращении фторпиримидинов, но, в отличие от ТФ, не оказывает выраженного влияния на восприимчивость опухолевых клеток к препаратам 5-FU [301, 312, 313].

Новый аспект участия ТФ в метаболических процессах был выявлен при изучении дальнейшего превращения D-dRP [192]. Было доказано, что данный продукт включается затем в гликолиз, обеспечивая опухоль энергией даже в условиях пониженного питания клеток [325]. Установлена высокая активность ТФ в тромбоцитах, фибробластах и других клетках организма [193]. Высока активность ТФ в плацентарной ткани.

Однако резкое увеличение активности фермента наблюдалось именно в быстрорастущих опухолевых тканях. Показано увеличение активности ТФ в опухолевой ткани по сравнению с нормальной при раке желудка, толстой кишки, поджелудочной железы, лёгких, молочной железы, гепатоцеллюлярном раке [312 – 314; 323 - 326]. Выявлено, что ТФ оказывает влияние на резорбцию костей, стимулируя возникновение миеломы и, следовательно, может быть маркером ранней диагностики этого заболевания.

Было обнаружено изменение активности ТФ в зависимости от стадии заболевания (больные раком желудка- стадия $T_1N_0M_0$ до $T_3N_1M_0$) и дифференцировки опухоли. Как уже отмечалось выше, было проведено изучение активности ТК и ТФ до и после различных форм оперативного вмешательства (радикального, паллиативного и диагностических лапаротомий). При полном удалении опухоли при радикальных операции наблюдали изменения активности ферментов, стремившиеся к норме [156].

Стоит отметить полученные ранее данные об увеличении активности ТФ в тканях язвы желудка у больных с осложнённым дисплазией течением заболевания, а также в образцах ткани опухоли желудка по сравнению с близлежащими здоровыми тканями [6].

Опухоль окружена и инфильтрована макрофагами, поскольку злокачественному росту сопутствует хронический воспалительный процесс. Это позволило исследователям выявить высокую экспрессию ТФ при таких

заболеваниях, как ревматоидный артрит, псориаз. Была обнаружена чёткая прямая корреляция между активностью ТФ и интенсивностью пролиферативных процессов в организме [81].

Анализ пространственной структуры и кинетики влияния активаторов и ингибиторов, участие в метаболизме нуклеиновых кислот, казалось, дал полную характеристику исследуемого белка и ничто не предвещало биохимических сюрпризов.

В 1992 году группой Usuki была изучена первичная структура белка, являющегося тромбоцитарным фактором роста эндотелиальных клеток – PD/ECGF. При этом выяснилось, что она аналогична аминокислотной последовательности, выделенного из *E. Coli* фермента – тимидинфосфорилазы [193].

Тромбоцитарный фактор роста эндотелиальных клеток - PD/ECGF был обнаружен в 1987 году в лизате тромбоцитов. Подобно классическому фактору роста, он связывался с рецепторами клеток, влияя на активность ангиогенеза. Учитывая это, белок получил соответствующее название – PD/ECGF (Platelet Derived/ Endothelial Cell Growth Factor). Было установлено, что изучаемый белок может стимулировать синтез ДНК, рост и хемотаксис эндотелиальных клеток *in vitro* и ангиогенез *in vivo*. В 1991 году был выделен ген PD/ECGF человека, было обнаружено, что он локализован на 22 хромосоме, состоит из 10 экзонов. Промотор гена утратил характерных для эукариотов участков: «ТАТА» - инициатор транскрипции, и «ССААТ» - её терминатор [81]. Выявленная позднее идентичность первичных транскриптов PD/ECGF и ТФ, кодирующих 120 аминокислотных остатков, была подтверждена затем сходством третичной структуры, определённой методом кристаллографии, биохимическими и биофизическими свойствами фактора роста и фермента. Это позволило сделать однозначный вывод - фактор роста эндотелиоцитов тромбоцитарного происхождения является, в то же время, и ферментом метаболизма ДНК.

В 1992 году Asai et al. был выделен и описан полипептид, который ингибировал пролиферацию и синтез ДНК в глиальных клетках нейрофибромы.

Новый фактор ингибирования получил название глиостатин. Дальнейшее исследование показало, что первичная структура глиостатина идентична первичной структуре PD/ECGF [81]. Для подтверждения результатов из плацентарной ткани был выделен и очищен препарат ТФ, активность которого оценивали на культуре клеток астрцитомы крыс С6 и на культуре эндотелиальных клеток из бычьей аорты. Обнаружилось, что дозозависимые кривые ингибирования роста клеток С6 у плацентарной ТФ и глиостатина ничем не отличаются.

Таким образом, на сегодня для обозначения тимидинфосфорилазы корректным считается использование еще двух названий: тромбоцитарный фактор роста эндотелиальных клеток (PD/ECGF) и глиостатин (gliostatin).

Много фактов и гипотез появилось при изучении взаимосвязи тимидинфосфорилазной реакции и ангиогенеза. Подробное объяснение дают Brown et al., которые при изучении метаболизма ТМФ в опухолевых тканях установили, что при его распаде в некротической зоне опухоли образуются большие количества тимидина [322]. Под действием ТФ он распадается на тимин и 2-дезоксирибозо-1-фосфат. Образующаяся фосфопентоза проявляет свойства хемоаттрактанта для эндотелиальных клеток.

Позже доказали, что D-dRP в клетках может гидролизоваться щелочной фосфатазой до 2-деокси-D-рибозы (D-dR), которая в отличие от предшественника легко проходит через клеточные мембраны [322, 325]. При исследовании совместного культивирования эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVECs) и опухолевых клеток с высоким уровнем экспрессии PD/ECGF было обнаружено, что именно выделение во внешнюю среду дезоксирибозы создаёт градиент концентрации, который увеличивает хемотаксический ответ эндотелиальных клеток в 10 раз.

В 1997 году Maeda et al. предположили, что высокий уровень PD/ECGF коррелирует с риском появления метастазов в печени и лимфатической системе при карциноме желудка. Авторы обнаружили увеличение васкуляризации опухоли, что в какой-то мере могло объяснить интенсивность метастазирования.

Дальнейшие исследования опухолей различной локализации продемонстрировали контroversийные результаты. Так, положительная корреляция между уровнем экспрессии PD/ECGF и увеличением микрососудистой плотности была обнаружена при изучении нескольких клеточных линий рака поджелудочной железы. Полученные данные позволили говорить о высокой прогностической ценности определения мРНК тимидинфосфорилазы, как в вышеописанном случае, так при раке шейки матки [314, 323]. Сравнительное исследование экспрессии ТФ в макрофагах и клетках опухоли показало её увеличение особенно в макрофагах [277]. Таким образом, увеличение экспрессии ТФ в клетках опухоли или в макрофагах ассоциируется с плотностью микрососудов [157].

Изучение образцов опухолевых тканей прямой кишки, полученных в результате хирургического вмешательства, хотя и подтвердило наличие корреляции между PD/ECGF и микрососудистой плотностью, но не обнаружило выраженной прогностической ценности определения экспрессии фермента [36]. По мнению авторов работы, только уровень экспрессии фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) может быть использован для прогнозирования злокачественного роста клеток первичного колоректального рака [326].

Изучение взаимосвязи между уровнем экспрессии PD/ECGF, плотностью микрососудистой сети в опухолевой ткани и прогнозом течения заболевания позволило сделать вывод об однозначно негативном прогнозе при высоких значениях PD/ECGF независимо от микрососудистой плотности. Было предположено, что ТФ влияет на рост злокачественных образований по механизму, несвязанному напрямую с ангиогенезом. Отсюда логично вытекала гипотеза о блокировании ТФ процессов апоптоза.

Установлено, что *in vivo* возрастание экспрессии TP/PD-ECGF увеличивает плотность микрососудистой сети и ингибирует апоптоз клеток колоректальной карциномы [322]. Похожие данные были получены и при раке желудка, когда возрастание TP/PD-ECGF коррелировало с ростом микрососудистой плотности и снижением апоптоза. Таким образом, интенсивность апоптоза уменьшается в

хорошо васкуляризированной опухоли. Однако есть исключения - подобная корреляция индекса апоптоза и экспрессии данного белка отсутствовала в образцах ткани, полученных при резекции злокачественных новообразований эндометрия.

Доказано, что образующиеся в реакции ТФ метаболиты: тимин и D-dR оказывают влияние на апоптоз. Дезоксирибоза угнетает экспрессию фактора, индуцированного гипоксией HIF-1 α , который стимулирует процессы «самоубийства» клетки одновременно по нескольким направлениям [322]. Так, добавление D-dR к культуре клеток лейкемии человека HL-60 предотвращало снижение уровня антиапоптозных белков Bcl-2 и Bcl-xL. Одновременно был выявлен блокирующий эффект данной пентозы на активацию каспаз 3 и 9, высвобождение цитохрома c из митохондрий. При изучении роли D-dR при гипоксии в культуре Jurkat-клеток лейкемии человека, трансфицированных ДНК ТФ, кроме уже описанных эффектов дополнительно было обнаружено снижение экспрессии проапоптозного фактора - белка BNIP3 [81].

Опубликованы данные об антиапоптотическом эффекте ТФ, не связанном с катализируемой реакцией. Так при обработке моноклональными антителами анти-CD95 культур KB-линии клеток эпидермоидной карциномы Fas-зависимый апоптоз был статистически менее выражен в линии клеток, трансфицированной ДНК ТФ. Обработка этих же клеточных культур ингибитором ТФ типирацилом (TPI), а также добавление в среду культивирования тимидина, тимина и D-dR не оказывало существенного влияния на выживаемость клеток при Fas-индуцированном апоптозе.

Под действием ТФ образуются фосфорилированные сахара потенциальные агенты для образования гликозилированных протеинов, стимулирующих появление свободных радикалов, активных форм кислорода (АФК) и продуктов ПОЛ [98]. Конечные продукты гликозилирования (advanced glycation end products (AGEs)) затем связываются со специфическими рецепторами и запускают в клетках целый каскад процессов, ассоциированных с оксидативным стрессом и канцерогенезом [129, 130].

Brown et al. выявили, что при добавлении тимидина к культуре клеток карциномы мочевого пузыря наблюдалось повышение экспрессии маркера оксидативного стресса гемоксигеназы-1 (НО-1) только в линии, трансфицированной вектором PD/ECGF [277]. Добавление тимина к этой же культуре приводило к снижению экспрессии НО-1, поскольку тимин связывался с D-dR под действием ТФ. Полученные данные свидетельствуют, что одной из причин оксидативного стресса является повышенный уровень клеточной D-dR. Тут же было обнаружено, что распад тимидина в клетках карциномы активирует секрецию интерлейкина ИЛ-8, фактора роста сосудов VEGF, а также матриксной металлопротеиназы-3 [322].

Изучение культур KB-линии клеток эпидермоидной карциномы, EJ-клеток рака мочевого пузыря и Yumoto-клеток рака шейки матки выявило, что повышение ферментативной активности ТФ в этих клетках усиливает образование ИЛ-8, экспрессия гена которого стимулируется АФК [336]. Важно отметить, что нарастание уровня АФК и свободных радикалов протекало на фоне снижения синтеза глутатиона, необходимого для их обезвреживания, во всех вышеперечисленных культурах опухолевых клеток.

Дальнейшее исследование культур KB-линии клеток эпидермоидной карциномы и Yumoto - клеток рака шейки матки показало, что образующаяся в результате катаболизма тимидина дезоксирибоза включается в пентозофосфатный путь (ПФП) [322]. Одним из продуктов ПФП является NADPH_2 , который подвергается окислению NADPH -оксидазой, в результате чего усиливается образование АФК и оксидативный стресс [196, 299].

Таким образом, ТФ полифункциональный белок, чья активность связана со стимуляцией пролиферации, ангиогенеза, метастазирования при одновременном подавлении механизмов апоптоза. Таким образом, ТФ может быть вовлечён в формирование агрессивного фенотипа карциномами.

В последние годы все чаще в клинической онкологии используется исследование сравнительной активности ТФ при диагностике и лечении рака молочной железы [314].

Разрабатываются ферментативные тесты определения экспрессии PD/ECGF на экспериментальных моделях при химиотерапевтическом лечении злокачественного роста клеток с использованием препаратов 5-FU [326], поскольку фермент играет существенную роль в превращении фторпиримидинов в активный фторурацил [301].

Механизм регуляции экспрессии ТФ окончательно не выяснен. Установлено, что ряд воспалительных цитокинов, таких как α -, β - и γ -интерфероны, фактор некроза опухоли- α , интерлейкин IL-1 увеличивают экспрессию ТФ в культуре моноцитов человека [271]. В некоторых работах доказано участие в распознавании промотора и связывании с РНК-полимеразой транскрипционного фактора из семейства Sp1 [81].

Обработка γ -интерфероном культуры моноцитов человека U937 выявила несколько другой механизм индукции. После активации STAT-белков в ядре происходило связывание транскрипционного фактора с последовательностью GAS (γ -activated sequence-like element), которая в свою очередь и включала экспрессию PD/ECGF.

В 1957 Heidelberger et al. было предложено использовать фторпиримидины в качестве нового класса противоопухолевых препаратов. Было установлено, что основным представителем данного класса – 5-фторурацил является конкурентным ингибитором тимидилатсинтазы (ТС). Снижение активности ТС приводит к истощению пула тимидилатов, и как следствие, к замедлению синтеза ДНК.

В течение последующих десятилетий проводились многочисленные экспериментальные и клинические исследования эффективности действия 5-FU и его производных при лечении злокачественного роста [188]. Было обнаружено, что противоопухолевые эффекты фторпиримидинов зависят от метаболической активации, а также - от типа клеток. Было доказано, что в опухолевых тканях образование 5-FU из 5'-дезоксидифторуридина и тегафура происходит при непосредственном участии ТФ [81, 215]

В 1993 году были опубликованы результаты работы Haraguchi et al. по сравнению восприимчивости к препаратам 5-FU разных клонов КВ-линии клеток

эпидермальной карциномы человека [81]. Оказалось, что линии клеток, трансфицированные геном PD/ECGF, были более чувствительны к действию 5'-дезоксидезокси-5-фторуридина и тегафура.

Другое направление исследований было связано с поиском модулирующих агентов, которые должны усиливать действие фторпиримидинов. Было обнаружено, что цитотоксический эффект 5-FU на клетки карциномы прямой кишки значительно увеличивается, если использовать препараты в комбинации с α - и β -интерферонами.

В 1998 году Schwartz et al. продемонстрировал, что трансфицированные клетки карциномы толстой кишки человека (HT-29) с высоким уровнем экспрессии ТФ были более чувствительны к 5-FU вследствие его превращения во 5-F-дУМФ под действием фермента [312]. Для сравнения дикий тип клеток инкубировали вместе с α -интерфероном и обнаружили, что восприимчивость этой культуры к 5-FU так же возрастала. Кроме того, в культуре клеток дикого типа после обработки α -интерфероном определялась активность ТФ близкая по значениям с активностью ТФ в трансфицированных клетках. Следовательно, было доказано, что интерфероны повышают цитотоксический эффект препаратов 5-FU за счет индукции экспрессии гена PD/ECGF [201].

В клинической практике в России большинство химиотерапевтических режимов при лечении рака кишечника включает в себя как 5-FU, так и его препарат-предшественник капецитабин. Преимущество капецитабина (N^4 -пентилоксикарбонил-5'-дезоксидезокси-5-фторцитидин) в том, что он назначается перорально [188]. Превращение в активный 5-FU происходит в три этапа: 1-й и 2-й происходят при участии печеночных ферментов, для финальной активации необходимо ТФ [81, 172]. В опухолях уровень ТФ на порядок выше, чем в прилегающих здоровых тканях, что способствует накоплению 5-FU в злокачественных новообразованиях и снижает его цитотоксичность для нормальных клеток.

Изучение производных пиримидина с антивирусным и противоопухолевым действием показало, что их эффективность во многом зависела от

тимидинфосфорилазной активности. ТФ имеет низкую субстратную специфичность, синтетические аналоги пиримидинов вступали в реакции катаболизма при ее участии. В 1998 году Balzarini был предложен первый пуриновый ингибитор ТФ – 7-деазаксантин (пирроло[2,3-d]пиримидин-4,6-диол) [193, 306]. Препарат был смоделирован на основе данных о пространственной структуре активного центра фермента. Сейчас данное вещество считается референтным при исследовании новосинтезированных ингибиторов [144, 318].

Не прекращается работа над созданием ингибиторов ТФ – производных пиримидина. В 2000 году был идентифицирован типирацил (ТPI, 5-хлоро-6-[1-(2-иминопирролидинил)метил]урацил гидрохлорид), как самый мощный из известных на данный момент ингибиторов ТФ. Дальнейшее изучение выявило, что следствием высокой эффективности типирацила является повышение биодоступности некоторых давно известных пиримидиновых противоопухолевых антиметаболитов, в частности – трифлуридина (ТFT, 2'-дезоксид-5-(трифторметил)уридин). Для клинических испытаний был предложен препарат TAS-102, представляющий из себя комбинацию трифлуридина и типирацила в соотношении 2:1. Препарат прошел доклинические и клинические испытания, и сейчас внедряется на фармацевтических рынках во многих странах для лечения неоперабельного метастатического рака желудка и колоректального рака [235].

1.4. Активность металлоферментов катаболизма аденозина лимитирует его регуляторные эффекты

Аденозиндезаминаза (АДА; КФ 3.5.4.4) – специфический, ключевой фермент катаболизма регуляторной молекулы аденозина. Роль АДА в регуляции обмена и функций клеток, в том числе в процессах пролиферации, секреции провоспалительных цитокинов, регуляции функции Т-лимфоцитов, трудно переоценить [168, 169]. Это всё обусловлено её ферментативными эффектами, контролирующими клеточные концентрации аденозина [115, 120, 146].

Рассмотрим эффекты аденозина, которые он, как регуляторная молекула реализует как в норме, так и при патологии, например, смене оксигенации при гипоксии, как иммуномодулятор при воспалении, а также и при канцерогенезе [28, 126]. К тому же, активность самой аденозиндезаминазы и её особенности активно исследуются при раках различных локализаций [27, 28, 112, 117, 118].

Аденозин обладает несколькими физиологическими эффектами благодаря взаимодействию с четырьмя известными его рецепторами (A_1 , A_{2A} , A_{2B} , A_3) [104, 106, 175]. При этом его механизм передачи сигнала в чувствительную клетку подобен гормональным классическим каскадам, что ещё раз доказывает его роль регуляторной молекулы. В частности, было описано, что после образования комплекса с рецепторами A_1 или A_3 , последние активируют белки-трансдукторы G_i , которые ингибируют активность аденилатциклазы. Наоборот, при формировании комплекса с рецепторами A_{2A} , A_{2B} активируются G_s трансдукторы, активирующие аденилатциклазу, то есть увеличивается продукция вторичного мессенджера ряда гормонов – циклического АМФ (цАМФ), реализующего иммуносупрессивный эффект аденозина. Кроме того, уникальность механизмов клеточного ответа, модулируемых аденозин-рецепторными комплексами также распространяется путем других гормон-чувствительных эффекторных ферментов, а именно, фосфолипаз C, D, A_2 , гуанилатциклаз, кальций-кальмодулиновых комплексов. Также интересными, на наш взгляд, эффектами, значимыми для канцерогенеза, являются стимулирующие эффекты аденозина, оказываемые им на митоген-активируемые протеинкиназы (mitogen-activated protein kinases, MAPK) [125]. Разнообразие сигнальных путей и обеспечивает развитие многочисленных регуляторных эффектов аденозина [124]. Таким образом, рецепторы аденозина действуют как "сенсоры", а внеклеточный аденозин действует как "гормон", регулирующий обменные процессы и функции чувствительных клеток в локальной тканевой среде [126, 167, 239].

Концентрация аденозина регулируется посредством его катаболизма АДА и фосфорилирования аденозинкиназой [119, 122, 233]. Известно, что при дефиците АДА на более высоких концентрациях аденозина активность аденозинкиназы

снижается. В результате, из-за низкой активности АДА уровни аденозина повышаются со 100-300 нМ (наномолей) до 10 мкМ (микромолей) (т.е в среднем в 1000 раз!) [128]. Это ведёт к повышению секреции аденозина и к гиперстимуляции его рецепторов по паракринному или аутокринному пути.

Низкая активность АДА приводит также к накоплению дезоксиаденозина, продукта деградации ДНК, который в отличие от аденозина не играет регуляторной роли в физиологических условиях, но отвечает за нарастание уровней дезоксиАТФ (deoxyATP). Тот, в свою очередь, ингибирует синтез ДНК и активирует апоптоз, следовательно, дезоксиаденозин также может оказывать свои регуляторные эффекты, реализуемые им в патогенезе ряда заболеваний, т.ч. иммуносупрессивное действие [127].

Известно, что быстрорастущая опухоль может испытывать гипоксию из-за более медленного формирования сосудов. Также местные воспалительные процессы в тканях, а уже признан тот факт, что и эти процессы характерны для канцерогенеза, зачастую связаны с низким содержанием кислорода, то есть с гипоксией. Это ведёт к повышению внеклеточных уровней аденозина, так как в условиях гипоксии резко возрастает активность 5'-нуклеотидазы, нарабатывающей при деградации пула аденилата из АМФ, соответственно, аденозин. При этом угнетается активность аденозинкиназы [128], в целом всё это ведёт к значительному накоплению аденозина в местах повреждения тканей [200].

Действительно, 5'-нуклеотидаза - основной фермент, ответственный за внеклеточную продукцию аденозина из АМФ, играющая решающую роль в функциональной активации Т-клеток [175]. Её дефицит связан с развитием иммунодефицитных заболеваний, таких как лимфопролиферативные нарушения и системная красная волчанка. Также, и наоборот, высокие уровни экспрессии этих ферментов могут быть связаны с аутоиммунной патологией [116, 246].

Следовательно, при нормальных условиях аденозин, который непрерывно вырабатывается внутриклеточно и внеклеточно, поддерживается на низких внутриклеточных уровнях (около 100 нМ) благодаря активности, проявляемой аденозинкиназой и аденозиндезаминазой. Преимущественно взаимодействует с

высокоаффинными, имеющими высокое сродство, подтипами рецепторов A_1 и A_{2a} [207]. При дефиците АДА или при гипоксических, ишемических или воспалительных состояниях внутриклеточная продукция аденозина увеличивается при очень высоких микромолярных концентрациях и транспортируется через клеточные мембраны специфическими агентами, что в конечном итоге приводит к поэтапной активации всех аденозиновых рецепторов, включая низкоаффинные рецепторы, обладающие чувствительностью исключительно к высоким концентрациям аденозина, A_{2B} и A_3 -подтипы [209].

В настоящее время в биологии клетки, аденозин классифицирован как регуляторный "ответный метаболит" вследствие его способности опосредовать цикл ауторегуляции, функция которого заключается в защите органов от повреждений после инициирующих стрессовых факторов [113, 123]. Существуют различные механизмы, с помощью которых активация аденозиновых рецепторов защищает органы. Во-первых, он уменьшает потребность тканей в энергии, во-вторых, он может увеличить поступление кислорода и питательных веществ за счет расширения сосудов, и, наконец, он регулирует избыточный иммунный ответ на вредные внешние агенты [251]. Поскольку базальный уровень аденозина оказывает лишь незначительное влияние на иммунный ответ, ишемические и воспалительные состояния представляют собой сценарии, при которых уровень аденозина становится достаточно высоким, чтобы оказывать значительное иммуномодулирующее и, преимущественно, иммуносупрессивное действие [103, 116, 202, 213].

Научные публикации, касающиеся исследований *in vitro* и *in vivo*, ясно показывают регуляторные эффекты аденозина в качестве иммуномодулятора [202, 226]. Позволим себе прокомментировать их реализацию, так как это удобная модель для иллюстрации эффектов аденозина, передаваемых в клетках через активацию ряда сигнальных каскадов, важных для канцерогенеза и активации онкобелков, например, через регуляцию активности MAPK или фактора транскрипции NF-каппа В.

Итак, известно, что активация Т-лимфоцитов начинается с распознавания антигена рецептором антигена Т-клеток и корецепторами CD4⁺ или CD8⁺, вовлеченных в инициацию сигнальных каскадов в комплексах гистосовместимости I и II, приводящих к секреции цитокинов, клеточной цитотоксичности и пролиферации Т-клеток [210, 248].

. Иммуносупрессивное действие аденозина на цитотоксическое действие Т-лимфоцитов (Т-киллеров; cytotoxic T lymphocyte, CTL) может быть объяснено активацией рецепторов A_{2A}, за которой следует устойчивое повышение уровня цАМФ, что, в свою очередь, противодействует передаче сигналов, запускаемых рецепторами Т-клеток (T cells receptor, TCR). В частности, аденозин модулирует TCR-опосредованную продукцию интерлейкина-2 (interleukin, IL-2), экспрессию CD25 и CD69, экзоцитоз гранул, активацию лиганда Fas и клеточную пролиферацию посредством взаимодействия с рецепторами A_{2A}. Преобладающая экспрессия рецепторов A_{2A}, установленная в функциональных анализах с использованием селективных агонистов и антагонистов этих рецепторов, также была подтверждена рядом последующих исследований [132]. Роль этого типа рецепторов аденозина в регуляции иммунного ответа была исследована путем определения уровней его экспрессии в различных популяциях функциональных лимфоцитов [109]. Было обнаружено, что уровни экспрессии рецепторов A_{2A} значительно выше среди Т-клеток, чем В-клеток. Также отмечено, что опосредованная аденозин-рецепторным комплексом регуляция в CD4⁺ интенсивности процессов транскрипции мРНК ведет к дозозависимому ингибированию продукции TCR-опосредованного гамма-интерферона (IFN-γ), который является наиболее важной эффекторной молекулой [109, 141].

Ещё одной иммуномодулирующей молекулой является IL-2, напомним, что его продукцию регулирует аденозин. Он имеет решающее значение для пролиферации активированных Т-клеток. Связываясь со своим рецептором, IL-2 передает сигнал, в распространении которого вовлечены такие важные для формирования агрессивного фенотипа опухоли и передачи пролиферативного сигнала пути как Jak1, Jak3 и STAT5. Активация Jak1 и Jak3 приводит к

фосфорилированию остатков тирозина на рецепторе IL-2. Это говорит о том, что, как и у многочисленных факторов роста, у интерлейкина-2 имеется тирозинкиназного типа рецептор. Иницируемый IL-2 сигнальный путь генерирует два основных пролиферативных сигнала. Один из этих сигналов опосредуется адаптерным белком Shc и активирует сигнальные пути p42/p44 MAPK и фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K). Второй пролиферативный сигнал, трансдуцируемый комплексом рецепторов IL-2, включает транскрипционный фактор STAT5, который после фосфорилирования транслоцируется в ядро для контроля экспрессии генов [107, 109, 125].

Аденозин, активируя рецепторы A_{2A} и A_{2B}, ингибирует IL-2-зависимую пролиферацию путем ингибирования фосфорилирования STAT5. Поскольку Т-клетки играют ключевую роль в противоопухолевом иммунитете и учитывая, что концентрация аденозина может быть повышена в микроокружении солидных опухолей, можно ожидать, что вызванный аденозином дефект в стимулируемой IL- пролиферативной передаче сигналов приведет к дефектному ответу Т-лимфоцитов у онкологических больных и, как правило, к нарушению противоопухолевого иммунитета [103, 105, 106].

Также было исследовано вызываемое аденозином нарушение пролиферации в В-лимфоцитах [145]. В этих клетках аденозин ингибирует активацию онкобелка - транскрипционного фактора NF-каппа В (NF-κB), активируя свои рецепторы на поверхности В-клеток (В cells receptor, BCR) [125, 129]. Его стимулы, которые запускают формирование 3',5'-циклического аденозинмонофосфата (цАМФ), усиливают, таким образом, его действие по активации чувствительной к цАМФ протеинкиназы А. Её эффекты по фосфорилированию ряда белков, способны избирательно подавлять активность NF-κB. Прежде всего за счет цАМФ зависимого фосфорилирования и последующей активации ингибитора этого фактора транскрипции. Это говорит о том, что сигналы, опосредованные аденозином, представляют собой важный шаг в процессе принятия молекулярных решений, контролирующих воспаление и местные иммунные реакции [225]. Поскольку известно, что аденозин может влиять на дисфункцию В-клеток при

дефиците АДА [222, 232], то описанный выше цАМФ зависимый каскад и может объяснить дефектную пролиферацию и активацию В-клеток при дефиците АДА [103, 132].

Убедительные доказательства связи между рецепторами аденозина и функциональной активностью NF-κB получены также в исследованиях *in vivo*, проведенных на мышах с нокаутом рецептора аденозина A_{2A}. Липополисахарид, введенный этим животным, индуцировал более сильную воспалительную реакцию и более высокое связывание NF-κB с ядерной ДНК и, следовательно, более интенсивную транскрипцию генов цитокинов в макрофагах [140].

Следовательно, роль АДА сопряжена с регуляторными эффектами аденозина [178, 213, 214]. Помимо описанных выше некоторых среди многочисленных сигнальных путей, инициируемых аденозином через его рецепторы, также известно непосредственное ингибирующее действие дезоксиаденозина (deoxyadenosine, dAdo) на регуляторные ферменты синтеза «de novo» пиримидиновых нуклеотидов. В результате синтез предшественников ДНК пиримидиновой группы подавляется, интенсивность репликации снижается. Более того, вследствие низкой активности АДА возможно не только накопление dAdo, но и диспропорционально синтезу других нуклеозидтрифосфатов, формирование dАТФ. Причем и dAdo, и dАТФ являются аллостерическими ингибиторами рибонуклеозидредуктазы, которая, как известно, обеспечивает непосредственную трансформацию ЦДФ, ГДФ, УДФ в соответствующие дезоксирибонуклеозиддифосфаты. Причем, известно, о дальнейшей необходимой трансформации dУДФ в dУМФ для формирования фонда dТМФ, лимитирующего скорость синтеза ДНК, в тимидилатсинтазной реакции. Таким образом, повышение уровней аденозина в опухоли не всегда связано с дисфункцией иммунных клеток [165, 178]. Парадоксально, что при этом он должен оказывать антипролиферативные эффекты на опухоль. Следовательно, нельзя формировать однозначное мнение относительно опухолевой продукции аденозина, необходимо учитывать его многочисленные эффекты. Однако, нет сомнений, что система обмена аденозина вовлечена в процессы канцерогенеза от болезней кроветворной

ткани [307], до интестинального рака [306]. Также важно уточнить особенности активности в опухоли аденозиндезаминазы, наиболее эффективно контролирующей концентрацию нуклеозида [213, 214].

При канцерогенезе её биологическая роль не ограничивается лишь вовлечённостью в метаболизм аденозин, ограничивающие его сигналинг эффекты [162]. АДА вместе с CD73 вовлечена в процессы метастазирования, пролиферации, в реализацию программ эпителиально-мезенхиального перехода (ЭМП) [142, 162, 164, 199]. Для неё описано решающее значение в реализации этапов канцерогенеза, значимость экспрессии опухолью определённого вида изоферментов [195, 217]. Описана значимость для фрагментации цитокератина 19, участие в метаболизме стволовых клеток глиобластомы, следовательно, её непосредственная вовлечённость в реализацию ЭМП [110, 111, 164, 229]. Является маркером CD26, определяющим внеклеточную концентрацию аденозина [150, 239], а также маркером эндотелиальной дисфункции [121]. На значимость особенностей опухолевой активности АДА для канцерогенеза свидетельствуют подавляющие рост солидных опухолей препараты, таргетирующие АДА, подавляющие её активность [303, 304].

Поэтому актуально проследить не только эффекты, сопряженные с накоплением аденозина, в том числе по причине низкой активности АДА, но проследить обратную ситуацию, что же будет происходить местно в ткани в результате повышения активности АДА. Описанные выше антипролиферативные эффекты аденозина и дезоксиаденозина хорошо согласуются с известным мнением о том, что для опухолевой ткани, наоборот, характерна более высокая активность АДА. В рамках настоящей работы также предпринята попытка уточнить особенности активности фермента в опухолевой ткани по сравнению с нетрансформированными тканями края резекции. Помимо тканей также исследованы особенности активности АДА в клетках крови, в частности в эритроцитах и тромбоцитах. Последнее обусловлено регуляторными эффектами аденозина в эритроцитах на уровне 2,3-дифосфоглицерата.

Данный метаболит формируется эритроцитом как «вторичный» продукт

гликолиза. Однако его роль в регуляции газообмена между эритроцитами и тканями трудно переоценить. Поскольку сродство к гемоглобину у 2,3-дифосфоглицерата (2,3-ДФГ) выше, чем у кислорода, его продукция критически важна для адекватного газообмена [261]. Хотя многие ферменты метаболизма нуклеотидов присутствуют в эритроцитах, одной из наиболее значимых для их функционирования является именно аденозиндезаминаза плазмы крови [119, 156]. Поскольку именно её активность определит возможность индукции аденозином формирования 2,3-ДФГ, которую аденозин реализует за счёт связывания со своим A_{2B} рецептором, экспонируемым на поверхности мембран эритроцитов [209, 210]. Универсальным является распространение сигнала по описанному цАМФ зависимому каскаду, в результате фосфорилирования протеинкиназой А пируваткиназы гликолиза, последняя теряет свою активность, что способствует большему потреблению 1,3-дифосфоглицерата, формируемому в предыдущих реакциях, в реакцию его изомеризации, сопровождающуюся формированием 2,3-ДФГ [261]. При этом интересно мнение рассматривать эритроцит в качестве переносчика своих «терапевтических» энзимов, учитывая отсутствие в нём систем для синтеза белка [147].

Рассматривая активность аденозиндезаминазы, нельзя не упомянуть о том, что она является типичным металлоферментом, содержащим ион цинка. Поскольку цинк относится к металлам переходной группы, то окисляясь, может менять свою валентность. Следует предположить, что активность АДА может зависеть от интенсивности процессов свободно-радикального окисления, быть чувствительной мишенью к окислительной модификации белков (ОМБ). К тому же известно о взаимосвязи ОМБ и развитии апоптоза в лимфоцитах [79]. Поэтому необходимо в последующих подразделах уточнить роль ОМБ для канцерогенеза. В этом подразделе также необходимо упомянуть, что АДА, вовлекая аденозин или дезоксиаденозин в путь их деградации, неизбежно может способствовать формированию конечного продукта их распада – мочевой кислоты. Последняя будет являться продуктом завершающих реакций катаболизма аденилата, формируясь в двух последовательных превращениях сначала гипоксантина, а

далее ксантина, катализируемых одним и тем же металлоферментом – ксантиноксидазой.

Это также может быть сопряжено с повышением продукции активных метаболитов кислорода, с усилением процессов свободно-радикального окисления. Проследим особенности катализа реакций, завершающих катаболизм аденозина и дезоксиаденозина.

Ксантиноксидаза (или ксантиндегидрогеназа) (КФ 1.2.3.2) – металлофермент, представленный во всех клетках и тканях организма.

Ксантиндегидрогеназа/оксидаза (ген XDH), являясь гомодимером, содержит 4 железосерных кластера, две молекулы флавинадениндинуклеотида (ФАД) и два молибдоптерина, содержащих молибден [46]. Фермент может существовать в двух формах: D-форма - дегидрогеназная; O-форма - оксидазная. Формы отличаются друг от друга по способности передавать 2 атома водорода. D-форма передает водород на главную дыхательную цепь митохондриального окисления, а O-форма - сразу на кислород с образованием супероксидного аниона – радикала кислорода. По сути это две функциональные формы одного и того же фермента, их структура полностью совпадает [208].

В тканях организма этот белок представлен, в основном, в форме мембранносвязанной ксантиндегидрогеназы (КДГ, D-форма), катализирующей превращение гипоксантина и ксантина в мочевую кислоту, восстанавливающей в ходе реакции НАД⁺. То есть в физиологических условиях в кишечнике, почках, легких, селезенке и печени большая часть фермента (85-95%) находится в дегидрогеназной форме и только 15 – 5% в оксидазной форме, использующей в качестве акцептора электронов не пиридиновый нуклеотид, а молекулярный кислород [46].

Механизм действия КДГ относительно прост по сравнению с механизмом действия ксантиноксидазы. Происходит это следующим образом: молибден отдает электрон, разрывает связь между N и C в положениях 2 и 3 или 7 и 8 в структуре пуринового ядра субстрата с присоединением электрона к азоту. Активированный субстрат легко присоединяет воду, вода диссоциирует на H⁺ и

OH^- , после чего протон присоединяется к азоту, а молибден связывается с гидроксил-анионом, отнимает у него утраченный электрон и гидроксилирует субстрат, передавая последнему гидроксильный радикал. Таким образом, изначально субстрат гидратируется. Образовавшийся гидрат субстрата легко дегидрируется при участии ФАД, который тут же окисляется, передавая электроны и протоны на НАД^+ , являющийся конечным акцептором электронов и протонов в данной реакции. Принципиально важно отметить, что в случае с ксантиндегидрогеназой железосерные центры не функционируют и супероксид не образуется. В связи с этим реакция идёт по более медленному дегидрогеназному пути через стадию гидратации субстрата.

Механизм действия ксантиноксидазы (КСО, О-форма) достаточно сложен. Первоначально происходит окисление железа в составе железосерного центра фермента с образованием супероксидного радикала. ФАД дегидрирует субстрат, превращаясь в активный семихинон, способный дегидрировать даже воду с образованием ФАДН_2 , немедленно восстанавливающего супероксид в H_2O_2 . Оставшийся у ФАД электрон может восстановить окислившийся железосерный центр. Два гидроксила, образовавшиеся в результате дегидрирования воды на двух мономерах ксантиноксидазы, конденсируются в молекулу H_2O_2 . Отдавая электрон, молибден расщепляет перекись водорода на $\text{OH}\cdot$ и OH^- , изменяя при этом свою валентность. Возбужденный молибден связывается с гидроксил-анионом, отнимает у него утраченный электрон и гидроксилирует субстрат, передавая последнему гидроксильный радикал. Итак, в случае оксидазной реакции образуется супероксид, гидратации субстрата не происходит и субстрат немедленно подвергается дегидрированию.

Отметим, что фермент катализирующий завершающие стадии катаболизма пуринов, в том числе и аденозина, легко окисляется. Причиной этого является наличие в его структуре металла переменной валентности – железа. Переход в окисленное, модифицированное состояние приводит к неизбежной перестройке его функции. В результате вместо ксантиндегидрогеназной активности фермент начинает реализовывать оксидазную активность.

За счет параллельного формирования супероксидного аниона наряду с ксантином, а затем мочевой кислотой, фермент считают «одним из главных триггерных ферментов перекисного окисления» [339]. Наряду с дыхательными цепями митохондрий [52, 293], а также НАДФ-зависимыми оксидазами, ксантиноксидазы (КСО) являются третьим источником супероксидного радикала [46]. В последующих подразделах будет рассмотрена дальнейшая дисмутация супероксидного аниона, в том числе в реакции, катализируемой супероксиддисмутазой, а также взаимосвязи данных процессов с формированием агрессивных форм эпителиальных опухолей.

Ей приписывают роль промотора оксидативного стресса в опухоли, индуктора специфического для клеток карциномы апоптоза [340]. При этом есть указания на участие КСО в формировании агрессивного фенотипа опухоли, так как её ингибиторы подавляют миграцию и процессы метастазирования [310]. Поэтому в настоящее время ингибиторы КСО относят к веществам с противоопухолевой активностью [135, 184, 187, 296, 297].

Процесс окислительной модификации ксантиндегидрогеназы в ксантиноксидазную форму становится необратимым за счет формирования сульфидных связей между остатками цистеина Cys 535 Cys 992 [КСО29-ок-Стр, 2017]. Установлено, что на фоне нарастания активности ксантиноксидазы увеличиваются уровни гидроперекисей жирных кислот, то есть усиливаются процессы перекисного окисления липидов [297]. Причем было выявлено, что при двукратном нарастании активности КСО, уровни гидроперекисей жирных кислот нарастают втрое. Также имеются указания на то, что экспрессия КСО может стимулироваться при гипоксии, а также некоторыми провоспалительными цитокинами (IL-1 β , IL-6, TNF- α). Таким образом, окислительная модификация белков (ОМБ) ведет к модификации КДГ и трансформации в КСО, что сопровождается повышением уровней активных форм кислорода (АФК) в клетке и усилением процессов свободно-радикального окисления [135, 297].

Это связано с особенностями оксидазного типа катализа и с формированием АФК непосредственно в результате реакции. В то же время, КСО является

железосодержащим ферментом и участвует в железозависимом перекисном окислении липидов [208]. Однако факторы, которые регулируют активацию КСО еще предстоит выяснить. Peng Ji. и соавт. было показано, что железо увеличивает как экспрессию мРНК, так и активность фермента КСО. Установленная определенная синергия в эффектах металла и чувствительного фермента может усиливать прооксидантные процессы в тканях.

Рассмотрим некоторые особенности процессов свободно-радикального окисления при опухолевом росте.

1.5. Некоторые особенности протекания прооксидантных процессов при опухолевом росте, роль металлов переменной валентности

Окислительный стресс (превышение продукции активных форм кислорода и азота над их инактивацией антиоксидантами) является важным патогенетическим фактором при опухолевой прогрессии [79]. Иницирующим звеном свободно-радикальных реакций является, как правило, образование в ходе оксигеназных реакций так называемых активных метаболитов кислорода:

- синглетного ($O^{\bullet}$);
- супероксидного ($O_2^{\bullet-}$);
- гидроксильного радикала ($OH^{\bullet}$);
- нитритрадикала ($NO^{\bullet}$);
- пероксинитритрадикала ($ONOO^{\bullet}$);
- пероксида водорода (H_2O_2).

Это активные формы кислорода отличает высокая реакционная способность, а также роль мессенджеров в реализации клеточных программ, возрастающая в условиях оксидативного стресса [1]. Причём наиболее активным радикалом кислорода, обладающим наиболее повреждающим действием является гидроксильный радикал [64].

Учитывая тот факт, что наиболее стабильной и долгоживущей (несколько секунд, в отличие от остальных) является H_2O_2 , то из всех АФК преимущественно

пероксид водорода участник сигналинга. Также, H_2O_2 растворяется в липидах и, ввиду отсутствия заряда, может легко проникать через мембраны [75], поэтому есть основания полагать, что именно перекись водорода обеспечивает межклеточную и внутриклеточную сигнализацию.

Указывая в предыдущих подразделах на инициирующую различные сигнальные пути роль АФК, в частности пероксида водорода, а также уточняя эффекты аденозина на иммунные клетки, нельзя не упомянуть о значимом для модулирования иммунного ответа В-лимфоцитов сигнального пути, запускаемого ядерным фактором транскрипции каппа В (nuclear factor κ -light-chain-enhancer of activated B cells, nuclear kappa B factor, NF- κ B)

Известно, что некоторые цитокины активизируют сигнальный путь NF- κ B, при этом ингибирующая его субъединица (I κ B) фосфорилируется под действием киназы ИКК (I κ B-киназа), что приводит к протеолитической деградации I κ B. При этом NF- κ B высвобождается от ингибирующего комплекса, транслоцируется в ядро и активирует транскрипцию контролируемых генов [2]. Подобный эффект установлен и для пероксида водорода. Так, экзогенный H_2O_2 вызывает фосфорилирование Tyr42 и других остатков тирозина в молекуле I κ B и соответственно деградацию I κ B и активацию NF- κ B.

Активация пути NF- κ B – обязательно при прогрессии опухоли, фактор транскрипции NF κ B является ключевым участником ответа клетки на стресс, повреждение и воспаление [25].

Учитывая тот факт, что транскрипционные факторы NF- κ B представляют собой многочисленное семейство – оно состоит из 5 белков: p65 (RelA), RelB (RelB), c-Rel (Rel), p105/p50 (NF κ B1) и p100/p52 (NF κ B2), образующих 15 комбинаций димеров (фактор NF- κ B проявляет активность только в димерной форме), то это мощные регуляторы процессов жизнедеятельности клетки. К тому же активный NF- κ B способствует редокс-активации сигнальных путей: PI3K/PTEN/Akt и NIK/IKK [49, 338].

Безусловно, характеризуя биологические эффекты АФК, необходимо рассмотреть системы их детоксикации, т.е. компоненты антиоксидантной

системы. Прежде всего, ферменты-антиоксиданты, поскольку их считают более эффективными по своей способности нейтрализовать активные формы кислорода по сравнению с низкомолекулярными антиоксидантами [25].

К ферментативному звену относят супероксиддисмутазу (СОД), каталазу, глутатионпероксидазу (ГПО), семейство глутатион-S-трансфераз и глутатионредуктазу, обеспечивающую регенерацию субстрата для ГПО, пероксиредоксины [1, 72].

Хотя при патологии увеличение продукции свободных радикалов стимулирует активность антиоксидантной системы, ее активация не всегда адекватна, во многом это зависит от так называемого тиол-дисульфидного соотношения [4]. Согласно Орлову Д. С. и соавт., редокс состояние тиоловых групп в составе белков крайне важно для фолдинга и поддержания структуры белка [32]. Причем, если полная утилизация перекиси водорода становится невозможной, то в конечном счете равновесие смещается в сторону усиленной генерации активных форм кислорода, что и проявляется в виде увеличенного образования карбонильных соединений, провоцирующих вслед за окислительным стрессом ещё и так называемый карбонильный [5, 67].

Супероксиддисмутаза (СОД, КФ 1.15.1.1) – фермент, катализирует дисмутацию супероксиданиона в перекись водорода, избыток которой подавляет процесс. Активность регулируется специфической протеазой посредством ограниченного протеолиза. Существует несколько изоферментных форм СОД: медь-, цинк-, марганец-зависимые супероксиддисмутазы. Медь- и цинксодержащие СОД локализованы в цитоплазме и межмембранном пространстве митохондрий, чувствительных к цианидам. Марганецсодержащая СОД цианрезистентна и локализована в матриксе митохондрий. Активность СОД индуцируется при усилении генерации активных форм кислорода, но не всегда это может предотвратить развитие окислительного стресса, так как продукт СОД - перекись водорода - так же активный окислитель и легко диффундирует через мембраны клеток. Она в свою очередь должна быть разрушена ГПО или каталазой [8, 9]. В присутствии ионов переходных металлов (например, Fe^{2+})

перекись водорода может формировать высокоактивный $\text{OH}^\bullet$ -радикал [77]. При низких концентрациях перекиси водорода большую роль в ее обезвреживании играет именно ГПО, а не каталаза. При высоких-наоборот, так как сродство ГПО к H_2O_2 выше, чем у каталазы. В целом же, ГПО играет более заметную роль чем каталаза, так как каталаза сосредоточена в микросомах, а ГПО - в цитозоле и митохондриях [9].

Глутатионпероксидаза (ГПО, КФ 1.11.1.9) состоит из 4 субъединиц в каждой из которых содержится по молекуле селена [9]. Помимо пероксида водорода ГПО восстанавливает органические гидропероксиды ROOH свободных жирных кислот, нуклеотидов, нуклеиновых кислот и, вероятно, белков [32]. Ее активность зависит от содержания глутатиона клетки, а это, в свою очередь, определяется активностью глутатионредуктазы и концентрацией НАДФН, который образуется в пентозофосфатном цикле [88].

Глутатион, который является основным клеточным антиоксидантом, может устранять дисульфидные связи в окисленных белках [25]. Кроме того, он необходим для редукции антиоксидантов глутаредоксина и тиоредоксина, способствующих сохранению пространственной структуры и функций молекул-регуляторов пролиферации [88].

Глутаредоксин, катализируя процесс деглутатионилирования, восстанавливает функциональную активность таких белков, как протеинтирозинфосфатаза 1B, c-Jun, субъединица p50 NF- κ B, каспаза-3. Осуществляя восстановление дисульфидов по дитиольному типу, глутаредоксин модулирует активность транскрипционных факторов NF- κ B, Nrf2 и AP-1 [88] под контролем которых находятся участки генов, кодирующих ключевые белки антиоксидантной системы, в том числе ферменты синтеза и метаболизма глутатиона. Как видим, глутатион занимает центральное положение не только в своей системе, но и в системах глутаредоксина и тиоредоксина. А также, опосредованно влияет на активность целого ряда белковых факторов.

При раке, как и при ряде других патологий, при усилении прооксидантных процессов помимо АФК нарабатываются токсические для белков

реакционноспособные карбонильные соединения (reactive carbonyl species; RCS; РКС). Они способны модифицировать аминокислотные остатки белков, что приводит к изменению их структурно-функциональных свойств [13, 72]. Свободнорадикальное окисление липидов сопровождается накоплением липогидропероксидов и вторичных продуктов – РКС, таких как малоновый диальдегид (МДА).

Также при аутоокислении шестиатомных сахаров образуется глиоксаль, а также при их соокислении с ненасыщенными липидами [5, 6]. Метилглиоксаль формируется в ходе окислительного метаболизма триозофосфатов [4]. Выявлено, что ГПО является мишенью для РКС, причём дозозависимо её активность подавляет именно МДА [13]. Согласно мнения авторов, тот факт, что ГПО тетрамер, поэтому инициированное РКС формирование межмолекулярных сшивок, лежит в основе изменения кинетических параметров фермента, модифицированного под влиянием МДА. Поэтому конформационные изменения в активном центре ГПО её остатков аминокислот под действием МДА и являлись причиной резкого угнетения активности ГПО при действии этого дикарбонила [72].

Таким образом, свободно-радикальное и карбонильное повреждение фермента-антиоксиданта ГПО, имеющие место при развитии опухолевого процесса, способны модифицировать структуру ГПО, что ведёт к снижению её активности [13, 238].

Как видим, для устранения возможных последствий, вызванных усилением прооксидантных процессов, система глутатиона имеет решающее значение, однако и сама является мишенью для атаки как АФК и свободных радикалов, так и активных карбонильных метаболитов [13].

Дисфункция системы глутатиона также может быть обусловлена повышенной чувствительностью глутатионредуктазы к повреждающему действию пероксида водорода [79]. При этом в клетке повышается концентрация окисленного трипептида, который сам становится токсичным, т.к. связываясь через –SH группы белков, реализует их глутатионилирование, что также ведёт к

дисфункции [79]. Согласно данным Носаревой О. Л. в лимфоцитах крови при моделировании окислительного стресса *in vitro* концентрация связанного с белками глутатиона была увеличена в 2,8 раза, а содержание карбонильных производных белков в 2,4 раза выше относительно показателей, полученных в интактных лимфоцитах крови. В результате исследовали эффект мультипликации. А именно, формирование окислительного стресса в лимфоцитах крови сопровождалось снижением концентрации SH-групп протеинов в 8,6 раза по сравнению с результатом в интактных клетках.

Возможно, что при снижении активности ГПО формируется порочный круг, ведущий к нарастанию концентраций АФК, а значит и их стимулирующих эффектов на реализацию программ метастазирования и инвазии опухолевыми клетками. Это подтверждается гипотезой Ланкина В. З., согласно которой инактивация ГПО должна вызывать нарушение нормальной утилизации АФК и гидропероксидов, а это, в свою очередь, должно стимулировать накопление РКС, способных модифицировать ГПО, вследствие чего свободно-радикальное окисление при патологических состояниях может приобретать “аутокаталитический” характер.

Это наиболее яркий пример, но далеко не единственный, когда редокс-чувствительный белок из-за окислительной модификации может утратить свою функцию. Так, рибонуклеозиддифосфатредуктаза, обеспечивающая формирование фонда дезоксирибонуклеотидов, является Fe-содержащим металлоферментом [95]. Его активность зависит от ряда факторов, в том числе от клеточной концентрации кислорода, ионов железа, восстановителей, обеспечивающих физиологическое состояние её сульфгидрильных групп в аминокислотных остатках, формирующих её активный центр. Её ОМБ и, как следствие, утрата активности позволили Шарыгину В. Л. сформулировать метаболическую природу мутагенного влияния ионизирующего излучения, когда клетка не может восполнить адекватно возросшим потребностям фонд дезоксирибонуклеотидов для обеспечения репарации из-за мутаций [95].

Итак, наиболее чувствительными к усилению процессов свободно-радикального окисления и основными акцепторами активных форм кислорода являются белки [79]. В результате взаимодействия активных форм кислорода с протеинами возникает как обратимая, так и необратимая окислительная модификация этих молекул. Конформационные изменения белков являются основополагающими в функционировании рецепторов, мембранных транспортных систем, изменении скорости биохимических реакций, регуляции фаз клеточного цикла, транскрипции, репликации, гибели клеток и других процессах.

При злокачественной трансформации окислительный стресс играет существенную роль и для перекисного повреждения липидов. МДА является конечным продуктом перекисного окисления липидов, маркёром липидной пероксидации [8]. Как и диеновые конъюгаты, МДА высокотоксичная молекула. Его появление свидетельствует и о развитии ОМБ, и о ПОЛ. При этом активное образование АФК при канцерогенезе способствует отбору мутантных клонов нечувствительных к перекисно-индуцированному апоптозу.

Таким образом, в настоящее время известно, что продукты неполного восстановления молекулярного кислорода помимо повреждающего действия выполняют регуляторные функции. По физико-химическим свойствам в качестве вторичного посредника для активации лимфоцитов выступает молекула H_2O_2 [79]. В сравнении с гидроксильным радикалом, H_2O_2 менее агрессивна, но при этом способна окислять цистеин в составе белков и пептидов, превращая его цистеинтиолат-анион ($-\text{CH}_2-\text{S}^-$). В случае снижения редокс-статуса клетки при формировании окислительного стресса цистеин способен легко окисляться пероксидом водорода до сульфеновой кислоты, с последующим образованием дисульфидных или сульфенамидных связей [32].

Наличие остатков цистеина в регуляторных белках, таких как факторы транскрипции, рецепторы, протеинкиназы, циклин-зависимые киназы, позволяет считать их *редокс-зависимыми протеинами*, а молекулы активных форм

кислорода – модуляторами функционального статуса, меняющих функциональную активность этих клеток [238].

Также считается, что АФК являются фактором, модулирующим активность эпигенетического аппарата клетки [1].

Причем модифицирующим действием на белки обладают не только сами АФК, но и гидроперекиси радикалов жирных кислот, формируемых в результате усиления перекисного окисления липидов (ПОЛ) АФК. Итак, вследствие ПОЛ в результате неферментативной реакции SH-групп со свободными радикалами липидов образуются сульфгидрильные радикалы, которые затем взаимодействуют с образованием дисульфидов либо окисляются кислородом с образованием производных сульфоновой кислоты.

Следовательно, ПОЛ усилит ОМБ [32]. Известно о значении процессов ПОЛ для развития ещё одного вида модификации структур, а именно, для карбонилирования.

Итак, рассматривая особенности прооксидантных процессов и их значение в формировании агрессивного фенотипа опухоли, необходимо разобрать особенности карбонилирования белков и роль металлов переменной валентности для этого дисбаланса.

Следствием накопления в клетках и тканях цитотоксических продуктов катаболизма свободно-радикальных процессов становится карбонильный стресс, дисбаланс, вызываемый реакционноспособными карбонильными соединениями (reactive carbonyl species; RCS; РКС) [5]. К карбонильным соединениям, содержащим группу C=O, относятся альдегиды, кетоны, сложные эфиры, амиды и другие соединения. Важным источником образования карбонильных соединений являются ферментативные и неферментативные реакции окисления липидов [5]. Дикарбонилы связываются с белками, за счет белковых аминокислотных групп, приводя к образованию вначале легко обратимых шиффовых оснований в ходе реакции Майяра с последующим их превращением в более стабильные продукты Амадори, которые всё же могут диссоциировать. Однако также могут медленно превращаться в стабильные и неподдающиеся расщеплению конечные продукты

неферментативного карбонилирования (гликирования). Это так называемые конечные продукты неферментативного гликирования (КПНГ; advanced glycation end-products, AGEs) [129, 130].

Карбонильные соединения могут восстанавливаться карбонилредуктазами, вместе с тем, однажды сформировавшись, КПНГ остаются стабильными и накапливаются в клетках, связываясь с белками [322].

Известно, что КПНГ играют решающую роль в формировании агрессивных свойств опухоли. Причем, КПНГ сами могут играть роль мессенджеров. Описан рецептор к КПНГ (AGER), который могут экспонировать не только опухолевые клетки, но и клетки стромы. В частности, модификация макрофагов в опухоль-ассоциированные (tumor associated macrophages, TAMs), M_2 фенотипа, сопровождается появлением рецепторов к КПНГ, считают, что в результате этого они могут формировать стимулы к усилению ангиогенеза, пролиферации, а также появляется способность синтезировать матриксную металлопротеиназу-9. То есть с появлением рецепторов к КПНГ связаны стимулирующие прогрессию опухоли эффекты TAMs [243]. Суперэкспрессия рецептора AGER в опухолях увеличивала клеточную пролиферацию, миграцию и ингибировала клеточный апоптоз [130].

Итак, ОМБ, карбонилирование, глутатионилирование, гликирование белков – те процессы, которые ведут к изменениям структуры белков и, как следствие, к временной или длительной модификации активности. Для канцерогенеза могут быть характерными любые из перечисленных изменений или даже все они могут иметь место, в той или иной степени [196].

Поскольку оксидативный стресс могут усиливать металлы переменной валентности, то вероятно необходимо рассмотреть и эти особенности.

В организме возможно превращение менее реакционных АФК O_2^- и H_2O_2 в более реакционноспособные соединения — синглетный кислород (O^1_2) при спонтанной дисмутации O_2^- или $OH\cdot$ в реакции Фентона и Габера – Вейса [77]. В этих реакциях реализуется неферментативный механизм. При этом обнаружено ингибирующее действие $OH\cdot$ на активность: глутатионпероксидазы, супероксиддисмутазы и целого ряда других [64].

В опытах *in vitro* на группе из 17 белков было показано, что под влиянием $\text{OH}\cdot$ или в сочетании $\text{OH}\cdot$ и $\text{O}_2^{\cdot-}$ окислительная модификация белков сопровождается либо их агрегацией с увеличением молекулярной массы, либо фрагментацией с распадом на более низкомолекулярные компоненты. Такие изменённые белки становятся более чувствительными к процессам протеолиза. Наиболее активно повреждаются белки, в состав которых входят гем, железосульфидные центры, медь и т. д.

Интенсивность окислительной модификации белков определяется, в первую очередь, особенностями аминокислотного белка. Акцепторными группами, которые способны перехватывать электроны, взаимодействуя с АФК, и образовывать анион-радикалы, могут служить дисульфидные, сульфгидрильные, карбонильные, карбоксильные и NH_3^+ группы. Радикалы $\text{OH}\cdot$ и $\text{O}_2^{\cdot-}$ могут окислять SH-группы в цистеине. При этом образуются внутренние и интрацеллюлярные дисульфидные мостики с другими тиолами, например, глутатионом. Сульфометильный фрагмент может быть окислен до сульфоксидного, что также приводит к нарушению структуры и функции белков [32].

При патологических состояниях разной интенсивности может протекать металлкатализируемое окисление (МКО) белков, затрагивающее ту часть белковой молекулы, которая участвует в связывании металлов переменной валентности (Fe, Cu).

Механизм МКО белков обусловлен функционированием специфических электрон-донорных систем. В этих системах должен присутствовать донатор электронов, который участвует в восстановлении O_2 в H_2O_2 и Fe^{3+} в Fe^{2+} . По мнению авторов, этот процесс может протекать либо по двухэлектронному пути с образованием H_2O_2 , либо по одноэлектронному пути с генерацией вначале $\text{O}_2^{\cdot-}$ и последующей дисмутацией до H_2O_2 . Соответственно и восстановление металлов, в частности Fe^{3+} в Fe^{2+} может происходить непосредственно за счёт донаторов электронов либо через промежуточное образование радикала $\text{O}_2^{\cdot-}$. Последний взаимодействует с Fe^{3+} и дает Fe^{2+} и O_2 [83]. Ион Fe^{2+} фиксируется на

металлосвязывающей поверхности белка. Комплекс белок- Fe^{2+} реагирует с H_2O_2 и генерирует *in situ* радикал $\text{OH}\cdot$, который вызывает окислительную модификацию аминокислотного остатка при металлосвязывающем участке белка. Это приводит к превращению отдельных аминокислотных остатков ферментов в карбонилпроизводные, их дезаминированию, потере белком каталитической активности и увеличению чувствительности к протеолитической деградации (рисунок).

Радикал $\text{OH}\cdot$ взаимодействовал с CH_2 -группировкой, связанной с аминогруппой лизинового остатка, образуя при этом радикал $-\text{CH}\cdot$, который служил донатором электронов для координационного комплекса Fe^{3+} -белок с последующей генерацией комплекса Fe^{2+} -белок. Это сопровождалось деструкцией металлосвязывающей поверхности белка и диссоциацией Fe^{2+} -белкового комплекса. Одновременно шло превращение аминогруппы лизинового остатка в иминогруппу с последующим её дезаминированием и образованием карбонильного (альдегидного) производного. Не исключена и другая вероятность: радикал $\text{OH}\cdot$ отнимает водород от аминогруппы лизина с образованием гидронитроксид-радикала [98].

В результате МКО генерируются в основном карбонил-derivаты аминокислот, что может служить маркером разрушения белков за счёт АФК при различных физиологических и патологических состояниях. Показано, что особенно чувствительны к МКО пролин, гистидин, аргинин и лизин. Пролин и аргинин в белках превращаются в глутамилсемиальдегидный остаток; лизин – в α -аминоадипилсемиальдегид; гистидин – в аспарагинил (аспартил); метионин – в метионилсульфоксид, цистеин – формирует S-S мостики между белками, а также белок смешанного типа – S-S-R; пролин – в цис-транс-4-гидроксипролил или пироглутамил [10, 11].

Таким образом МКО представляют собой местный специфический процесс, обусловленный взаимодействием H_2O_2 и Fe^{2+} на металлосвязывающей поверхности белка. Окислительная модификация белка может быть связана с ферментативными (1) и неферментативными (2) реакциями, например, 1)

ксантинооксидаза – ксантин - Fe^{3+} - O_2 ; 2) Fe^{2+} - O_2 ; Fe^{2+} (Cu^{2+}) – H_2O_2 . Причём в отношении железа или меди не обязательно их взаимодействие в свободном ионизированном виде [95]. Например, можно выделить большую группу соединений, способных в контакте с гемоглобином инициировать радикальные повреждения биополимеров.

Токсическое действие железа сопряжено с относительно недавно описанным видом клеточной гибели – ферроптозом.

Ферроптоз является формой гибели клеток, индуктором которой являются ионы двухвалентного железа, которые участвуют в реакции Фентона $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}\cdot + \text{OH}^-$ [2]. Образующийся гидроксильный радикал индуцирует перекисное окисление липидов, которое завершается деструкцией клеточной мембраны и гибелью клетки [2, 75]. Таким образом, ферроптоз, по сути дела, является некрозом, в котором ключевую роль играют ионы железа [5].

В тоже время взаимодействие железа с чувствительными белками не всегда описывается механизмом МКО, не всегда ведёт к подавлению активности. В частности, экспериментально установлено, что избыток железа стимулирует экспрессию мРНК КСО, а также и саму активность фермента [208]

Однако не только железо или медь, но и другие двухвалентные катионы, взаимодействуя с аминокислотными остатками могут вызывать ингибирование ферментативной активности. Так цинк, взаимодействует с ацилами аминокислот, расположенными в активном центре АДА (или вблизи него) и образовывать металлическую связь, подобную той, которая обнаруживается в структурах «цинкового пальца». Подавление активности АДА развивается вследствие конформационных изменений третичной структуры фермента и его активного центра [118, 150].

Следовательно, катионы металлов или за счет непосредственного взаимодействия с белками, или за счёт их металлокатализируемого окисления (в случае металлов переходной группы) способны инициировать конформационные изменения структуры белков и их функцию.

Таким образом, появление агрессивных форм кислорода в микроокружении опухоли может приводить к ряду негативных последствий в окружающих опухоль клетках, а также в смежных здоровых тканях, в том числе усилению процессов апоптоза, некроза. Сама опухолевая ткань также испытывает при этом действие гипоксии, АФК и характеризуется гистологической неоднородностью, т.е. среди опухолевых клеток также под микроскопом можно наблюдать поля некроза и апоптоза. Таким образом, АФК имеют существенное значение в опухоли и её росте. Кроме повреждающего действия на нуклеиновые кислоты и отсроченных эффектов окислительной модификации белков, в том числе ферментов и их дисфункции, одним из наиболее изученных эффектов АФК является перекисное окисление липидов.

Как было уже отмечено, исследование особенностей течения прооксидантных процессов в опухолях может расширить представления об их роли в канцерогенезе и получить новые данные по патохимическим особенностям развития ЭМП. В настоящем исследовании предпринята попытка индивидуального сопоставления уровней токсичного продукта ПОЛ - малонового диальдегида, уровней ОМБ (окислительной модификации белков) и их проявления – появления и доминирования прооксидантной реакции КО при генерации конечного продукта катаболизма пуринов – мочевой кислоты в опухолях раков различных локализаций.

Итак, в настоящее время известно, что продукты неполного восстановления молекулярного кислорода помимо повреждающего действия выполняют регуляторные функции. По физико-химическим свойствам в качестве вторичного посредника для активации лимфоцитов выступает молекула H_2O_2 . В сравнении с гидроксильным радикалом, H_2O_2 менее агрессивна, но при этом способна окислять цистеин в составе белков и пептидов, превращая его цистеинтиолат-анион ($-CH_2-S^-$). В случае снижения редокс-статуса клетки при формировании окислительного стресса цистеин способен легко окисляться пероксидом водорода до сульфеновой кислоты, с последующим образованием дисульфидных или сульфенамидных связей. Наличие остатков цистеина в регуляторных белках,

таких как факторы транскрипции, рецепторы, протеинкиназы, циклин-зависимые киназы, позволяет считать их редокс-зависимыми протеинам, а молекулы активных форм кислорода – модуляторами функционального статуса клетки, меняющих фенотип клеток в канцерогенезе.

1.6 Безъядерные клетки крови и процессы свободно-радикального окисления

Эритроцит и тромбоцит – безъядерные клетки крови, играющие важную роль в поддержании гомеостаза в организме [17]. Нарушение функционального состояния эритроцитов и тромбоцитов ведет к развитию микроциркуляторных нарушений и гипоксии, нарушению коагуляции, сопряженных с процессами канцерогенеза [74, 270].

Эффективность газотранспортной функции эритроцитов зависит от эластичности мембраны, полноценности цитоскелета, обеспечивающих способность эритроцита изменять форму в мелких капиллярах [220], что важно прежде всего для микроциркуляции [270].

Дисметаболические процессы в эритроцитах онкобольных реализуют ассоциированный с опухолевой прогрессией «синдром раннего старения эритроцитов». В результате развиваются патологические структурные изменения, повышается скорость процессов аутоокисления гемоглобина, их усиленный спонтанный гемолиз [247].

Преждевременному старению и гибели эритроцитов способствует активация процессов свободнорадикального окисления, следствием которых могут быть процесс окислительной модификации белков, процессы перекисного окисления липидов.

Токсичность прооксидантных процессов для эритроцита обусловлена особенностями его энергообмена. Гликолиз – его единственный энергогенерирующий процесс. Эффективная работа гликолиза очень важна для

эритроцитов, дефицит АТФ приводит к набуханию клетки и снижению деформабельности клетки, а значит к быстрому разрушению [337].

Ключевые ферменты гликолиза - мишень для ОМБ. Гликолитические ферменты - фруктозо-1,6-дифосфаталядолаза и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (ГАФД) содержат SH-группы остатков цистеина. Они могут терять активность вследствие действия различных окислителей - пероксида водорода, дикарбонилов, ионов металлов переменной валентности, подвергаться нитрозилированию оксидом азота. При этом развитие энергодифицита прямо связано с нарушением транспорта кислорода. Поскольку за счет работы ГАФД эритроцит регулирует количество 2,3-дифосфоглицерата, что снижает сродство гемоглобина к кислороду, корректирует газообмен в тканях. Модификация ГАФД не единственная причина ухудшения транспортной функции эритроцита. Этому также может способствовать окисление метгемоглобина [44, 57] .

При ухудшении газотранспортной функции эритроцита наблюдается интенсивное образование 2,3-дифосфоглицерата. Это снижает продукцию в них АТФ, помимо снижения сродства гемоглобина к кислороду. Последнее ведет к потере кислорода в более крупных сосудах еще до входа эритроцитов в капилляры [261, 285]. При этом ускоряется процесс старения эритроцитов, уменьшается срок их жизни. А при старении эритроцитов в условиях стресс-генерации, происходит более быстрое накопление окисленных белков и липидов, чем в клетках, образованных в условиях нормального эритропоэза [228].

Для оценки интенсивности процессов окисления исследуют уровни малонового диальдегида (МДА), активность ксантиноксидазы (КСО) [46, 58].

Эритроцит считают «маркером патологических процессов, обусловленных окислительным стрессом», а также «клеткой – носильщиком своих терапевтических» ферментов [147, 250]. Его основные ферментативные системы антиоксидантной системы эритроцитов представлены супреоксидисмутаза, системой глутатиона, куда помимо ГПО и глутатионредуктазы относятся глутатион-S-трансферазы, каталаза, особое значение имеет его метгемоглобинредуктаза [220].

Снижение активности ГПО и Г6ФДГ приводит к дефициту НАДФН₂, и увеличенному накоплению перекиси водорода [24, 78, 101].

При перекисном окислении, атаке подвергаются белки и липиды. Накопление в гидрофобном слое мембран клеток гидрофильных группировок-ROOH вызывает появление своеобразных пор [61, 91, 249]. Одновременно имеет место повреждение мембраносвязанных ферментов с ингибированием их активности, все это приводит к нарушению трансмембранного переноса ионов, аминокислот, глюкозы с последующим нарушением трофики, и функциональной активности клеток [255].

Аденозиндезамина (АДА) является примером чувствительного к свободнорадикальному окислению мембранного фермента. В эритроцитах АДА локализована на поверхности мембран, 2/3 активных центров фермента направлены во внешнюю среду (экзофермент). Изменение активности АДА является маркером гипоксии, признаком компенсаторного изменения скорости деградации аденилатов [266, 267]

Метаболизм аденозина в эритроцитах и тромбоцитах, прежде всего, связан не с синтезом нуклеиновых кислот, а с утилизацией АТФ и регуляторными эффектами этого пуринового нуклеотида [261]

Агрегация тромбоцитов также является активным, энергозатратным процессом со сложной регуляцией, поэтому адекватное обеспечение АТФ также играет важную роль в агрегационном потенциале тромбоцитов [337].

В тромбоцитах субстрат АДА - аденозин ингибирует АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов. АДА тромбоцитов, разрушая аденозин, ускоряет агрегацию [308].

В тромбоцитах отношение АФК и АОС иные, чем в эритроцитах. Тромбоцит имеет относительно короткий срок жизни, а основное действие АФК проявляется в изменении функционального состояния клетки, они являются необходимым компонентом для нормальной функции тромбоцитов, поскольку простагландины образуются по механизму свободнорадикального окисления.

Усиление свободнорадикальных процессов в тромбоцитах наоборот, приводит к их активации, усиливает агрегационную способность и приводит к тромбозам разнообразной локализации. Супероксид-анион активно индуцирует агрегацию тромбоцитов. Кроме того, продукт дисмутации супероксиданиона - пероксид водорода, является прямым регулятором агрегации, и при ее умеренном накоплении стимулирует ее [76]. Безусловно, изменение режимов агрегации тромбоцитов влияет на микроциркуляцию и процессы кровоснабжения.

Таким образом, тромбоциты и эритроциты являются узкоспециализированными клетками. Несмотря на общее происхождение, их строение и функции, безусловно, индивидуальны [147]. Кроме того, сильно отличается их время циркуляции в периферической крови.

Тромбоцит, по сути, является фрагментом активной клетки-мегакариоцита. С учетом короткого срока жизни, их метаболизм динамически реагирует на изменения в организме. Изменение функции этих клеток связаны с гипоксией и нарушением микроциркуляции а так же с прогрессированием опухолевого процесса.

Обмен триозофосфатов и аденозина, а так же система антирадикальной защиты тесно связаны с изменениями в функциональном состоянии эритроцитов и тромбоцитов, и эти обменные процессы чаще всего нарушены при патологии. Предпринята попытка сравнительного изучения дисметаболических процессов в этих клетках крови, в процессе опухолевой прогрессии.

Таким образом, согласно имеющимся современным данным, активация процессов свободно-радикального окисления в тканях может сопровождаться окислительной модификацией белков, в том числе, являющихся компонентами сигнальных путей, реализующих программы ангиогенеза, формирования резистентности к апоптозу, подвижности клеток опухоли, её инвазивности, повышения метастатического потенциала. При этом также наблюдается смена интенсивности пролиферации, ткань опухоли становится резистентной к терапии. Может иметь место изменение продукции ряда низкомолекулярных метаболитов, играющих роль сигнальных молекул для реализации описанных программ.

Перечень новых качеств, вырабатываемых опухолью при формировании её агрессивных свойств, представляет этапы развития эпителиально-мезенхимального перехода, реализуемого, как известно из источников литературы, эпителиальными опухолями различных локализаций. При этом не установлены взаимосвязи между особенностями обмена пероксида водорода и нуклеозидов, способствующих формированию индивидуальных агрессивных свойств карциномы. Остаются не изученными особенности активности металлоферментов, участвующих в их обмене. Не уточнён характер дисметаболических процессов в клетках крови, взаимосвязь с агрессивными свойствами опухоли. Данное исследование посвящено определению метаболических механизмов, способствующих развитию ЭМП.

РАЗДЕЛ 2

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Общая характеристика больных и принципы формирования групп для исследований

Расширенное биохимическое и патоморфологическое исследование проводили в биопрепаратах опухолей трёх локализаций.

Группы опухолей составили клинические случаи местно-распространенного рака легких, рака желудка, рака кишечника T₂₋₄N_{0-x}M₀₋₁ стадий, пациентов, проходивших плановое лечение в Донецком Республиканском онкологическом центре им. проф. Г.В. Бондаря.

Группу больных с НМРЛ составили мужчины (n = 53) и женщины (n = 10) в возрасте от 54 до 78 лет (средний возраст 62,6 года). Среди больных РЖ, РК: мужчины (n = 64) и женщины (n = 36) в возрасте от 50 до 80 лет (средний возраст 60,8 года).

Пациенты были проинформированы и дали согласие на участие в исследовании. Включение в исследование осуществлялся с соблюдением принципов рандомизированной выборочной совокупности.

Критерии включения клинического случая в протокол исследования:

1. Информированное согласие на участие в исследовании;
2. Инструментальная верификация диагноза
3. Плановое оперативное лечение
4. Морфологическая верификация рака – случаи немелкоклеточного рака легких; аденокарцином желудка, колоректального рака.
5. Неоадьювантная химиотерапия не проводилась.
6. Отсутствие до операции курсов лучевой терапии.

Критерии исключения:

1. Сопутствующий воспалительный процесс:
 - острый, инфекционной этиологии (т.ч ОРЗ);

- хронический, т.ч. инфекционной этиологии (ВИЧ-инфекция, вирусный гепатит, туберкулез);

2. Проведение неоадьювантной химиотерапии

3. Лучевая терапия на дооперационном этапе

4. Наличие гематологических осложнений, т.ч. в системе коагуляционного гемостаза, выраженного анемического синдрома

5. Для группы случаев рака легких – верифицированный мелкоклеточный рак легких; при раке желудка – верифицированный морфологически диффузный рак желудка.

Исследование биохимических показателей проводили в образцах 163 эпителиальных опухолей немелкоклеточного рака легких (НМРЛ, n=63), рака желудка (РЖ, n=52), кишечника (РК, n=48).

Для индивидуального контроля исследуемых метаболических показателей использовали визуально нетрансформированные ткани края резекции органа, удаленные от опухолевого узла не менее, чем на 1 см.

Данный подход исключал потребность в дополнительном заборе тканей, не вносил изменений в план и тактику оперативного вмешательства.

Кровь для сопутствующего исследования особенностей обмена в клетках крови получали в малом объеме из клинического образца крови, набранной в ходе операции.

Морфологически группу НМРЛ составляли 40 случаев плоскоклеточного рака, 16 - аденокарцином, 7 случаев нейроэндокринных опухолей (95% - периферический РЛ).

РЖ изучен в 52 случаях (из них 42 – рак кишечного типа (аденокарциномы, АК), в 10 случаях – смешанного типа).

РК был представлен АК колоректального рака.

По уровню инвазии (классификации TNM) опухоли соответствовали:

для НМРЛ - T₂N₀₋₂M₀ и T₃N₀₋₂M₀ стадии;

для РЖ и РК – преимущественно T₃N₀₋₂M₀ стадиям.

По степени дифференцировки (классификация ВОЗ, 1973) преобладали карциномы G₁ и G₂ степени.

Не выявлено статистически значимого различия распределения больных контрольной и исследуемой групп по возрасту (при сравнении по критерию χ^2 $p=0,85$).

2.2. Подготовка биоматериала к исследованиям

2.2.1. Методика получения плазмы крови богатой тромбоцитами

Цельную кровь помещают в пробирку с 3,8% раствором цитрата натрия (соотношение кровь : цитрат равно 9:1), центрифугируют 3 мин при 1200 g, после чего из верхнего слоя отбирают плазму богатую тромбоцитами.

Концентрация тромбоцитов в 1 мкл подсчитывается с помощью камеры Горяева, для этого считают количество тромбоцитов в 16 малых квадратах.

Расчеты проводят по формуле:

$$T = A / 0,004 * 16;$$

A-количество тромбоцитов в 16 малых квадратах;

0,004-объем одного малого квадрата камеры Горяева (мкл);

16-количество квадратов в которых были подсчитаны тромбоциты.

2.2.2. Методика получения бестромбоцитарной плазмы

Цельную кровь помещают в пробирку с 3,8% раствором цитрата натрия (соотношение кровь : цитрат равен 9:1), центрифугируют при 1200G в течение 3 мин. Отбирают плазму, богатую тромбоцитами. После этого центрифугируют при 1200g в течение 10 мин. Отбирают бестромбоцитарную плазму. Микроскопически контролируют полноту осаждения клеток крови.

2.2.3. Методика получения гемолиза эритроцитов

Цельную кровь, набирают из локтевой вены в пробирку с 3,8% раствором цитрата натрия (соотношение кровь : цитрат равен 9:1), центрифугируют при 1200G в течение 15 мин, удаляют надосадочную жидкость. Также возможно

использование эритроцитов после отбора ПБТ и бестромбоцитарной плазмы (см. подразделы 2.2.1, 2.2.2).

Эритроциты отмывают физиологическим раствором: трижды 1,5 мл эритроцитов доводят до объема 4,5 мл физиологическим раствором и центрифугируют в течение 10 мин. при 1200g. Отмытые таким образом эритроциты гемолизируют дистиллированной водой в соотношении 1:50. 1 мл такого гемолизата соответствует 0,02 млн. эритроцитов.

2.2.4. Методика получения гомогенатов тканей

Реактивы:

- 1) 0,25M раствор сахарозы в 0,005M Трис - HCl-буфере pH 8,1 с 0,15M KCl
- 2) концентрированный раствор $(\text{NH}_4)\text{SO}_2$;
- 3) 0,005M Трис-HCl буфер pH 8,1 с 0,001 м меркаптоэтанолом

Ткань тщательно промывают охлажденным физиологическим раствором, измельчают ножницами, гомогенизируют на льду в 0,25 м растворе сахарозы на 0,005M Трис - HCl-буфере pH 8,1 с 0,15 M KCl (стеклянный гомогенизатор).

Полученный гомогенат центрифугируют при возможном максимуме и в течение 60 минут. К супернатанту добавляют раствор $(\text{NH}_4)\text{SO}_2$ до 40% насыщения. Насыщают очень медленно, добавляя $(\text{NH}_4)\text{SO}_2$ мелкими порциями. Оставляют на 1 час. Центрифугированием (возможен максимум) в течение 60 минут собирают осадок. Полученный осадок растворяют в 0,005 м Трис-HCL буфере pH 8,1 с 0,001 м раствором меркаптоэтанола

2.3. Патоморфологические и иммуногистохимические методы исследования

Пораженные органы описывали макроскопически по схеме с указанием локализации опухоли, ее формы (узел, язва с валобразными краями, инфильтративно-язвенная форма, инфильтрат), а также размеров опухоли. В дальнейшем проводили гистотопографическое исследование опухоли. Для

этого вырезали и нумеровали кусочки опухоли, которые фиксировали в 10% и 4% растворах (обычного и забуференного) формалина, жидкостях Карнуа и Севки, нефиксированные кусочки быстро замораживали для изготовления криостатных срезов. Кусочки брали из центральных отделов опухоли на всю глубину (если толщина была значительной, то кусочек разрезался на равные части), и через небольшие промежутки к латеральным краям инвазии.

Гистотопографический метод исследования позволил выявлять изменения морфологии опухоли от поверхностных отделов к глубоким слоям стенки желудка и от центра к латеральному краю инвазии, что могло быть следствием ее прогрессии.

Для иммуногистохимического исследования, материал фиксировали в нейтральном забуференном формалине (pH 7,4) в течении 24 часов. После дегидратации кусочки тканей заливали в высокоочищенный парафин с полимерными добавками (Richard-Allan Scientific, США) при температуре не больше 60°C. Серийные срезы толщиной 5 ± 1 мкм изготавливали на ротационном микротоме. Срезы, предназначенные для ИГХ исследования, помещали на обработанное адгезивной жидкостью стекло Super Frost Plus (Menzel Германия). Для «демаскировки» антигенов обезвоженные срезы подвергали термической обработке в растворе Target Retrieval Solution (DAKO, Дания) с использованием водяной бани GFL1023. После блокирования неспецифического связывания белков протеиновым блоком (DAKO) и эндогенной пероксидазной активности пероксидазным блоком (DAKO) наносили первичные антитела.

Использовали мышинные моноклональные антитела (МАТ) AE1/AE3 и цитокератина 18 (для определения экспрессии цитокератинов) (DAKO).

Для выявления эндотелия сосудов использовали моноклональные антитела CD31 и CD34.

Для определения пролиферативной активности срезы обрабатывались Ki-67 (DAKO).

Применяли другие моноклональные антитела: к виментину, десмину α -гладкомышечному актину для оценки особенностей паренхимы, а также наличия эпителиальных опухолевых клеток с признаками полной ЭМТ. Визуализацию первичных антител проводили с помощью полимерной системы детекции DAKO EnVision+. Как субстрат для пероксидазы хрена использовали DAB+ (DAKO). Препараты докрашивали гематоксилином Майера. Потом окрашенные препараты помещали в полусинтетическое вещество Permanent Mounting Medium (DAKO).

В препаратах окрашенных моноклональным антителом Ki-67 (маркер клеток, которые участвуют в клеточной пролиферации) мы определяли индекс мечения. В 10 полях зрения подсчитывались все опухолевые клетки и Ki-67-позитивные клетки при увеличении $\times 400$. Индекс мечения это соотношение Ki-67-позитивных опухолевых клеток ко всем опухолевым клеткам.

По данным I. V. Vasilenko индекс мечения Ki-67 менее 10% говорит о низкой пролиферативной активности, а более 20% - о высокой (10 – 20% рассматривается как «серая» или промежуточная зона).

Гистологические препараты были изучены под светооптическим микроскопом Olympus BX-40, микрофотографирование произведено цифровой фотокамерой Olympus U-TV1X с программным обеспечением Olympus DP-Soft.

2.4. Биохимические методы исследования

2.4.1. Методика определения активности супероксиддисмутазы

Принцип метода: определение активности супероксиддисмутазы (СОД; КФ 1.15.1.1.) основано на способности фермента тормозить автоокисление адреналина при pH 10,2. Экстинкция регистрируется при 480 нм. Ввиду нестабильности субстрата за 1 условную единицу активности фермента

принимают такое количество СОД, которое необходимо для ингибирования начальной скорости автоокисления адреналина на 50 %.

Реактивы:

1. Этанол;
2. Хлороформ;
3. 5 мМ трис-буферный раствор, pH 7,4;
4. $2,25 \times 10^{-3}$ водный раствор адреналина, готовится Ex temporo;
5. 0,15 М раствор Na_2CO_3 , содержащий 3×10^{-4} М ЭДТА, pH 10,2;
6. 0,005 М раствор K_2HPO_4 , содержащий 3×10^{-5} М ЭДТА, pH 7,8;

Ход определения: для анализа отбирают 0,1 мл исследуемого материала (плазма крови, гемолизат эритроцитов, гомогенат тканей) и разводят 5 мМ трис-буферным раствором, pH 7,4 в соотношении 1:9. Для гемолизата эритроцитов необходимо осаждение Hb путем добавления 0,25 мл этанола и 0,15 мл хлороформа. Прозрачный супернатант разводят далее как описано выше. Измерение активности СОД проводят в кювете вместимостью 3 мл на спектрофотометре при длине волны 480 нм.

Для измерения активности СОД в кювету вносят компоненты, соблюдая последовательность: 1) 1 мл 0,15 М раствор натрий-карбонатного буфера с добавлением 3×10^{-4} М ЭДТА, pH 10,2; 2) 0,5 мл супернатанта исследуемого материала (для контрольной пробы – 0,5 мл воды); 3) 0,7 мл 0,005 М раствор калий-фосфатного буфера с добавлением 3×10^{-5} М ЭДТА, pH 7,8; 4) 0,4 мл $2,25 \times 10^{-3}$ водного раствора адреналина.

Сначала регистрируют скорость свободного, не ингибированного автоокисления адреналина в аденохром (контрольная проба). Реакцию начинают добавлением адреналина и быстрым перемешиванием содержимого кюветы.

Затем определяют начальную скорость автоокисления адреналина в присутствии СОД в исследуемых пробах (супернатант непосредственно перед внесением в кювету необходимо разводить в 2,5 раза или в 10 раз 0,005 мМ раствором калий-фосфатного буфера pH 7,8). Время регистрации реакции 1 минута.

Активность СОД (в Ед/мл белка) определяется по формуле:

$(dEa/dE - 1) \times C / V \times a$, где

dEa – скорость автоокисления контрольного раствора адреналина (контрольная проба);

dE – скорость окисления адреналина в присутствии СОД (опытная проба);

V – объём материала, добавляемого в пробу, C – его разведение;

a – количество белка в пробе в мг (определяется по методу Лоури).

2.4.2. Методика определения активности глутатионпероксидазы

Глутатионпероксидаза (ГПО; КФ 1.11.1.9) катализирует реакции восстановления многочисленных субстратов (пероксида водорода, окисленных SH-групп белков), используя при этом восстановленный глутатион (GSH).

Принцип метода: активность фермента оценивают по изменению содержания GSH до и после инкубации с модельным субстратом. Содержание GSH оценивают, определяя окрашенные в желтый цвет производные соединения GSH с ДТНБ (5,5' – дитиобис-(2-нитробензойная кислота) – реактив Элмана).

Реактивы:

1. 0,1 М Трис-HCl буфер, pH 8,5 с 0,1 % ЭДТА;
2. 20 % раствор ТХУ;
3. 0,4 % ДТНБ в метаноле, ex temporo;
4. Сложный буфер: 10 мл 0,1 М Трис - HCl буфер. pH 8,5 с 0,01 % ЭДТА + 7,8 мг азида натрия и 10 мг GSH;
5. 0,14 % гидроперекись третбутила (ГПТБ).

Ход определения: для каждой пробы берут 2 пробирки (опыт и контроль). В них вносят 0,73 мл сложного буфера и 0,2 мл исследуемого материала. затем инкубируют 10 мин при 37° С.

Затем в опытную пробу добавляют 25 мкл 0,14 % раствора ГПТБ и инкубируют 5 мин. Реакцию останавливают, добавляя 0,2 мл 20 % раствора ТХУ.

В контрольные пробирки сначала вносят 0,2 мл 20 % ТХУ, а уже после этого добавляют 25 мкл 0,14 % ГПТБ.

Далее пробирки центрифугируют 7 – 10 мин при 1200 g. Отбирают по 0,1 мл супернатанта и переносят в пробирку, содержащую 2,8 мл 0,1 М Трис- HCl буфера pH 8,5 и 25 мкл 0,4 % ДТНБ в метаноле. Тщательно перемешивают и фотоколориметрируют опытную пробу против контрольной при 412 нм.

Расчет активности осуществляют по формуле:

$$A = \Delta E \times V \times C \times 1000 / 13600 \times a \times t, \text{ где}$$

13600 – коэффициент экстинкции для GS-ДТНБ ($13600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$),

A – активность фермента,

ΔE – разница экстинкций между опытной и контрольной пробами,

V – объём материала, добавляемого в пробу, C – его разведение;

a – объём материала в мл (плазмы) или мг (для эритроцитов и гомогенатов тканей), определенное по методу Лоури;

t – время инкубации;

C –разведение материала пробы;

1000 –коэффициент пересчета активности ГПО в мкмоль.

Активность ГПО выражали в мкмоль/(мин x мл) (плазма крови) и мкмоль/(мин x мг) (гемолизат эритроцитов и гомогенат тканей).

2.4.3. Методика определения активности аденозиндезаминазы

Аденозиндезаминаза (АДА; КФ 3.5.4.4) – это катоболический фермент обмена аденозина (дезоксиаденозина), который катализирует гидролитическое дезаминирование в инозин (дезоксиинозин).

Принцип метода: определение основано на регистрации изменений оптической плотности реакционной смеси при длине волны 260 нм, обусловленных дезаминированием аденозина в инозин, которое регистрируется спектрофотометрически (водородная лампа).

Реактивы:

1. 0,1 М Na-фосфатный буфер, pH 7,0;
2. $0,36 \times 10^{-4}$ моля аденозина, растворенные в 0,1 М Na-фосфатном буфере.

Ход определения: инкубационная среда содержит следующие компоненты:

- | | |
|---|---------|
| 1. Аденозин, растворенный в Na-фосфатном буфере | 0,3 мл |
| 2. Na-фосфатный буфер | 2,7 мл |
| 3. Гемолизат эритроцитов | 0,01 мл |

В кювету спектрофотометра (1 см) наливают инкубационную среду, которая состоит из раствора аденозина и буфера, потом в исследуемую пробирку добавляют фермент. Измеряют начальную величину оптической плотности при длине волны 265 нм на водородной лампе, выставив ноль по контролю. Потом инкубируют пробу при 37°C на протяжении 10 мин и измеряют второй раз оптическую плотность.

Активность аденозиндезаминазы рассчитывают по формуле:

$$A = \frac{D_{265}}{a \times t \times 0,0149 \times 267,24 \times 0,01} \times 1000,$$

a – концентрация белка, мг на мл, или количество клеток;

t – время инкубации, 10 мин;

0,0149 – молекулярный коэффициент экстинкции аденозина;

267,24 – молекулярная масса аденозина;

0,01 – коэффициент перерасчета на 1 мл пробы;

1000 – коэффициент перерасчета условных единиц в нмоль/мин/мг.

Активность АДА выражали в нмолях превращенного субстрата за одну минуту в пересчете на 10^8 клеток или 1 мг белка.

2.4.4. Методика определения активности тимидинфосфорилазы

Тимидинфосфорилаза (ТФ; КФ 2.4.2.4) – это катоболический фермент обмена дезокситимидина (дезокситимидилата), который катализирует обратимую реакцию фосфорилиза нуклеозида до свободного азотистого основания (тимина) и фосфорилированной дезоксирибозы. Считается, что в норме, в дифференцированной ткани реакция всегда протекает в одном направлении из-за лимита свободной дезоксирибозы.

У ТФ есть альтернативная активность – условно назовём её анаболической (ТФан) – трансферазная активность (описана в 1995 году в экспериментальных исследованиях в США), которая практически не исследуется.

Тимидинфосфорилаза (ТФ, КФ 2.4.2.4) – ключевой фермент «запасного пути» синтеза тимидина. Анаболическая ТФ (ТФан, PD-ЭCGF) катализирует реакцию превращения азотистого основания (тимина) в нуклеозид (тимидин), поставляя субстрат для дальнейших биосинтетических превращений (по «запасному пути синтеза» для маркера пролиферации - тимидинкиназы). Катаболическая ТФ (ТФк) блокирует накопление внутриклеточного тимидина, катализируя обратную реакцию. Затем, в отличие от пропролиферативных сигналов ТФан, продукты ТФк реализуют свои сигналы как фактор ангиогенеза и блокируют каспазный путь реализации апоптоза.

Принцип метода основан на регистрации изменений оптической плотности реакционной среды при 300 нм вследствие увеличения экстинкции тимидина для ТФан (Тимина для ТФк).

Реактивы:

- 1) K^+ - фосфатный буфер pH 6,8-7,5 мкмоль для Тфан
(K^+ - фосфатный буфер pH 7,4-7,5 мкмоль для ТФк);
- 2) 0,2 мкмоль Тимина, 0,6 мкг 2-дезокси-инозина
(0,4 мкмоль тимидина для ТФк);
- 3) 0,01 н р-р NaOH, pH13

Ход определения: инкубационная среда содержит следующие компоненты (для определения активности ТФан):

1. Тимин, растворенный в K^+ -фосфатном буфере 0,08 мл
2. косубстрат – источник 2-дезоксид-Д-рибозы 0,2 мл!
3. K^+ -фосфатный буфер рН 6,8 0,56 мл
4. Плазма (гомогенат тканей) 0,02 мл

Общий объем проб - 0,86 мл.

Ход определения: инкубационная среда содержит следующие компоненты (для определения активности ТФк):

1. тимидин, растворенный в K^+ -фосфатном буфере 0,1 мл
2. K^+ -фосфатный буфер рН 7,4 0,56 мл
3. Плазма (гомогенат тканей) 0,02 мл

Общий объем проб - 0,68 мл.

Определение активности каждого изофермента требует наличия пары пробирок – исследуемой и контрольной. В контрольную пробирку наливают инкубационную среду, состоящую из K^+ -фосфатного буфера, содержащего тимин (тимидин), в соответствии с видом определяемой активности. Ту же манипуляцию проводят с исследуемой пробиркой, но затем в нее вводят 0,02 мл материала, содержащего фермент (плазму, гомогенат тканей), перемешивают. Пробы инкубируют в термостате в течение 30 мин при 37 и С. реакцию останавливают, погружая пробирки в кипящую водную баню на 3 минуты, затем резко охлаждают на льду (2 минуты). К объему проб добавляют по 2,45 мл 0,01 н раствора NaOH. Белок, который при этом выпал в осадок удаляют центрифугированием при 5000 оборотах в минуту в течение 10 минут.

Специфическую активность фермента рассчитывают по формуле:

$$A = \frac{(E_{\text{опытн}} - E_{\text{контрольн}})}{E_{\text{макс}} \times a \times 0,15} \times 120,$$

$E_{\text{опытн.}}$ - исследуемая, $E_{\text{контрольн.}}$ - оптическая плотность содержимого пары пробирок

- при длине волны 267 нм, измеряемой на водородной лампе;

- при длине волны 300 нм, измеряемой на водородной лампе;

$E_{\text{максимальная}}$ ($E_{\text{макс}}$) оптическая плотность тимидина (Тимина) в NaOH, которая определяется в ходе работы;

a -концентрация белка, мг / мл (определяют методом Лоури);

0,15-коэффициент пересчета на 1 мл пробы;

120-коэффициент пересчета условных единиц в нмоль/мин / мг.

За единицу ферментативной активности принимали увеличение экстинкции тимидина при 300нм (Тимина - при 300нм) на мг белка в течение 30 минут инкубации, условные единицы специфической активности изоферментов переводили в нмоль/мин на 1 мг белка.

2.4.5. Определение содержания ТБК-активных продуктов (малонового диальдегида МДА)

Принцип метода: в кислой среде при высокой температуре малоновый диальдегид образует с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК) окрашенный триметилловый комплекс, содержание которого определяют фотометрически.

Реактивы:

1. 30% ТХУ (трихлоруксусная кислота)
2. Для титрования 0,025М Трис-HCl pH 7,4 содержащий 0,175 М KCl.
Для крови – 790мг Триса в 100 мл воды (а)
0,15 мл конц. HCl в 100мл воды (б)
1,17 г NaCl в 200 мл а+б
3. Плазма крови разведенная в 1,5 раза (0,5 пл + 0,25 физ. раствора)
4. 67 мг ТБК в 10 мл буфера 2 ex tempore

Ход определения:

В контрольную и опытную пробирки помещают по 0,75 мл 30% ТХУ, по 0,75 мл раствора ТБК. Далее в опытную пробу 0,75 мл материала, в контрольную – 0,75 мл дист воды

Ход определения

1. Кипятить 15 мин на водяной бане.
2. Охладить, центрифугировать 15 мин 3000 об/мин.
3. Фотометрировать на ФЭКе при $\lambda=532$ нм против контроля в кювете 1 см.
4. Расчет: $(E/1,56)10, \text{ мкмоль/л} = E \cdot 28,85$

Норма: 1,0-2,0 мкмоль/л

2.4.6. Методика одновременно определения 2,3-ДФГ и АТФ в эритроцитах (2,3-дифосфоглицерата и аденозинтрифосфата)

Реактивы:

- 1) 0,15М хлорид натрия;
- 2) трихлоруксусная кислота (ТХУ), 12,5%;
- 3) 2н NaOH;
- 4) 2н HCl;
- 5) 0,36н H_2SO_4 ;
- 6) активированный уголь
- 7) 5% раствор MgNO_3 в 96° спирте;
- 8) 4,6% раствор аскорбиновой кислоты в 0,36н H_2SO_4 ;
- 9) раствор молибденово кислого аммония в 0,36н H_2SO_4 ;
- 10) стабилизирующий реактив: 9% цитрат натрия, 9% уксусная кислота и 9% мышьяковистый натрий смешивают в равных соотношениях.
- 11) стандартный раствор фосфора : 136,09 мг KH_2PO_4 растворяют в 100 мл дистводы.
- 12) рабочий раствор фосфора: стандартный раствор разводят 0,36н H_2SO_4 в отношении 1:40

Ход определения: в подготовленных отмытых эритроцитах проводят гемолиз, путём добавления 2 мл холодной дистводой, после чего проводится осаждение белков при добавлении 2 объёмов 12,5% ТХУ. Смесь перемешивают, осадок отделяют центрифугированием при 3000 об/мин в течение 15 мин.

Супернатант представляет собой разведённый в 5 раз гемолизат эритроцитов. Забирают 1 мл для определения АТФ. Оставшийся ТХУ-фильтрат употребляют для определения 2,3-ДФГ и неорганического фосфора, для чего пробу сначала подвергают обработке углём для абсорбции нуклеотидов.

Гидролиз. В пробирку отмеряют 1 мл ТХУ-фильтрата, добавляют 1 мл 2н HCl и пробирку помещают в кипящую водяную баню на 7 минут. Содержимое пробирки охлаждают, помещая её в холодную воду. 1 мл содержимого переносят в другую пробирку, куда добавляют 1 мл 2н NaOH;

0,5 мл охлаждённого и нейтрализованного гидролиза та оставляют для определения фосфора АТФ.

Абсорбция нуклеотидов специально обработанным древесным углём. Навеску активированного угля взбалтывают с 3 объёмами 1н HCl, доводят до кипения и сохраняют в нагретом состоянии 20 минут. Смесь фильтруют и многократно промывают дистводой до получения фильтрата, не содержащего кислоты. Затем уголь высушивают при 96° С в течение ночи.

Навеску угля (около 200мг) смешивают с оставшимся центрифуга том и встряхивают на качалке в течение 5 минут, затем центрифугируют и фильтруют. 0,5 мл фильтрата переносят для определения неорганического фосфора, а 0,5мл подвергают озолению.

Озоление пробы. Сжигание пробы в нитрате магния производят для минерализации всего фосфора, содержащегося в различных органических соединениях. После абсорбции 0,5мл пробы помещают в пенициллиновый флакончик, куда добавляют 0,5мл раствора нитрата магния в 96°спирте. Смесь медленно прогревают до полного испарения жидкости, затем пробу сжигают на горелке. После охлаждения содержимое растворяют в 0,36н H₂ SO₄ и 0,1мл раствора используют для определения безнуклеотидного фосфора.

При определении АТФ используют не подвергшуюся гидролизу пробу, т.е. непосредственно ТХУ-фильтрат, а при определении ДФГ – этот же фильтрат, обработанный углём. Для определения во все пробы добавляем пипеткой 0,36н H_2SO_4 до 1 мл, 0,25 мл аскорбиновой кислоты, 0,25 мл молибденовокислого аммония. И 0,5 мл стабилизирующего реактива. Через 15 минут определяется оптическая плотность на ФЭКе. Вычисление количества фосфора производится по калибровочной кривой.

Расчёт количества АТФ в эритроцитах производят по формуле:

$$((B \times 40) - (B \times 10))/2 \text{ мкмоль АТФ на 1 мл эритроцитов,}$$

где В – количество фосфора в пробе после гидролиза;

Б – количество фосфора в пробе после озоления

Расчёт количества 2,3-ДФГ в эритроцитах проводят по формуле:

$$5 \times (10A - B) \text{ мкмоль,}$$

где А-количество фосфора в разведённом гемолизате эритроцитов.

2.4.7. Определение белка по методу О. Н. Лоури

Принцип метода: метод Лоури О.Н. основан на измерении интенсивности окрашивания раствора, в котором протекает цветная реакция на белок (реакция Фолина) с тирозиновыми и цистеиновыми радикалами белковой молекулы, которая основывается в восстановлении фосфорно-молибденовой и фосфорно-вольфрамовой кислот (реактив Фолина-Чикольте) с образованием комплексного соединения синего цвета.

Реактивы:

1. 2% раствор карбоната натрия в 0,01 н. растворе гидроксида натрия.
2. 0,5% раствор медного купороса в 1% растворе тартрате калия или натрия.
3. Щелочной раствор меди: смешивают 50 мл реагента 1 и 1мл реагента 2 (пригодный на протяжении двух суток).
4. Реактив Фолина-Чикольте.
5. Физиологический раствор.

Ход работы:

К 0,1 мл разведенной в 50 раз гемолизата эритроцитов добавляют 0,9 мл физиологического раствора, 2 мл смеси 3 и оставляют на 10 мин. После этого добавляют 0,2 мл реактива Фолина-Чикольте и оставляют на 30 мин. Фотоэлектроколориметрируют при длине волны 670 нм в кювете длиной 0,5 см. Все пробы тщательно перемешивают, избегая образования пены. Содержание белка в пробе определяют по калибровочному графику.

2.4.8. Определение уровней железа в биоматериале спектрометрическим методом с использованием 1,10-фенантролина

1. Принцип метода: заключается в добавлении раствора 1,10-фенантролина в исследуемую пробу и фотометрическом значении оранжево-красного комплекса при длине волны приблизительно 510 нм.

2. Во время определения общего железа добавляют раствор хлоридоводородного гидроксилamina для восстановления железа (III) в железо (II). Если присутствует нерастворенное железо, оксиды железа или комплексы железа, необходима предварительная обработка пробы для перевода этих соединений в растворенное состояние.

Комплекс железо (II) — 1,10-фенантролин стабилен при pH от 2.5 до 9, а интенсивность окраски пропорциональна концентрации присутствующего железа (II). Наблюдается линейная зависимость между концентрацией и поглощением аж до концентрации железа 5,0 мг/дм³. Максимум поглощения наблюдается при 510 нм (коэффициент молярной адсорбции $11 \cdot 10^3$ дм³/(моль·см)).

3. Реактивы

Для анализа используют только реактивы известной аналитической степени чистоты.

Вода, которую используют, должна быть как можно низшую концентрацию железа; допустимой концентрацией железа в реактивах является та, которая соответствует трехкратному стандартному отклонению предварительно

определенных результатов контрольных проб. Для удобства стоит использовать деионизированную или дистиллированную в стеклянном аппарате воду.

3.1. Серная кислота, $Q = 1,84 \text{ г/см}^3$

3.2 Раствор серной кислоты, $C (1/2 \text{ H}_2\text{SO}_4) = 4,5 \text{ моль/дм}^3$

Добавляют медленно при интенсивном перемешивании 1 объем концентрированной серной кислоты (3.1) до 3 объемов охлажденной воды.

3.3 Азотная кислота, концентрированная, $Q = 1.40 \text{ г/см}^3$

3.4. Раствор соляной кислоты, $Q = 1,12 \text{ г/см}^3$, $C (\text{HCl}) = 7,7 \text{ моль/дм}^3$

3.5. Ацетатный буфер

Растворяют в воде 40 г ацетата аммония ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$) и 50 см^3 ледяной (кристаллизованной) уксусной кислоты (CH_3COOH) ($Q = 1,06 \text{ г/см}^3$) и доводят водой до 100 см^3 .

3.6. Раствор солянокислого гидроксилamina, 100 г/дм^3

Растворяют в воде 10 г солянокислого гидроксилamina ($\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$) и доводят водой до 100 см^3 . Этот раствор стабилен как минимум на протяжении недели.

3.7. Раствор 1,10-фенантролина

Расворяют в воде 0,5 г хлорида 1.10-фенантролина (моногидрата) ($\text{C}_{12}\text{H}_9\text{Cl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) и доводят до 100 см^3 .

Как альтернативный можно использовать раствор 0.42 г моногидрата 1,10-фенантролина ($\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2 \cdot \text{HCl}$) в 100 см^3 воды, содержащей две капли соляной кислоты. Раствор стабилен в течение недели в случае его хранения в темном месте.

3.8. Раствор персульфата калия 40 г/дм^3

Растворяют в воде 4 г персульфата калия ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) и доводят водой до 100 см^3 . Этот раствор стабилен в течение нескольких недель, если его хранят при комнатной температуре в темноте.

3.9. Железо, основной раствор, соответствующий 0,10 г железа в 1 дм^3

Вносят 50,0 мг железного прута (чистота 99,99%) в 500 см³ мерную колбу. Добавляют 20 см³ воды, 5 см³ соляной кислоты (3.4) и подогревают на умеренном огне до полного растворения. Охлаждают и доводят водой до метки. 1 см³ этого стандартного раствора содержит 0,10 г железа. Стабилен на протяжении как минимум одного месяца в случае его хранения в толстостенных стеклянных или пластиковых бутылках.

Можно также использовать промышленные растворы железа.

3.10. железо, стандартный раствор I, соответствующий 20 мг железа в 1 дм³. Отбирают пипеткой 100 см³ основного раствора железа (3.9) в 500 см³ мерную колбу и доводят водой до метки. Раствор готовят ex tempore.

3.11. Железо, стандартный раствор II, соответствующий 1 мг железа в 1 дм³. Отбирают пипеткой 5 см³ стандартного раствора I в 500 см³ мерную колбу и доводят водой до метки.

4. Оборудование

Все стеклянные изделия вместе со стаканами для отбора проб, необходимо вымыть соляной кислотой (3.4) и сполоснуть водой перед использованием.

4.1. Спектрометр с призмой или дифракционной решеткой, пригодный для измерения при 510 нм.

4.2 Фотометрические кюветы с толщиной оптического слоя как минимум 10 мм, соответствующему предполагаемому поглощению исследуемого раствора.

4.3. Мембранный фильтр, средний размер пор 0,45 мкм.

4.4. Кислородная колба (колба Винклера) вместимостью 100 см³.

5. Отбор и подготовка проб

Внимание! Нужно применить соответствующие предохранительные средства, в случае окисления проб возможно выделение токсичных газов.

5.1. Проба отбирают пробу соответственно ISO 5667-1 и выполняют все особые рекомендации относительно видов исследуемых проб.

5.2. Общее железо:

Сразу после отбора проб необходимо пробу подкислить до pH 1. Для этого достаточно 1 см³ концентрированной серной кислоты (3.1) на 100 см³ пробы. В случае необходимости корректируют pH добавлением разведенной серной кислоты (3.2) с последующим учетом общего разведения.

5.3. Общее растворимое железо:

Фильтруют пробу (5.1) сразу после отбора. Подкисляют фильтрат до pH 1 (приблизительно 1 см³ серной кислоты (4.1) на 100 см³ пробы).

5.4. Железо (II):

Вносят 1 см³ серной кислоты (3.1) в кислородную колбу (4.4). Заполняют колбу полностью пробой, избегая контакта с воздухом.

6. Методика определения

6.1. Общее железо

6.1.1. Прямое определение

Как исследуемую пробу берут 50,0 см³ подкисленной исследуемой пробы (5.2). Если присутствует нерастворимое железо, окиси железа или комплексы железа, вносят исследуемую порцию (5.1) в 100 см³ колбу для кипячения и проведения дальнейшей предварительной обработки.

6.1.1.1. Окисление:

Добавляют в пробу 5 см³ раствора персульфата калия(3.8) и кипятят на маленьком огне приблизительно 40 мин, наблюдая за тем, чтобы объем раствора был не меньше, чем 20 см³. Потом раствор охлаждают и переносят в мерную на 50 см³ колбу и доводят водой до метки.

Если раствор стал мутным, то после окисления перед разведением раствор фильтруют через мембранный фильтр (4.3) в мерную колбу. Промывают фильтр небольшим количеством воды, добавляя промывные воды в фильтрат. И наполняют до метки водой.

6.1.1.2. Восстановление до железа (II):

переносят раствор в 100 см³ колбу, добавляют 1 см³ раствора солянокислого гидроксилamina (3.6) и тщательно перемешивают. Добавляют 5 см³ ацетатного буфера (3.5) и доводят рН до 3,5 — 5,5 (преимущественно 4.5).

6.1.1.3. Образование комплекса:

Для образования комплекса железа нужно добавить 2 см³ раствора 1,10-фенантролина (3.7) в раствор соответственно с 6.1.1.2 и поместить в темноту на 15 мин.

6.1.1.4. Фотометрические измерения

Измеряют поглощение раствора соответственно с 6.1.1.3, используя спектрометр (5.1) при 510 нм, и воду в кювете сравнения.

6.1.2. Общее железо после распада.

Вносят 50 см³ подкисленной исследуемой пробы (5.1) в 100 см³ химический стакан, добавляют 5 см³ концентрированной азотной кислоты (3.3) и 10 см³ соляной кислоты (3.4), потом нагревают смесь до 70-80 °С для достижения полного растворения. Через 30 мин добавляют 2 см³ серной кислоты (3.1) и испаряют раствор до появления белого дыма серного ангидрида. Избегают полного выкипания пробы. Охлаждают раствор до комнатной температуры и добавляют 20 см³ воды. Переливают его в 50 см³ мерную колбу и доводят уровень до метки водой.

Продолжают соответственно 6.1.1.2 -6.1.1.4.

6.2. Определение растворимого железа

Отбирают для анализа 50,0 см³ пробы (5.3) и переносят ее в колбу вместимостью 100 см³. Далее поступают как в 6.1.1.2-6.1.1.4.

6.3. Определение железа (II)

Отбирают 50,0 см³ пробы (5.4) и переносят ее в 100 см³ колбу.

Продолжают как в 6.1.1.3 и 6.1.1.4.

По возможности избегают контакта с воздухом.

6.4. Нулевое определение

Для нулевого определения готовят раствор, заменив 50 см^3 исследуемой пробы на 50 см^3 .

6.5. Построение калибровочных графиков

6.5.1. Приготовление стандартных растворов

Готовят ряд стандартных растворов железа для получения ряда концентраций, соответствующим ожидаемым концентрациям железа исследуемой пробы, методом перенесения соответствующих точно известным объемам раствора железа стандартных растворов (3.10 и 3.11) в ряд мерных колб вместимостью 50 см^3 каждая. Добавляют $0,5 \text{ см}^3$ разведенной серной кислоты (3.2) в каждую колбу и доводят водой до метки.

Потом обрабатывают калибровочные растворы аналогично исследуемым растворам, которые соответствуют каждой определяемой форме железа (см. 6.1-6.3).

6.5.2. Построение калибровочной зависимости

Для каждого ряда калибровочных растворов готовят калибровочный график, у которого абсцисса — это концентрация железа исследуемого раствора в мг на дм^3 , а ордината — определенное поглощение.

Необходимо построить отдельную калибровочную зависимость для каждой формы железа, для каждого фотометра и для каждого типа кюветы.

6.5.3. Частота калибрования

Периодически проверяют калибровочные зависимости и обязательно в случае использования новых реактивов.

7. Выражение результатов

Концентрацию железа, Q , выраженную в миллиграммах на дм^3 , вычисляют по формуле:

$$f \times (A_1 - A_0)$$

где f — показатель соответствующей калибровочной зависимости (6.5.2);

A_1 — поглощение исследуемого раствора (6.1.1.4);

A_0 — поглощение нулевого раствора (6.4).

2.4.9. Фотометрическое определение содержания кобальта в биоматериале

Принцип метода: определение основано на взаимодействии иона кобальта с нитрозо-R-солью, в результате чего образуется комплексное соединение, окрашенное в оранжево-красный цвет.

1. Предел обнаружения 0,5 мкг в анализируемом объеме раствора.
2. Предел обнаружения в воздухе 0,04 мг/м³ (расчетная).
3. Определению мешают: железо в 500-кратном, медь в 100-кратном. Никель в 50-кратном количестве.
4. Предельно допустимая концентрация металлического кобальта и его окиси 0,5 мг/м³.

2. Реактивы:

Кобальт двуххлористый, ч.д.а., ГОСТ 4525-68.

Стандартный раствор № 1 с содержанием 100 мкг/мл кобальта готовят растворением 0.0403 г трижды перекристаллизованного и высушенного на воздухе хлорида кобальта в мерной колбе в 100 мл дистиллированной воды.

Стандартный раствор № 2 с содержанием 10 мкг/мл кобальта готовят разбавлением раствора № 1 в 10 раз дистиллированной водой.

Кислота соляная, ГОСТ 14261-69, плотность 1,18 и 5%-ный раствор.

Кислота азотная, ГОСТ 11125-65, плотность 1,4 и разбавленная 1:1.

Натрий уксуснокислый, ч.д.а., ГОСТ 199-68, 50% и 5%-ные свежеприготовленные растворы.

Нитрозо-R-соль, ч., ГОСТ 10553-63, 0,1%-ный раствор.

Ход определения

В колориметрические пробирки отбирают по 5 мл пробы. Приливают по 1 мл раствора нитрозо-R соли, 2 мл 50%-ого раствора уксуснокислого натрия и ставят в кипящую водяную баню на 3 мин. Далее вводят из бюретки по 2 мл азотной кислоты 1:1, при этом образуется окраска от желтой до оранжевой. Через

15-20 мин измеряют оптическую плотность при $\lambda=400$ нм по сравнению с контролем.

Содержание кобальта в анализируемом объеме определяют по предварительно построенному калибровочному графику. Для построения калибровочного графика готовят шкалу стандартов согласно принципа: соотнося объемы стандартного р-ра №2 (мл) с определенным объемом Na уксуснокислого 5% получим определенное содержание кобальта (мкг).

Например, 0 мл стандартного раствора №2 + 5,0 мл 5% Na уксуснокислого = 0 мкг кобальта (Со). Далее на «+ 0,05 мл» каждый раз увеличивая объём стандартного раствора № 2 (+ 0,05) обязательно на этот же объём уменьшаем для 5% Na уксуснокислого, то получаем каждый раз содержание кобальта + 0,5 мкг Со (далее соответственно, добавив в стандартному раствору №2 заданный объём калибровки получим 0,1 мл его общий объём, отняв его от второго раствора, объём которого будет 4,95 = содержание кобальта составит 1)

Все пробирки шкалы обрабатывают аналогично пробам, измеряют оптическую плотность и строят график. Шкалой стандартов можно пользоваться для визуального определения. В этом случае ее готовят в колориметрических пробирках одновременно и аналогично пробам.

Концентрацию кобальта в мг/м^3 пробы X вычисляют по формуле:

$$X = (G \times V_1) / (V \times V_{20}),$$

Где G – количество кобальта, найденное в анализируемом объеме пробы, мкг; V_1 – общий объём пробы, мл;

V – объём пробы, взятый для анализа, мл;

V_{20} – объём пробы, отобранный для анализа и приведенный к стандартным условиям по формуле, л.

2.4.10. Колориметрическое определение массовой концентрации меди с диэтилдитиокарбаматом свинца

Принцип метода: метод основан на обменной реакции, происходящей в кислой среде (рН 1-2) между диэтилдитиокарбаматом свинца $[N(C_2H_5)_2CS_2]_2 \cdot Pb$, растворенным в четыреххлористом углероде, и ионами меди. Карбамат меди окрашен в желтый цвет, а карбамат свинца бесцветен. При замещении свинца медью слой четыреххлористого углерода окрашивается в желтый цвет.

1. Материалы и реактивы

Аммиак водный по ГОСТ 3760-79, 25%-ный раствор.

Натрия N,N-диэтилдитиокарбамат по ГОСТ 8864-71.

Медь сернокислая по ГОСТ 7165-78.

Кислота серная по ГОСТ 4204-77.

Кислота соляная по ГОСТ 3118-77.

Углерод четыреххлористый по ГОСТ 20288-74.

Свинец уксуснокислый по ГОСТ 1027-67.

Аммоний надсернокислый по ГОСТ 20478-75.

Все реактивы, используемые для анализа, должны быть квалификации чистые для анализа (ч.д.а.).

2. Подготовка к анализу

2.1. Приготовление основного стандартного раствора сернокислой меди.

0,393 г сернокислой меди $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ растворяют в мерной колбе вместимостью 1 дм³ в небольшом количестве дистиллированной воды, подкисленной 1 см³ серной кислоты, разбавленной 1:5, и доводят объем раствора до метки дистиллированной водой. 1 см³ раствора содержит 0,1 мг Cu^{2+} .

Срок хранения раствора — 3 мес.

2.2 Приготовление рабочего стандартного раствора сернокислой меди.

Рабочий раствор готовят разбавлением основного раствора в 100 раз дистиллированной водой. 1 см³ содержит 1 мкг Cu^{2+} . Применяют свежеприготовленный раствор.

2.3. Приготовление раствора диэтилдитиокарбамата свинца.

0,1 г уксуснокислого свинца растворяют в 50-100 см³ воды и добавляют 0,1 г растворенного в воде диэтилдитиокарбамата натрия. Образуется белый осадок

диэтилдитиокарбамата свинца. Раствор с осадком переносят в делительную воронку, прибавляют 250 см³ четыреххлористого углерода и взбалтывают. Осадок при этом растворяется в четыреххлористом углероде. Водный слой отбрасывают, а слой четыреххлористого углерода отфильтровывают через сухой фильтр в колбу вместимостью 500 см³ и разбавляют четыреххлористым углеродом до метки. Реактив может храниться около 3 мес в темной склянке.

Дистиллированная вода, не содержащая меди, перегнанная в стеклянном приборе, используется для приготовления растворов и разбавлений проб.

2.4. Проведение анализа

Определению меди мешает только висмут, когда его содержание в воде превышает 30 мкг/дм³. При объеме испытуемой пробы 100 мл медь можно определить в количестве от 2 до 60 мкг/дм³ Cu²⁺. При большем содержании меди отбирают соответственно меньший объем пробы.

100 см³ исследуемой пробы помещают в коническую колбу вместимостью 250 см³, добавляют 0,25 г надсернокислого аммония, растворяют соль и кипятят раствор в течение 25-30 мин. После охлаждения к раствору приливают 2-3 капли индикатора метилового оранжевого до появления розовой окраски, добавляют по каплям раствор аммиака до появления желтой окраски, приливают 5 капель соляной кислоты (1:1) и количественно переносят смесь в делительную воронку вместимостью 150-200 см³. Затем приливают из бюретки точно 1 см³ раствора диэтилдитиокарбамата свинца в четыреххлористом углероде и энергично встряхивают в течение 2 мин. Работа проводится в вытяжном шкафу.

После разделения жидкостей сливают слой четыреххлористого углерода в колориметрическую пробирку с притертой пробкой и сравнивают со шкалой стандартных растворов, приготовленных в тех же условиях.

Для приготовления стандартных растворов отбирают: 0,0; 0,2; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 и 6,0 см³ рабочего стандартного раствора, содержащего 1 мкг Cu²⁺ в 1 см³, разбавляют каждую порцию до 100 см³ дистиллированной водой и обрабатывают так же, как исследуемую пробу.

Шкала состоит из серии стандартных растворов с содержанием 0,0; 0,2; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 мкг Cu^{2+} . Шкала стандартных растворов устойчива в течение 5-6 дней при условии хранения в темном прохладном месте. При колориметрировании рассматривают окрашенный слой исследуемого образца сбоку, ставят пробирки в компаратор.

Если окраска исследуемого образца ярче окраски шкалы стандартного раствора, соответствующей содержанию меди 6 мкг или 60 мкг/дм^3 , определение повторяют. При этом исследуемую пробу разбавляют дистиллированной водой, не содержащей меди.

Рабочая длина волны — 435 нм.

3. Обработка результатов

Массовую концентрацию меди (X) в мг/дм^3 вычисляют по формуле

$$X = C/V$$

где C — концентрация меди по шкале стандартных растворов, мкг;

1000 — коэффициент пересчета микрограммов в миллиграммы;

V — объем пробы, взятой для определения, см^3 ;

1000 — коэффициент пересчета миллилитров в литры.

За окончательный результат анализа принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений, допускаемые расхождения (сходимость) между которыми не должны превышать $\pm 25\%$. Результат округляют до второго десятичного знака.

2.4.11. Колориметрическое определение массовой концентрации цинка

Принцип метода: метод основан на образовании окрашенного в красный цвет соединения цинка с дитизоном с дальнейшим извлечением дитизоната цинка в слой четыреххлористого углерода (при pH 4,5-4,8). Чувствительность метода составляет (объем исследуемой пробы 100 см^3) — 5 мкг/дм^3 .

1. Материалы и реактивы

Цинк металлический.

Аммиак водный по ГОСТ 3760-79, 25%-ный раствор.

Дитизон (дифенилтиокарбазон) по ГОСТ 10165-79.

Натрий уксуснокислый по ГОСТ 199-78.

Натрий серноватисто-кислый (тиосульфат натрия).

Кислота уксусная по ГОСТ 61-75.

Кислота соляная по ГОСТ 3118-77.

Углерод четыреххлористый по ГОСТ 20288-74.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709-72.

2. Подготовка к анализу

2.1. Приготовление основного стандартного раствора цинка

0,100 г чистого металлического цинка растворяют в пробирке 2 см³ соляной кислоты (1:1), раствор переносят в мерную колбу вместимостью 1 дм³ и доводят дистиллированной водой до метки. 1 см³ раствора содержит 100 мкг Zn²⁺.

2.2. Приготовление рабочего стандартного раствора цинка

Основной раствор разбавляют 1:100. 1 см³ раствора содержит 1 мкг Zn²⁺. Необходимо применять свежеприготовленный раствор.

2.3. Приготовление 2 н раствора уксуснокислого натрия

68 г CH₃COONa·3H₂O растворяют в дистиллированной воде и разбавляют до 250 см³ в дистиллированной воде.

2.4. Приготовление 2 н раствора уксусной кислоты

30 см³ ледяной уксусной кислоты растворяют в дистиллированной воде и доводят объем до 250 см³.

2.5. Приготовление буферного раствора (ацетатного)

Смешивают равные объемы 2 н раствора уксуснокислого натрия (CH₃COONa·3H₂O) и 2 н раствора уксусной кислоты (CH₃COOH) и очищают так же, как и 20%-ный раствор серноватисто-кислого натрия (см. ниже).

2.6. Приготовление 0,01 и 0,002%-ного раствора дитизона в четыреххлористом углероде (CCl₄)

0,05 г очищенного дитизона помещают в мерную колбу вместимостью 500 см³, растворяют в небольшом количестве CCl₄. Затем доводят до метки

четыреххлористым углеродом и получают 0,01%-ный раствор. Из 0,01%-ного раствора готовят 0,002 и 0,001-ные растворы. Для этого берут соответственно 20 и 10 см³ раствора дитизона и доводят до метки четыреххлористым углеродом в мерной колбе вместимостью 100 см³.

2.7. Приготовление 20%-ного раствора серноватистокислого натрия

20 г $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ растворяют в 80 см³ дистиллированной воды и очищают взбалтыванием в делительной воронке с 0,01%-ным раствором дитизона порциями по 5-10 см³ до тех пор, пока цвет дитизона не перестанет изменяться. Избыток дитизона удаляют встряхиванием раствора с чистым четыреххлористым углеродом порциями по 10 см³ до тех пор, пока четыреххлористый углерод не станет бесцветным.

3. Проведение анализа

В условиях прописи метода должно определить цинк в количестве от 5 до 50 мкг/дм³. Если потребуется определить количество цинка, выходящее за указанные пределы, отбирают на определение соответственно большее или меньшее количество пробы.

Определению цинка мешает содержание меди более 0,001 мг в исследуемой пробе. При содержании меди и более 0,001 мг ее связывают в комплекс путем добавления серноватистокислого натрия из расчета на каждые 10 мкг меди в исследуемой пробе 5 см³ 20%-ного раствора $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. При содержании окисного железа более 0,05 мг и закисного 0,03 мг в исследуемой пробе необходимо пробу предварительно разбавить очищенной дистиллированной водой и затем профильтровать через плотный фильтр, промытый горячей дистиллированной водой.

100 см³ исследуемой пробы, подкисленной при отборе (если исследуемая проба не была подкислена, ее подкисляют 2-3 каплями очищенной HCl (1:1)), помещают в делительную воронку вместимостью 150-200 см³, добавляют 5 см³ буферного раствора, перемешивают, приливают 1 см³ 20%-ного раствора серноватистокислого натрия и снова перемешивают. Добавляют из бюретки 4 см³ 0,002%-ного рабочего раствора в четыреххлористом углероде и энергично

встряхивают в течение 2 мин. Окраска раствора дитизона в зависимости от содержания цинка изменяется от зеленой до красной. Ставят воронку вертикально в штатив и ожидают расслоения жидкостей. Экстракт дитизоната сливают в колориметрическую пробирку с притертой пробкой. К водному раствору в делительной воронке приливают вновь 2 см³ раствора дитизоната. Энергично встряхивают в течение 2 мин и после разделения жидкостей сливают слой дитизоната цинка в ту же пробирку.

Перемешивают и сравнивают со стандартной шкалой, приготовленной в тех же условиях.

Для приготовления стандартной шкалы отбирают 0,0; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 и 5,0 см³ рабочего стандартного раствора Zn (1 см³ раствора содержит 1 мкг Zn²⁺), доводят объем дистиллированной водой до 100 см³ и обрабатывают так же, как исследуемую пробу. Образцы шкалы соответственно будут содержать 0,0-0,5-1,0-2,0-3,0-4,0-5,0 мкг Zn²⁺.

Шкала устойчива в течение трех суток при хранении в темном месте.

Если концентрация цинка в исследуемой пробе не превышает 50 мкг/дм³, весь цинк из исследуемой пробы обычно переходит в дитизонат при первом встряхивании. Цвет раствора дитизоната при повторном экстрагировании остается зеленым. Если цвет раствора дитизона будет иметь другую окраску, то это значит, что в пробе содержится цинка более 50 мкг/дм³. В этом случае определение повторяют, отбирая для анализа 50-25 см³ исследуемой пробы. При этом количество прибавляемого буферного раствора и серноватистокислого натрия остается прежним. Если необходимо брать еще меньшее количество исследуемой пробы, ее нужно разбавлять очищенной дистиллированной водой до объема 25 см³. При малых концентрациях цинка в исследуемой пробе (0,5-1,0 мкг в исследуемой пробе) экстракцию следует проводить более разбавленным раствором дитизона (0,001%). При первой экстракции добавляют 3 см³ 0,001%-ного раствора дитизона, второй раз 1 см³.

Полученные экстракты сливают вместе в пробирку с притертой пробкой и колориметрируют. Стандартную шкалу (0,5-1,0 мкг Zn^{2+}) готовят в тех же условиях.

3. Обработка результатов

Массовую концентрацию цинка (X) в мг/дм³ вычисляют по формуле

$$X = a / V$$

где a – содержание цинка по шкале стандартных растворов, мкг;

V – объем исследуемой пробы, взятый на определение, см³.

Допустимое расхождение между повторными определениями – 5 мкг/дм³, если содержание цинка не превышает 20 мкг/дм³, при более высоких концентрациях – 25 отн. %.

2.5. Методы статистической обработки полученных результатов

Статистический анализ результатов проведен с лицензионного пакета прикладных программ Statistica-10.0 (Statsoft) и адаптированной для медико-биологических исследований программы MedStat v. 5.2 (Copyright © 2003-2019). При анализе данных клинических исследований для оценки генеральной совокупности используются выборочные характеристики. для представления данных в работе использовались общепринятые характеристики: объем выборки, среднее значение, медиана, стандартная ошибка, стандартное отклонение. для проведения корректного статистического анализа полученных результатов использовались как параметрические (в случае, если данные подчиняются нормальному закону распределения), так и непараметрические критерии сравнения (в случае, если данные не подчиняются нормальному закону распределения). Для проверки распределения на нормальность использовался критерий Шапиро-Уилка, что позволяет корректно проводить проверку и при небольших объемах выборки.

В связи с тем, что для большинства исследуемых параметров характер распределения был отличным от нормального, использовали непараметрические

методы статистического анализа. Определяли медиану (Me), интерквартильный размах [Q1;Q3] (интервал между 25-м и 75-м перцентилями), доверительные интервалы, стандартное отклонение, Пирсона Хи квадрат. Для сравнения центров двух независимых выборок использовали U-тест Манна-Уитни, тест Колмогорова - Смирнова, а для выявления статистически значимых изменений показателей в парах связанных переменных – Т критерий Вилкоксона.

При проверке статистических гипотез выбор адекватного критерия проводился в соответствии с рекомендациями для клинических испытаний, критические значения рассчитывались на уровне значимости $p < 0,05$.

Различия между тремя и более группами устанавливали с помощью критерия множественных сравнений Краскела-Уоллиса (H). Для сравнения двух независимых выборок использовали U-критерий Манна-Уитни. Корреляционную взаимосвязь между признаками анализировали, рассчитывая ранговый коэффициент корреляции Спирмена (ρ), коэффициент парной корреляции Кендалла.

Для углублённого анализа полученных данных проводились процедуры дисперсионного анализа ANOVA наряду с использованием ряда апостериорных тестов, а также дискриминантного и канонического анализа.

РАЗДЕЛ 3

ОСОБЕННОСТИ АКТИВНОСТИ МЕТАЛЛОФЕРМЕНТОВ ОБМЕНА НУКЛЕОЗИДОВ В КАРЦИНОМАХ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКИХ, АДЕНОКАРЦИНОМАХ ЖЕЛУДКА И КИШЕЧНИКА

3.1 Особенности активности тимидинфосфорилазы и аденозиндезаминазы в тканях карцином различных локализаций

Особенности клеточной экспрессии тимидинфосфорилазы являются критериями прогноза выживаемости, одни авторы признают их коррелирующими с показателями ангиогенеза, другие – пролиферации. В данном исследовании впервые представлены результаты одновременного определения классической – фосфорилазной активности (т.н. катаболической, ТФк, обеспечивающей появление в клеточном метаболоме стимулятора ангиогенеза – 2-дезоксид-рибозы) и трансферазной (далее – анаболической, ТФан, способной с помощью косубстрата обеспечить генерацию тимидина – субстрата для тимидинкиназы).

Наряду с гомогенатами образцов карцином немелкоклеточного рака легких (НМРЛ) определением видов активности ТФ проводили в нетрансформированной ткани края резекции легкого, служивших контролем. Подобным образом проводилось сравнительное изучение видов активности ТФ в карциномах желудка и кишечника в сопоставлении с активностью в их нетрансформированных слизистых, служивших контролем.

Согласно результатам дисперсионного однофакторного анализа ANOVA как фосфорилазная активность (ТФк), так и трансферазная активность (ТФан) в раках различной локализации достоверно превышали значения в контроле. от контрольных тканей (Рисунок 3.1).

Для ТФк и для ТФан достоверных различий активности в зависимости от локализации не установлено. Согласно результатам, трансферазная активность ТФ сопоставима с фосфорилазной и оказывает значимое влияние на клеточный метаболом.

Следовательно, более корректным является их одновременное изучение.

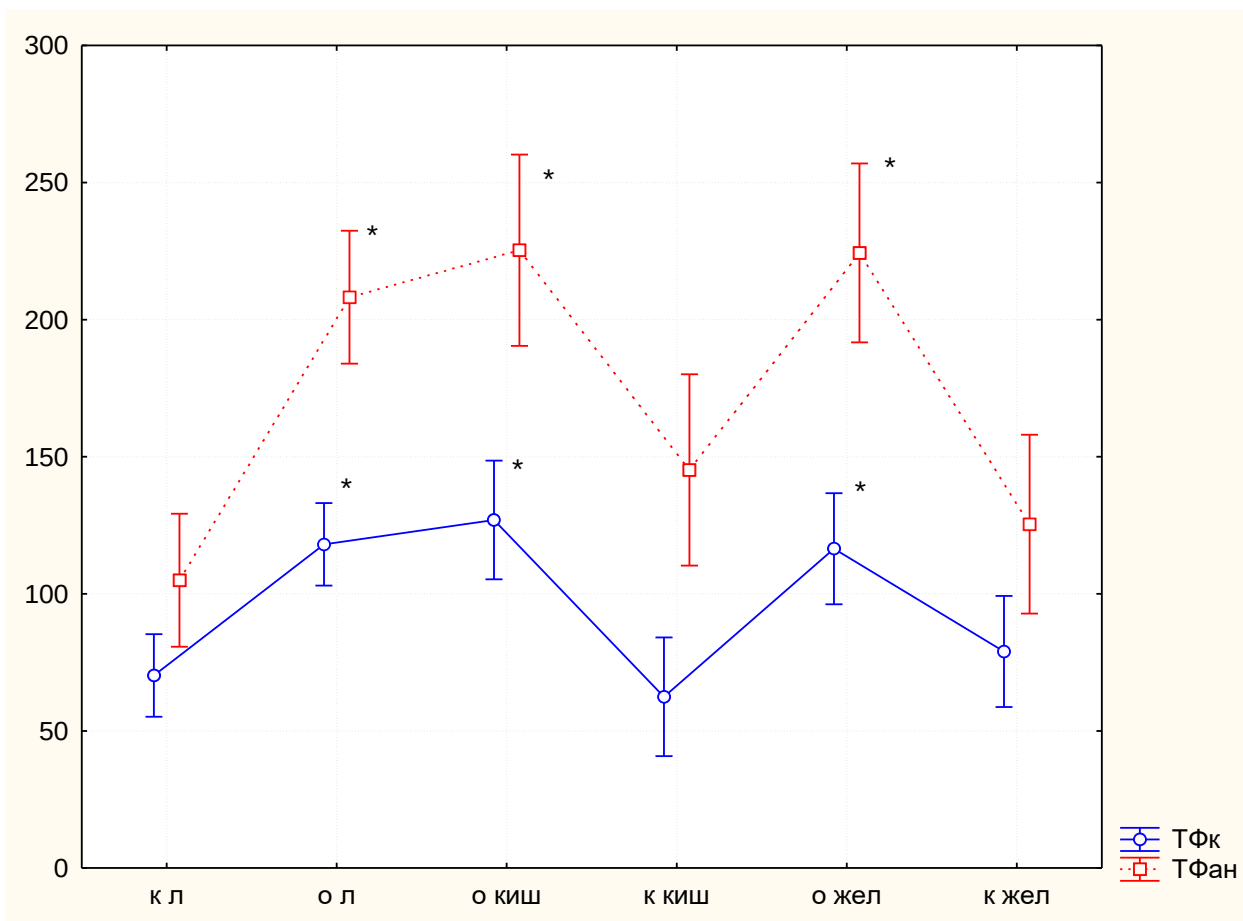


Рисунок 3.1 – Распределение видов активности ТФ в исследуемом материале

Примечания

1) к л – контрольная ткань, легкое; о л – опухоли легких; о киш – опухоли кишечника; к киш – нетрансформированная слизистая кишечника; о жел – рак желудка; к жел – нетрансформированная слизистая желудка;

2) Лямбда Уилкса = 0,51; F-критерий = 8,94; $p = 0,0001$.

О наличии кооперативных связей между видами тимидинфосфорилазной активности свидетельствуют данные корреляционного анализа (Рисунок 3.2).

Он проведен в выборках среди показателей активности ТФк и ТФан в опухолях и контрольных тканях, $p < 0,05$. Между трансферазной и фосфорилазной активностями установлена положительная связь, средней силы ($r = 0,54$).

Таким образом, для исследуемых эпителиальных опухолей желудка, кишечника, немелкоклеточного рака легких характерно повышение как фосфорилазной, так и трансферазной активностей тимидинфосфорилазы, которые могут способствовать реализации определенных клеточных, тканевых программ, а именно реализации ангиогенеза, определенных режимов пролиферации, резистентности к апоптозу.

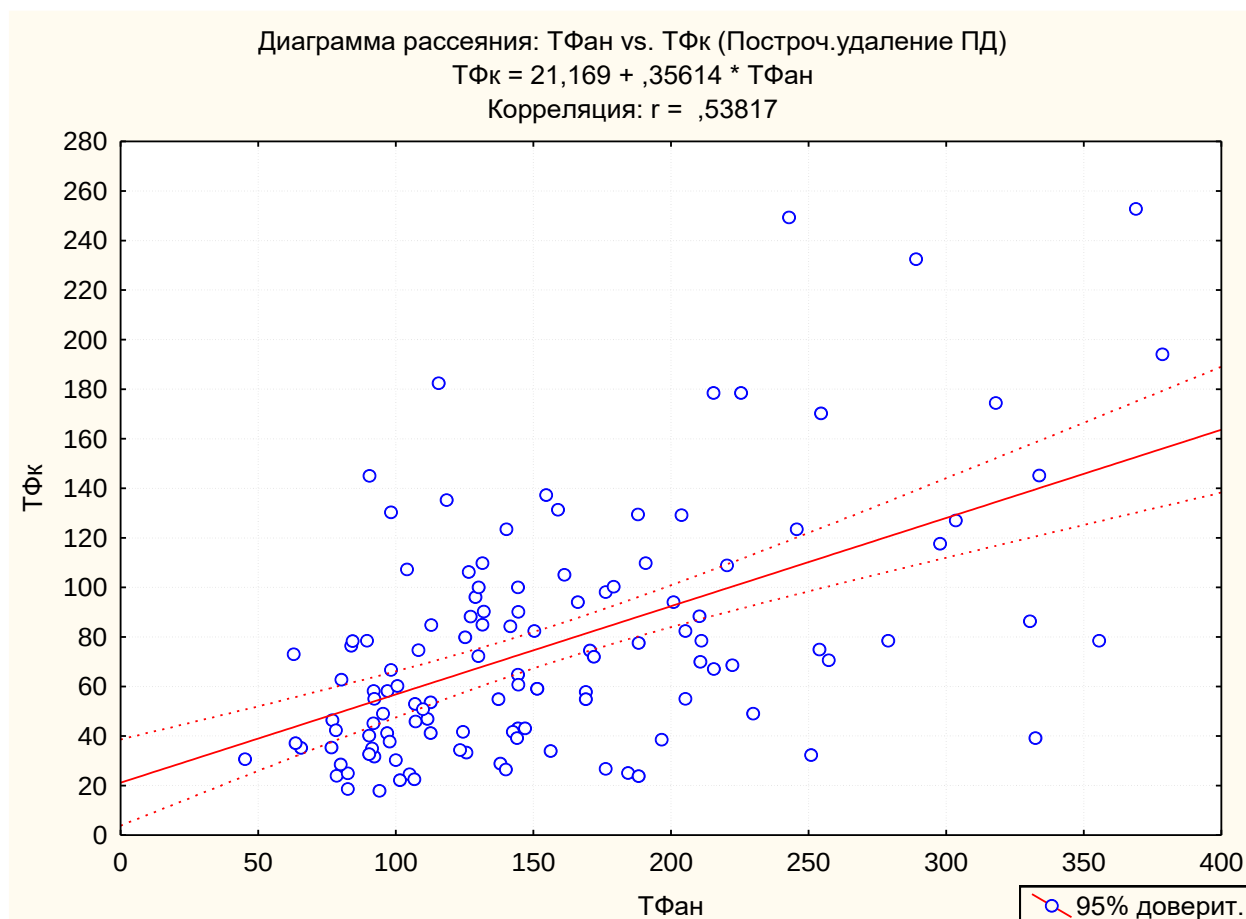


Рисунок 3.2 – Диаграмма рассеяния показателей видов активности

ТФан и ТФк в тканях

Повышение ТФк, ТФан происходит на фоне повышения активности АДА в опухолевой ткани (Таблица 3.1). Как следует из полученных результатов, для опухолей всех изучаемых локализаций регистрировали повышение активности данных ферментов. Особенности активности, связанных с локализацией не выявлено. Лишь в контроле в слизистых желудка и кишечника ТФан была незначительно выше, чем в нетрансформированных тканях легких ($p < 0,05$).

Таблица 3.1 – Активность тимидинфосфорилазы и аденозиндезаминазы в опухолях различной локализации, нмоль/мин·мг

	Легкие		Желудок		Кишечник	
	Контроль n = 63	РЛ n = 63	Контроль n = 52	РЖ n = 52	Контроль n = 48	КРР n = 48
ТФк	70,24 ± 3,60	118,06 ± 7,93 *	80,66 ± 6,84	118,44± 12,41*	62,47 ± 5,24	126,94 ± 3,94*
ТФан	104,96 ± 7,08	208,19 ± 15,91 *	129,29 ± 6,13 *	231,34± 18,09*	145,21 ± 14,82*	225,33± 23,69*
АДА	94,89 ± 19,88	184,47 ± 21,10*	132,89 ± 36,81	226,91± 28,11*	118,65 ± 25,73	212,04 ± 22,37*

Примечание – * – уровень значимости $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

Отметим, что лишь для ТФан в слизистых желудка и кишечника имелись достоверные различия с активностью в легочной нетрансформированной ткани. Это хорошо согласуется с мнением о большей интенсивности процессов пролиферации в слизистых ЖКТ, чем в паренхиме легких.

Также обращает на себя внимание тот факт, что повышение активности АДА в опухолях происходит симметрично повышению видов активности ТФ.

Есть указания на то, что в качестве косубстрата - источника дезоксипентозы для трансферазной активности ТФан может служить дезоксиинозин, который, в свою очередь, может быть продуктом аденозиндезаминазной реакции.

Далее провели расчет показателя ранговой корреляции Спирмена. Оказалось, что лишь между ТФан и АДА имеется сильная положительная корреляционная связь (ранговый однофакторный анализ, показатель ранговой корреляции Спирмена 0,72). В то время как для ТФк и АДА такой связи не установлено ($r = 0,35$).

Данные результаты указывают на более тесную связь для ТФан и АДА, что согласуется с мнением о возможной их кооперации активности. Если АДА нарабатывает дезоксиинозин, потребляемый затем в трансферазной реакции, катализируемой ТФан, в качестве источника 2-дезоксид- D-рибозы. Отметим, что такая кооперативная связь выявлена и описана для пары АДА – ТФан нами впервые. Для уточнения данной гипотезы далее на примере опухолей ЖКТ проведен однофакторный дисперсионный анализ ANOVA особенностей опухолевой активности ТФан и АДА (Рисунок 3.3).

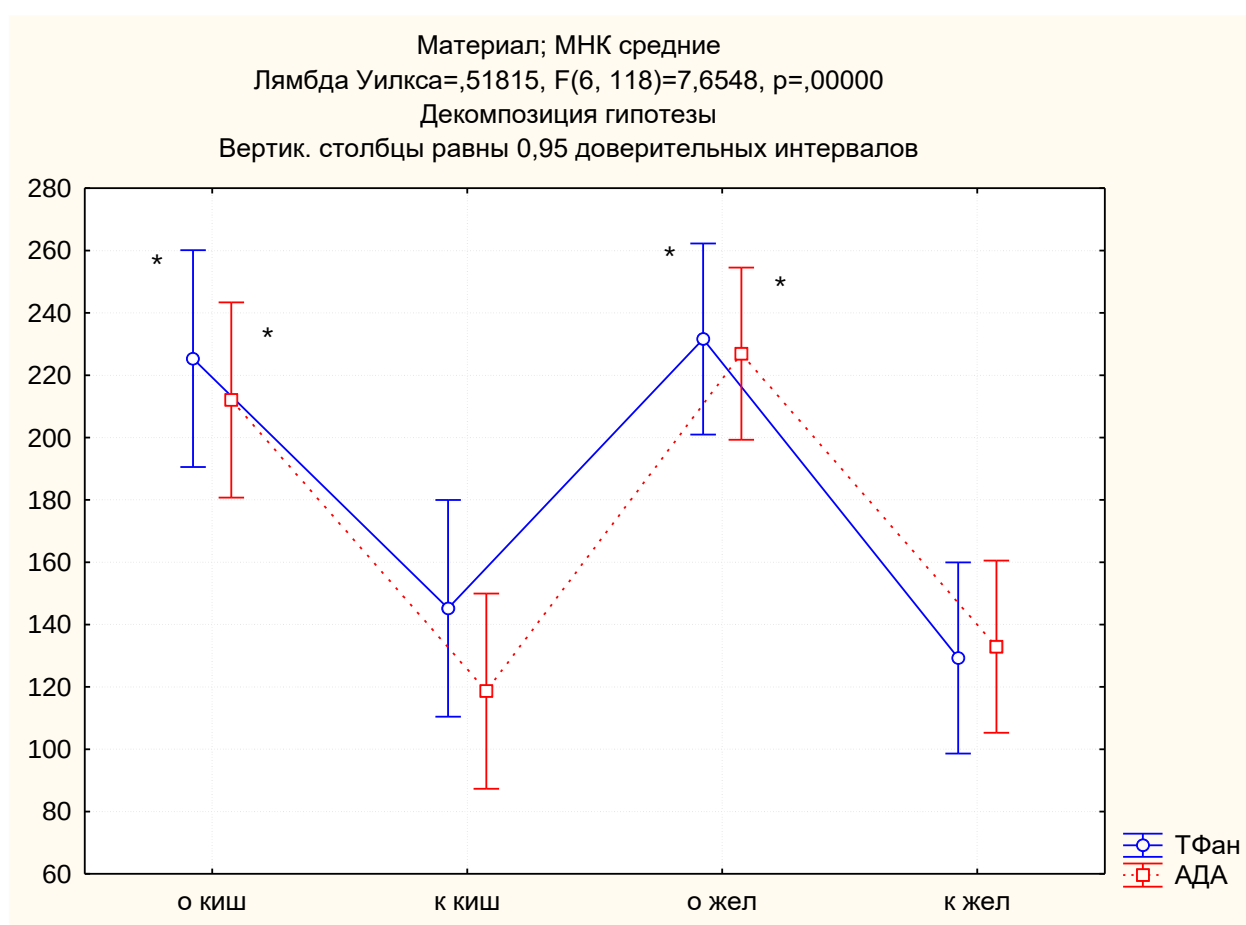


Рисунок 3.3 – Особенности активности АДА и ТФан в опухолях ЖКТ,
нмоль/мин·мг

Примечание – о киш – опухоли кишечника, к киш – нетрансформированная слизистая кишечника, о жел – опухоли желудка, к жел – нетрансформированная слизистая желудка.

Согласно представленным результатам однофакторного дисперсионного анализа, действительно, в ходе исследования особенностей активности ферментов обмена дезокситимидина и аденозина выявлена тесная кооперативная активность ТФан и АДА, указывающая на возможность формирования дезокситимидина за счет перераспределения 2-дезоксид-рибозы дезоксиинозина. Далее можно предположить дальнейшую трансформацию дезокситимидина в тимидилат в результате тимидинкиназной реакции его «запасного пути» синтеза.

Следует заметить, что установленные показатели опухолевой активности могут способствовать формированию её определенных фенотипических особенностей. Поскольку скорость синтеза тимидилата, как известно, сопряжена с процессами репликации ДНК и пролиферативной активностью тканей. Следовательно, можем предположить изменение режимов экспрессии показателя пролиферации - Ki-67.

В данном исследовании далее будут сопоставлены данные ферментативной активности с такими характеристиками как экспрессия CD34 и Ki-67.

Отметим, что при проведении процедуры рангового однофакторного анализа Крускала-Уоллиса, множественных сравнений с использованием критерия Данна, специализированных для обработки непараметрических значений исследуемых показателей, мы уточним действительность описываемых тенденций при помощи инструментов анализа ANOVA (Рисунок 3.1.). Действительно, при изучении видов активности ТФ достоверных различий в зависимости от локализации опухоли не выявлено. Ранговый однофакторный анализ Крускала-Уоллиса, множественные сравнения, критерий Данна: переменные ТФк рак ЖКТ и ТФк рак легких $Q=1,84$. Различие не является статистически значимым, $p>0,05$. Переменные: ТФан рак ЖКТ и ТФк рак легких $Q=1,23$. Различие не является статистически значимым, $p>0,05$.

Далее выполнен однофакторный анализ по определению однородности полученных выборок по активностям ТФк, ТФан, АДА в раках желудка, кишечника, легких. Согласно однофакторному дисперсионному анализу ANOVA выборка опухолевой активности ТФ была неоднородной, однако как было

описано выше, неоднородность выборок не была связана с локализацией рака (Рисунок 3.4).

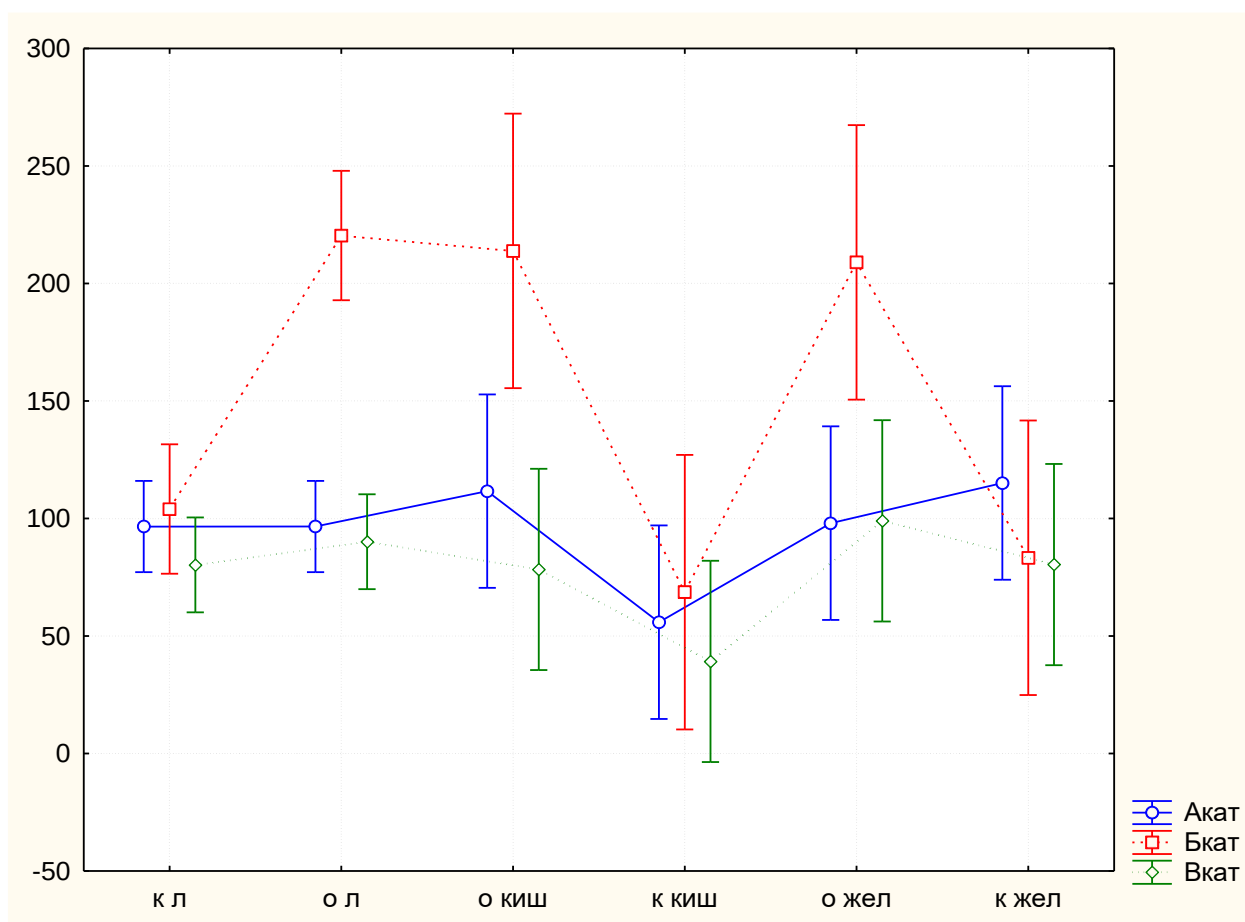


Рисунок 3.4 – Распределение значений активности ТФк в исследуемом материале
Примечания

1) к л – контрольная ткань, легкие; о л – опухоли легких; о киш – опухоли кишечника; к киш – нетрансформированная слизистая кишечника; о жел – рак желудка; к жел – нетрансформированная слизистая желудка.

2) Лямбда Уилкса = 0,15; F-критерий = 3,24; $p = 0,0009$.

Согласно результатам ANOVA по активности ТФк в опухолях выделены несколько подгрупп, причем достоверных различий внутри них в зависимости от локализации рака нет, как нет и достоверных различий по сравнению с контрольными тканями, кроме одной подгруппы (Б), которую составили опухоли

всех исследуемых локализаций, и в которой активность ТФк была достоверно выше контроля ($p=0,0009$).

При этом оказалось, что именно в ней на фоне повышения фосфорилазной активности (Рисунок 3.4), ее трансферазная активность в этих же опухолях не отличалась достоверно от контроля. Данные об особенностях активности ТФк в подгруппах, сформированных по результатам статанализа, характерные для эпителиальных опухолей ЖКТ и немелкоклеточного рака легких представлены в таблице 3.2.

Таблица 3.2 – Внутригрупповые особенности активности тимидинфосфорилазы в опухолях различной локализации, нмоль/мин·мг

Е	Легкие		Желудок		Кишечник	
	Контроль n = 79	РЛ n = 54	Контроль n = 35	РЖ n = 32	Контроль n = 46	КРР n = 32
Подгруппа А						
ТФк	96,59 ± 12,43	96,62 ± 6,07	115,13 ± 15,13	98,05 ± 11,77	55,89 ± 14,71	71,67 ± 17,55
Подгруппа Б						
ТФк	104,06 ± 11,13	220,42± 15,98**	83,34 ± 4,91	208,99± 23,56**	68,67 ± 13,67	213,88± 35,45**

Примечание – * – $p<0,05$; ** - $p<0,01$.

Далее анализировали особенности трансферазной активности ТФ в этих подгруппах. Ниже предложены диаграммы ANOVA (Рисунок 3.5), характеризующие предыдущие подгруппы А и Б по результатам особенностей активности ТФк (левая диаграмма) в раке легкого с одновременным сопоставлением их индивидуальных значений активности ТФан (правая диаграмма) .

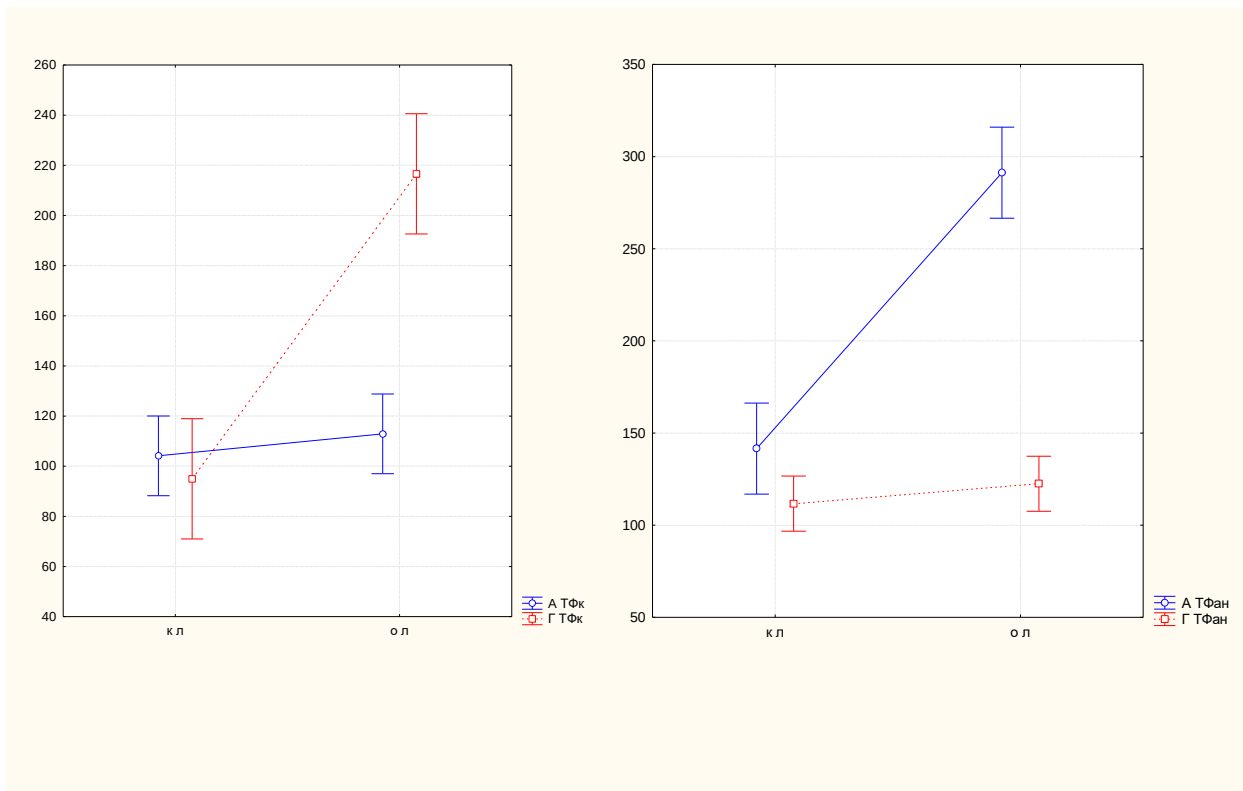


Рисунок 3.5 – Внутригрупповые особенности видов активности тимидинфосфорилазы в тканях немелкоклеточного рака легкого:

левая диаграмма ТФк, правая – ТФан

Примечание – сплошная кривая – данные видов активности ТФ в подгруппе А; пунктирная кривая – в подгруппе Б.

Подобные тенденции в т.н. подгруппах характерны и для эпителиальных опухолей ЖКТ (на примере эпителиальных опухолей кишечника (Рисунок 3.6)).

Согласно Рисунку 3.6 видим, что в подгруппе А первые два бокса представляют индивидуальные особенности фосфорилазной активности ТФк в их подгруппе. Согласно результатам различия в активности ТФк в контроле и в опухолях данной подгруппы отсутствовали. Данные особенности, описанные для случаев рака, отнесенных при обработке результатов в эту подгруппу на основании значений их индивидуальной активности ТФ в указанную подгруппу А, также указывают, что на фоне отсутствия различий в активности ТФк по сравнению с контролем для их активности ТФан, наоборот, различия с контролем достоверны – ТФан активность этой подгруппы опухолей достоверно превышает значения контроля (следующая пара боксов – значения ТФан в контроле,

следующий – в опухоли). Таким образом выборки значений активности ТФ к и ТФан среди опухолей одной локализации неоднородны. Они представлены несколькими подгруппами согласно особенностям видов активности ТФ. Эта неоднородность среди опухолей одной локализации и морфологии выявлена и для НМРЛ (Рисунок 3.5), так и для опухолей ЖКТ, согласно Рисунку 3.6.

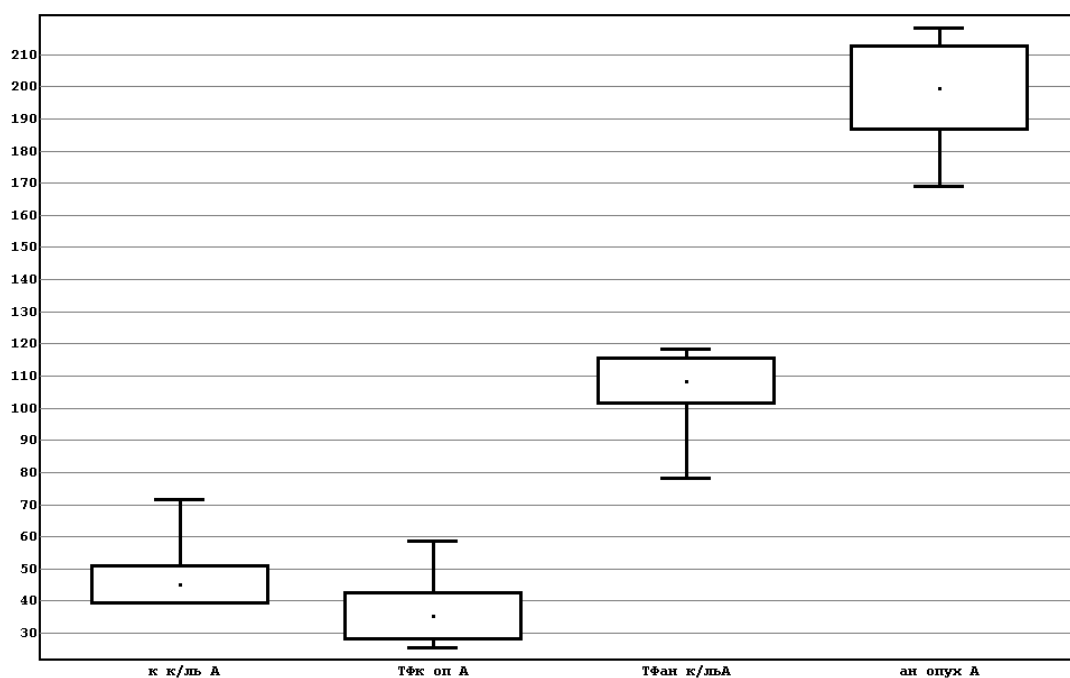


Рисунок 3.6 – Повышение трансферазной активности фермента (ТФан) в подгруппе А при колоректальном раке

Далее проанализировали индивидуальные особенности видов активности ТФ с их активностью АДА. Согласно результатам рангового корреляционного анализа для особенностей активности ферментов катаболизма нуклеотидов при раках различной локализации установлены корреляции в соответствующих подгруппах (Таблица 3.3).

Согласно результатам анализа можно отметить, что во всех подгруппах, для значений активности АДА и ТФан не только в тканях опухолей, но и для их нетрансформированных тканей (контроль, к-ль; Таблица 3.3) были характерны положительные сильные связи (показатель ранговой корреляции Спирмена $\rho = 0,77, 0,72, 0,71; p < 0,05$).

Это указывает на устойчивую кооперативную активность между ТФан и АДА.

Таблица 3.3 – Ранговые корреляции Спирмена активности ферментов в тканях

	ТФк к-ль	ТФк А гр	ТФк Б гр	ТФан к-ль	ТФан А гр	ТФан Б гр
ТФк к-ль	1,00	0,87	-	-	0,27	-
ТФк А гр	0,87	1,00	-	0,34	0,44	-
ТФк Б гр	-	-	1,00	0,40	-	0,81
ТФан к-ль	0,29	0,34	0,40	1,00	0,83	0,31
ТФан А гр	0,27	0,74	-	0,83	1,00	0,70
ТФан Б гр	-	-	0,81	0,31	0,70	1,00
АДА	0,25	0,31	0,72	0,77	0,72	0,71

Примечание – указанные в таблице корреляции значимы на уровне $p < 0,05$.

Выявленная метаболическая неоднородность в исследуемых опухолях в дальнейшем была сопоставлена с их показателями ангиогенеза и пролиферации. Причем в литературе имеются противоречивые данные, описывающие в одних работах связь уровней экспрессии (реже – активности) для ТФ (для фосфорилазной активности, то есть ТФк) с каким либо одним из этих показателей. Нами проанализированы индивидуальные особенности обоих видов активности ТФ (ТФк и ТФан) как с показателем ангиогенеза (CD34), так и пролиферации (Ki-67).

При сопоставлении особенностей ферментативной активности ТФ в опухолях легких и желудка с данными экспрессии CD34, установили, что активность ТФк в тканях НМРЛ с низким уровнем экспрессии CD34 составляла $35,16 \pm 8,62$ нмоль/мин·мг, лишь незначительно превышая индивидуальный контроль.

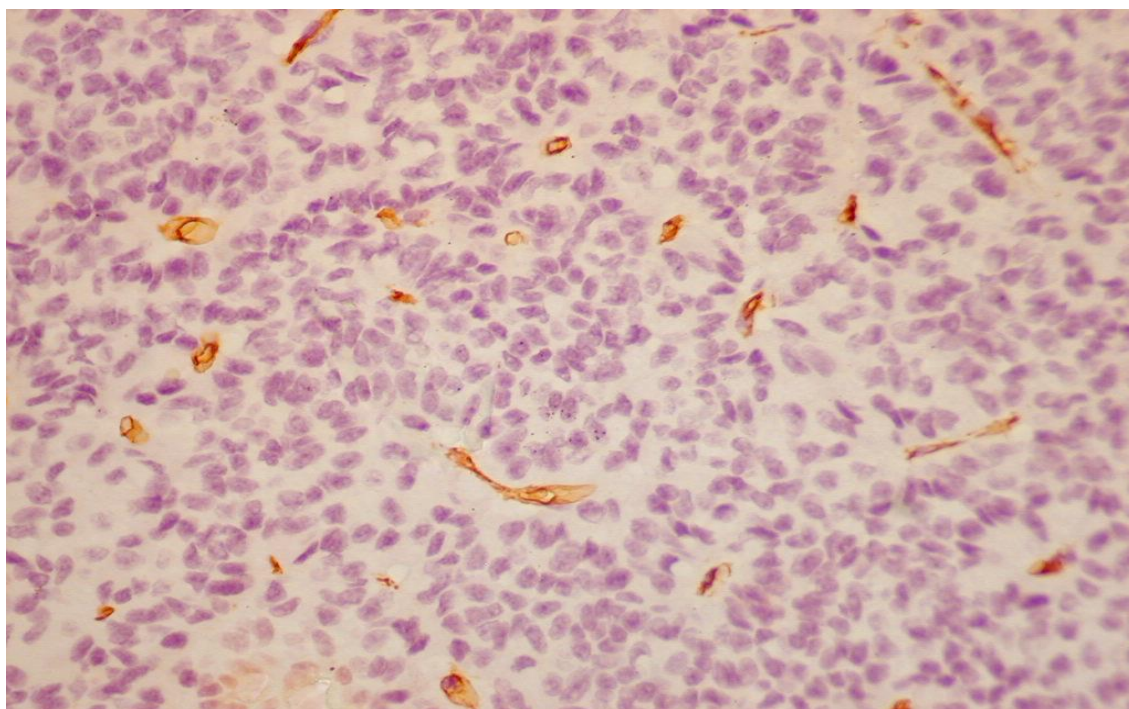


Рисунок 3.7.А – Умеренная длина сосудистого русла в препарате НМРЛ.
Тонкостенные сосуды капиллярного типа с экспрессией CD 34. (ИГХ метод; x400)

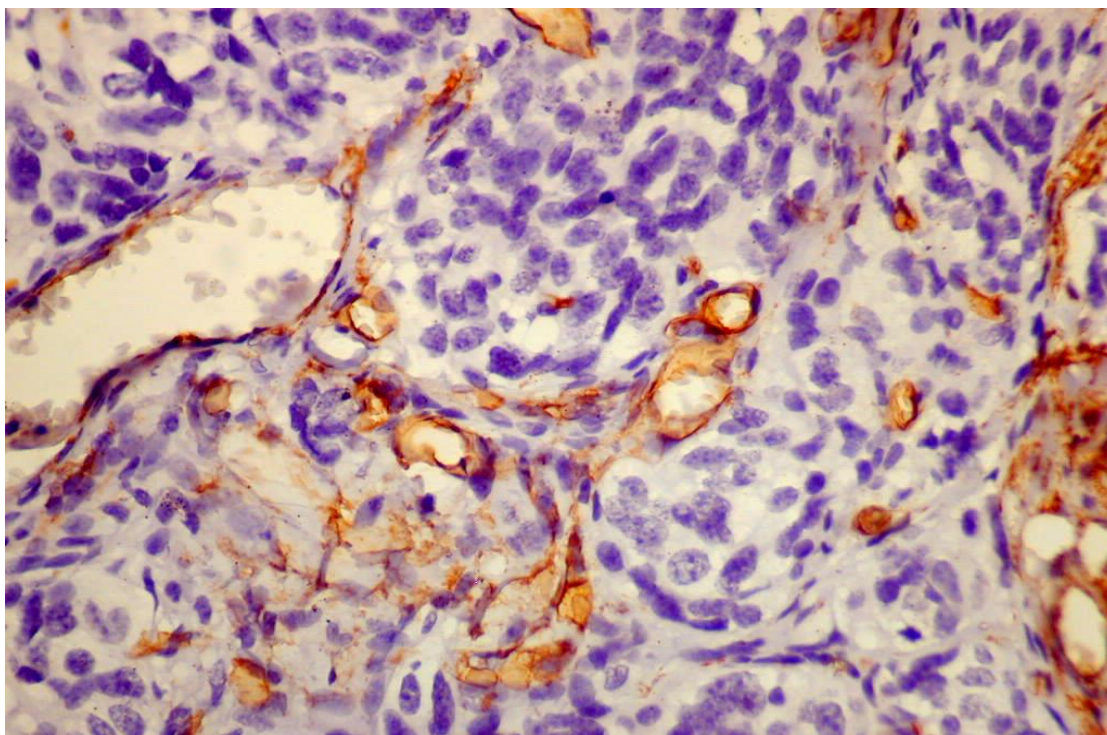


Рисунок 3.7.Б – Большая длина сосудистого русла в препарате НМРЛ.
Экспрессия в эндотелии маркера CD34. (ИГХ метод; x400)

В подгруппе с умеренной экспрессией CD34 в образцах опухолей подгруппы образцов регистрировали активность ТФк в пределах $77,17 \pm 20,22$ нмоль/мин·мг (Рисунок 3.7. А); при высоких уровнях экспрессии CD34 - повышалась до $136,24 \pm 25,43$ нмоль/мин·мг (Рисунок 3.7. Б).

В результате между изменениями активности ТФк и показателем ангиогенеза CD34 установлена прямая корреляционная связь (коэффициент парной корреляции Кендалла 0,76; $p < 0,05$).

Это хорошо согласуется с данными, что снижение уровня тимидина приводит к продвижению и пролиферации эндотелиоцитов, а 2-дезоксид-Д-рибоза индуцирует их миграцию и формирование эндотелиальных тяжей в коллагеновом геле.

Итак, на примере случаев рака легких установлена метаболическая неоднородность опухолей по активности ТФк (Рисунок 3.5) и ее корреляция с уровнями индивидуальной экспрессии показателя ангиогенеза CD34.

Эти тенденции подтверждает и сравнение формы распределения двух выборок – переменные: ТФк контроль легкое, ТФк опухоль. Критерий хи-квадрат: Хи-квадрат=25,11, число степеней свободы $k=4$. Распределения отличаются на уровне значимости $p < 0,001$.

Сравнение формы распределения двух выборок - переменные: ТФан контроль легкое, ТФан опухоль. Критерий хи-квадрат. Также указывает на неоднородность выборки на примере ТФан в раке легкого, т.к. Хи-квадрат=32,20, число степеней свободы $k=4$. Распределения отличаются на уровне значимости $p < 0,001$. Оказалось, что это может быть связанным с индивидуальными режимами пролиферации опухоли.

Так активность ТФан в тканях РЛ с низким уровнем экспрессии Ki-67 (5 – 15 %) составляла $78,25 \pm 8,61$ нмоль/мин·мг; при умеренной экспрессии Ki-67 (до 20 – 25%), соответственно, $113,6 \pm 27,8$ нмоль/мин·мг; при высоких уровнях Ki-67 ($\geq 40\%$) – до $221,6 \pm 42,6$ нмоль/мин·мг.

Согласно результатам корреляционного анализа между уровнями ядерной экспрессии Ki-67 и индивидуальными особенностями тканевой трансферазной

активности ТФан установлена прямая сильная связь - коэффициент парной корреляции Кендалла 0,79; $p < 0,05$.

Итак, согласно результатам анализа особенностей опухолевой активности установлена неоднородность их выборок как при раке легкого, так при раке ЖКТ. Согласно характеру их распределения, как это было показано для опухолей легких, можно выделить 4 подгруппы как по активности ТФк (Хи-квадрат=25,11; число степеней свободы $k=4$; распределения отличаются на уровне значимости $p < 0,001$), так и по активности ТФан (Хи-квадрат=32,20, число степеней свободы $k=4$; распределения отличаются на уровне значимости $p < 0,001$). Это же характерно и для выборок активностей ТФк, ТФан опухолей ЖКТ.

Общие тенденции особенностей видов активностей ТФ в этих подгруппах таковы:

А подгруппа – ТФан опухоли в 1,6 раза и больше превышала контроль,

Б подгруппа – ТФк опухоли в 1,6 – 2 раза выше контрольной,

В – при сопоставлении с индивидуальным контролем виды активности ТФ в опухоли выше, но достоверно не отличались от активности в контрольной выборке,

Г – как ТФк, так и ТФан опухоли в 1,6 – 2 раза выше контрольных.

Распределение количества случаев опухолей, соответствовавших по видам активности ТФ представлено в Таблице 3.4.

Отметим, что подгруппа А подгруппа наиболее многочисленная (Таблица 3.4). А вместе с подгруппой Г, которую также характеризует высокая опухолевая трансферазная активность, можно утверждать о существенном вкладе в опухолевый метаболит именно этого вида активности так как удельный вес таких опухолей в перечисленных выше выборках распределился следующим образом: НМРЛ составил 70%, РЖ 89%, КРР 76%. Как видим, что в карциномах всех изученных локализаций преобладали случаи биопрепаратов опухолей с выраженной трансферазной активностью ТФан, способствовавшей наработке субстрата тимидинкиназы – дезокситимидина. Это способствовало более выраженному синтезу тимидилата, следовательно повышению пролиферативной

активности в тканях карцином по сравнению с нормой. Это хорошо согласуется с известным свойством карцином, а также с индивидуальными особенностями их ядерной экспрессии маркера пролиферации Ki-67.

Таблица 3.4 – Структура случаев опухолей немелкоклеточного рака легких, эпителиальных опухолей желудка, кишечника в зависимости от особенностей видов активности тимидинфосфорилазы

	Подгруппа А	Подгруппа Б	Подгруппа В	Подгруппа Г
РЛ (n = 63)	32 (50%)	11 (19%)	7 (11%)	13 (20%)
РЖ (n = 52)	42 (80%)	6 (11%)	-	4 (9%)
КРР (n = 48)	29 (61%)	5 (9%)	7 (15%)	7 (15%)

Таким образом, эпителиальные опухоли желудка и кишечника, немелкоклеточный рак легкого характеризует высокая трансферазная активность, либо сочетанная как трансферазная, так и фосфорилазная активность тимидинфосфорилазы (как указано выше: НМРЛ 70%, РЖ 89%, КРР 76%). Таким образом трансферазная активность ТФ сопоставима с фосфорилазной, может оказывать значимый эффект на клеточный метаболит, следовательно, более корректным является их одновременное изучение.

Установлены кооперативные эффекты между АДА и ТФан, о чем свидетельствуют выявленные как во всех подгруппах и контроле, положительные сильные связи, так и во всей совокупности опухолей - $r = 0,72$.

Согласно проведенному анализу, в эпителиальных опухолях желудка, кишечника, немелкоклеточном раке легких фосфорилазная и трансферазная активности тимидинфосфорилазы имеют свои особенности, которые в свою очередь связаны индивидуальными характеристиками ангиогенеза и дедифференцировкой (CD34), а именно ТФк; с интенсивностью ядерной экспрессии Ki-67 – ТФан. Так установленных корреляции с уровнями ядерной экспрессии Ki-67 и ТФан - коэффициент парной корреляции Кендалла 0,79;

изменениями активности ТФк и показателем ангиогенеза CD34 - коэффициент парной корреляции Кендалла 0,76; $p < 0,05$.

Поскольку ЭМТ часто имеет очаговый характер, диагностическим гистологическим, иммуно-гистохимическим исследованиям в тонких тканевых срезах может помочь биохимический метод – определение метаболических белковых маркеров в гомогенатах опухоли, характеризующих большой объем материала. Вследствие установленных корреляций с уровнями ядерной экспрессии Ki-67 и CD34 – виды активности ТФ могут стать перспективным биохимическим маркером ЭМП.

3.2. Особенности активности тимидинфосфорилазы, аденозиндезаминазы в плазме крови при раке различных локализаций

Ранее было показано, что особенности тканевой активности ферментов обмена нуклеозидов коррелируют с их активностью в крови. Данное свойство повышает диагностическую ценность показателя.

В рамках данного исследования наряду с определением активности ферментов в гомогенатах тканей опухоли особенности их тканевой активности сопоставляли с активностью в плазме крови.

Ранее было установлено, что особенности активности ферментов в крови могут зависеть от возраста. Поэтому показатели контрольных значений должны рассчитываться для каждой возрастной группы (как правило на период 10 лет и каждые последующие периоды).

Как было указано в Разделе 2, исследование проводилось у пациентов чей возраст в среднем составлял: для НМРЛ 62,2 года; среди больных РЖ, РК:средний возраст 60,8 года. В группах преобладали пациенты пожилого возраста.

Исследования особенностей ферментативной активности в крови проводили с учетом возраста (Рисунок 3.8).

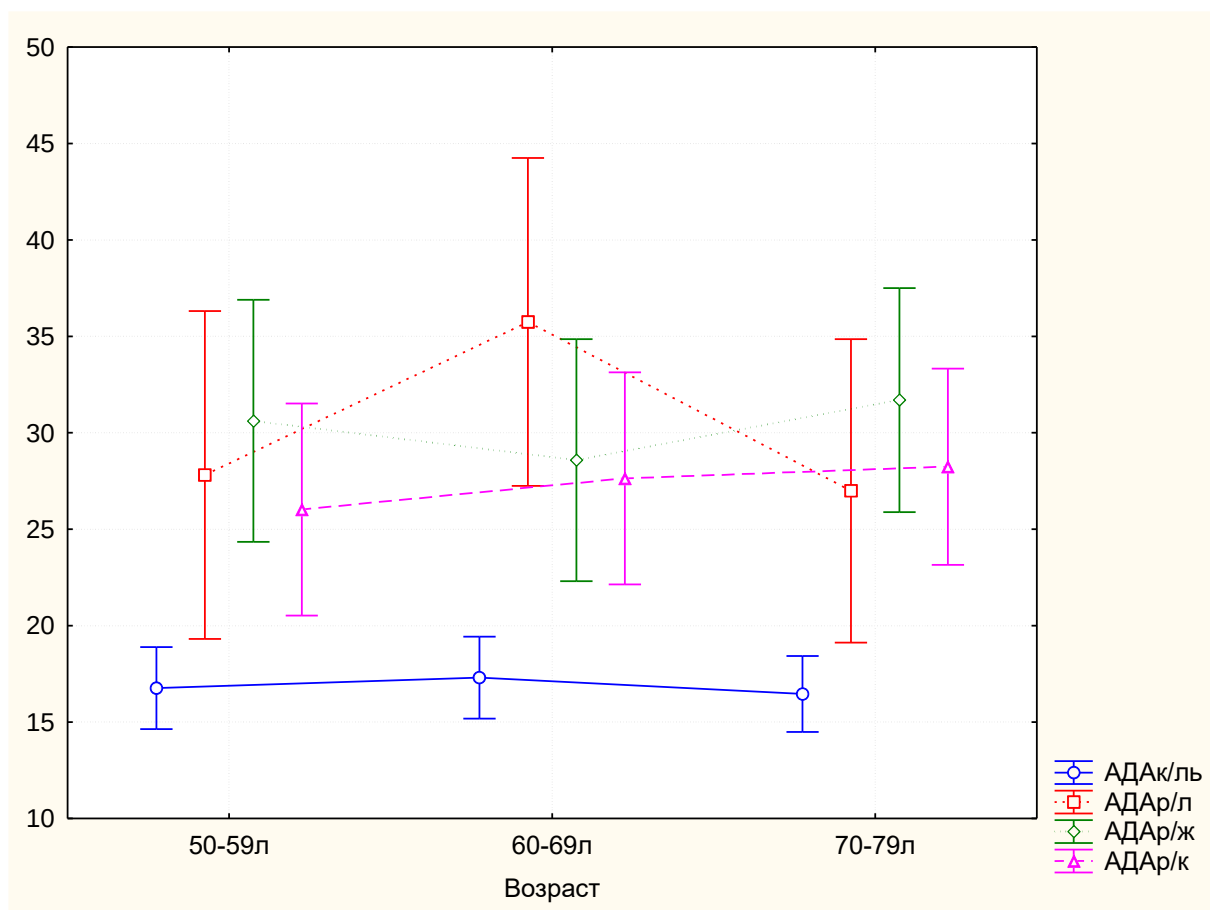


Рисунок 3.8 – Возрастные особенности активности АДА в плазме периферической венозной крови в контрольной группе и при раках различной локализации, нмоль/мин·мг

Примечание – к/ль – контроль, р/л – рак легких, р/ж – рак желудка, р/к – рак кишечника.

Согласно результатам однофакторного дисперсионного анализа (Рисунок 3.8) ANOVA, у лиц группы контроля, а также у больных раком распространенных стадий исследуемых локализаций возрастных особенностей активности АДА в плазме в возрасте от 50 до 79 лет не выявлено.

Как видно по результатам однофакторного дисперсионного анализа ANOVA при патологии у больных раком различных локализаций активность фермента была достоверно выше контроля (Таблица 3.5). При этом как и раньше в тканях, так и в плазме крови для показателей активности АДА у пациентов с НМРЛ, РЖ, РК не установлены особенности активности в зависимости от локализации

опухоли, но не отличалась между группами различных локализаций рака (Таблица 3.5).

Таблица 3.5 – Активность аденозиндезаминазы в плазме крови в контрольной группе и при распространенных раках различной локализации в зависимости от возраста, нмоль/мин·мг

Диагноз	40 – 49 лет	50 – 59 лет	60 – 69 лет	70 – 79 лет
Контроль	18,31 ± 2,21	17,36 ± 2,54	16,18 ± 2,60	17,70 ± 2,28
РЛ	-	26,99 ± 3,71*	35,75 ± 4,01 *	27,81 ± 4,01*
РЖ	-	31,70 ± 2,74 *	28,58 ± 2,96 *	30,62 ± 4,12 *
КРР	-	28,24 ± 2,49 *	27,64 ± 2,59 *	26,02 ± 2,59 *

Примечание – указанные в таблице корреляции значимы на уровне $p < 0,05$.

При исследовании особенностей тромбоцитарной активности фермента и проведении дисперсионного анализа установили однонаправленность изменений активности АДА при патологии (Таблица 3.6)

Согласно результатам анализа ANOVA активность АДА в плазме богатой тромбоцитами достоверно выше, чем в контроле соответствующей возрастной группы ($p = 0,11$). В то же время у лиц пожилого возраста, как в контрольной группе, так и у пациентов, страдающих раком различных локализаций достоверных различий в активности фермента в зависимости от возраста не установлено. В дальнейшем при изучении особенностей активности тромбоцитарно богатой плазмы, группы формировали согласно локализации опухоли (Таблица 3.6).

Выявленные особенности по более высокой активности тромбоцитарной АДА по сравнению с её активностью в плазме крови хорошо согласуются с особенностями клеточной биологии тромбоцитов, поскольку аденозин обладает

рядом регуляторных эффектов для их функций. Именно поэтому уровни тромбоцитарного аденозина сбалансированы, контролируются АДА.

Таблица 3.6 – Активность аденозиндезаминазы в плазме крови и плазме, богатой тромбоцитами в контрольной группе и при распространенных раках различной локализации в зависимости от возраста, нмоль/мин·мг

	Контроль (n=38)	НМРЛ (n=28)	РЖ (n=18)	КРР (n=20)
плазма	2,07 ± 0,53	6,16 ± 0,99*	5,01 ± 1,05*	5,70 ± 0,83*
ПБТ	36,06 ± 8,35	72,86 ± 10,75*	67,62 ± 9,98 *	65,80 ± 8,28*

Примечание – указанные в таблице корреляции значимы на уровне $p < 0,05$.

Поскольку периферийный мониторинг имеет чрезвычайное значение при решении целого ряда вопросов клинической онкологии, важно использование наиболее информативного материала.

В рамках работы проводилось исследование особенностей ферментативной активности в плазме венозной крови, оттекающей непосредственно от пораженного органа, а также тромбоцитах оттекающей крови.

В таблице 3.7 приведены данные об особенностях активности АДА в периферических плазме и плазме, богатой тромбоцитами (ПлБТ), а также в богатой тромбоцитами плазме оттекающей от пораженного органа (ПлБТот). Забор данного материала производился во время оперативных вмешательств при раке желудка и колоректальном раке.

Поскольку ранее указывалось на отсутствие особенностей активности ферментов обмена нуклеозидов в зависимости от локализации процесса, к тому же аденокарциномы желудка и колоректального рака можно рассматривать как общую по локализации группу, поэтому в таблице 3.7 приведены расчетные данные по общей активности АДА в исследуемом материале без учета их индивидуальной локализации.

Таблица 3.7 – Активность аденозиндезаминазы в плазме крови и плазме, богатой тромбоцитами в контрольной группе и при опухолях ЖКТ в зависимости от возраста, нмоль/мин·мг

	50 – 59 лет	60 – 69 лет	70 – 79 лет
Плазма			
Контроль	1,73 ± 0,54	2,18 ± 0,69	2,70 ± 1,28
Рак	5,23 ± 0,96*	6,61 ± 1,03 *	7,42 ± 1,22*
ПлБТ			
Контроль	42,08 ± 9,29	32,73 ± 8,85	31,32 ± 9,90
Рак	69,91 ± 10,10**	66,77 ± 8,89**	65,68 ± 10,61**
ПлБТот			
Рак	84,93 ± 18,64**	101,31 ± 25,96**	72,49 ± 16,54**

Примечания

1)ПБТ – плазма, богатая тромбоцитами;

2) *– $p < 0,05$; **– $p < 0,01$ по сравнению с контролем.

Согласно полученным результатам, активность АДА в ПБТ, оттекающей от пораженного органа имеет большую активность по сравнению с ее активностью в ПБТ периферической крови.

Параллельно исследовали особенности активностей ТФк и ТФан в плазме. Лишь для ТФк плазмы установлена сильная положительная связь с возрастом, т.к. для нее характерно повышение при старении организма. Согласно результатам корреляционного анализа между возрастом и особенностями активности ТФк

плазмы установлена прямая связь умеренной силы - коэффициент парной корреляции Кендалла 0,60; $p < 0,05$.

Активность в плазме богатой тромбоцитами как ТФк, так и ТФан была выше, чем в плазме (Таблица 3.8).

Как и ранее сообщалось, установили, что для ТФк характерно снижение активности в плазме при патологии (Таблица 3.8). В тромбоцитах периферической крови достоверных отличий в активности ТФ с контролем не выявлено ($p > 0,05$).

Таблица 3.8 – Активность ТФк в плазме крови, плазме, богатой тромбоцитами в норме и при распространенных раках различной локализации в зависимости от возраста, нмоль/мин·мг

	50 – 59 лет	60 – 69 лет	70 – 79 лет
плазма			
контроль	18,53 ± 2,25	26,01 ± 3,00	29,53 ± 4,11
Рак	9,82 ± 4,22*	10,22 ± 4,88 **	10,51 ± 3,50**
ПлБТ			
контроль	40,23 ± 8,51	34,35 ± 4,87	39,09 ± 5,33
Рак	47,55 ± 6,88	36,35 ± 6,79	46,12 ± 6,52

Примечание – ПБТ – плазма, богатая тромбоцитами;

*- $p < 0,05$; **- $p < 0,01$ по сравнению с контролем

Важно отметить, что отсутствие взаимосвязи активности плазмы богатой тромбоцитами с плазмой крови может определяться существенным вкладом тромбоцитарного фермента, не зависеть от показателей активности ТФ в системном кровотоке. Учитывая особенность биологии тромбоцитов, способность при активации секретировать целый ряд белковых факторов, можно предположить, что как в норме, так и при патологии именно тромбоциты крови являются основными источниками ТФ плазмы. Это также согласуется со вторым

названием данного белка – фермента, с активностью которого связаны его ангиогенные свойства. Действительно, тимидинфосфорилаза идентифицирована как фактор роста эндотелиальных клеток тромбоцитарного происхождения (Platelet Derived- Endothelial Cell Growth Factor, PD-ECGF). Процессы ангиогенеза опухоли находятся под пристальным контролем исследователей, поскольку с его активацией связывают злокачественный характер неоплазмы, способность метастазировать. Нами предпринята попытка впервые исследовать особенности активности ТФ в зависимости от уровня циркуляции в системе кровотока. Более того, что нами были выявлены корреляции видов активности ТФ в тканях опухоли с её морфо-биологическими характеристиками ангиогенеза и пролиферации (что согласуется с описанными выше в данной работе взаимосвязями активности ТФк с маркером сосудов CD34, ТФан с Ki-67).

Нами проведен дисперсионный однофакторный анализ ANOVA распределения значений активностей ТФ в зависимости от материала исследования (Рисунок 3.9). Материал представлен тканями (контрольные нетрансформированные и карциномы), плазмой регионарного кровотока (далее условно – «оттекающей крови от органа», Пл_от), её тромбоцитами (ПлБТот), также плазмой системного кровотока (Пл), её тромбоцитами (ПлБТ). Для анализа составлены таблицы первичного материала, где каждый клинический случай представлен индивидуально всеми перечисленными видами материала.

Однофакторный анализ позволил определить особенности индивидуальной активности ТФ в зависимости от вида материала. Его графические инструменты наиболее информативны, позволяют одновременно оценить значимость вида исследуемого биоматериала.

На рисунке 3.9 представлены результаты исследования. Можно отметить, что опухоли демонстрировали максимальную активность, как и было указано ранее. Звездочками для их активности ТФк и ТФан отмечены достоверные отличия по сравнению с контрольными нетрансформированными тканями края резекции органа.

При этом обращает внимание, что в вертикальных столбцах диаграмм активности ТФк и ТФан доверительные интервалы средних значений их активности перекрываются со значениями показателей активности в опухолях. Тем самым рисунок 3.9 иллюстрирует выявленную особенность, характеризующую тромбоциты регионарного кровотока (плазму, оттекающую от опухоли, богатую тромбоцитами), как наиболее близкую по значениям в опухоли активности как ТФк, так и ТФан.

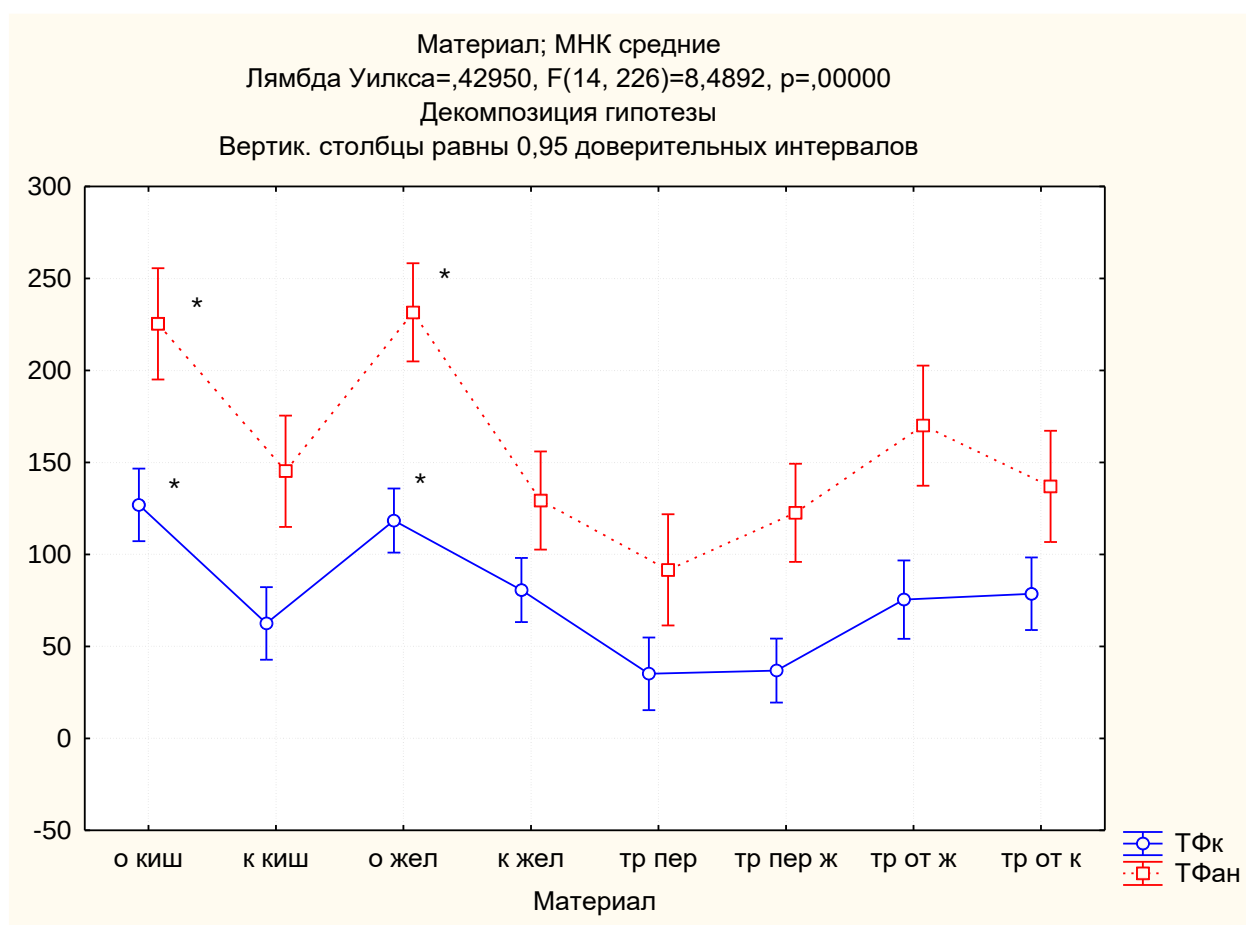


Рисунок 3.9 – Особенности видов активности ТФ при раках ЖКТ, нмоль/мин·мг

Примечание – о киш – колоректальный рак (КРР); о жел – рак желудка; к киш, к жел – контроль, тр пер – ПБТ при КРР, тр пер ж – ПБТ при РЖ, тр от ж и тр от к –соответственно, плазма, богатая тромбоцитами, оттекающая от пораженного органа.

Таким образом, было установлено, что особенности активности ТФ в тромбоцитах венозной крови, непосредственно оттекающей от пораженного органа, подобны таковым в опухоли (статистические достоверные отличия отсутствуют как для ТФан, так и для ТФк в этом материале и в опухоли).

Подобные тенденции можно проследить и по особенностям активности ТФ (Таблица 3.9) в плазме, оттекающей от органа на примере подгрупп А и Б, сформированных на основе индивидуальных особенностей видов активности ТФ ранее.

Таблица 3.9 – Активность ТФ в тканях рака кишечника и плазме периферической венозной крови, плазме венозной крови, оттекающей от кишечника, нмоль/мин·мг

Е	Кишечник		Плазма	
	Контроль n = 46	Опухоль n = 32	Оттекающая	Периферическая
Подгруппа А				
ТФк	55,89 ± 14,71	71,67 ± 17,55	5,84 ± 1,25	6,86 ± 1,66
ТФан	108,40 ± 15,23	199,46 ± 13,03*	67,55 ± 11,70	34,93 ± 14,82
Подгруппа Б				
ТФк	68,67 ± 13,67	213,88 ± 35,45**	18,60 ± 4,56	11,03 ± 2,49
ТФан	100,00 ± 13,38	78,25 ± 8,61	40,40 ± 10,69	27,53 ± 8,28

Примечание –* - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$ по сравнению с контролем

В подгруппе А в случае высокой активности ТФан в опухоли по сравнению с нетрансформированными тканями края резекции органа её активность в плазме

оттекающей крови превышала свою же активность в системном кровотоке в 1,9 раза. В этой же подгруппе ТФк оставалась низкой и в тканях, и в плазме всех уровней циркуляции.

Иная ситуация обнаруживалась в случае преобладания в тканях опухоли ТФк активности по сравнению с нетрансформированными тканями края резекции органа (подгруппа Б, ТФк в опухоли в 3 раза выше, чем в контроле). Тогда её активность в плазме оттекающей крови и в плазме центрального кровотока в 3 раза превышала активность в соответствующем материале в предыдущей подгруппе. В это же время ТФан была низкой в тканях, не отличалась в оттекающей крови от своей активности в центральном кровотоке.

Также изучили их взаимосвязи с уровнями опухолевой экспрессии CD34 и Ki-67. Для активности ТФк в ПЛБТ выявлена слабая положительная связь с опухолевой экспрессией CD34 (коэффициент парной корреляции Кендалла = 0,36; ранговой корреляции Спирмена $\rho = 0,44$; $p < 0,05$). С уровнями ядерной экспрессии Ki-67 в опухоли коррелировала активность ТФан, определявшаяся у этих пациентов в плазме периферической крови, богатой тромбоцитами (ПЛБТ) (коэффициент парной корреляции Кендалла = 0,37; ранговой корреляции Спирмена $\rho = 0,54$; $p < 0,05$). В то же время для видов активности ТФ, определявшейся классически в «чистой» плазме периферической крови такие взаимосвязи не выявлены. Следовательно, для индивидуального мониторинга изменений тканевой пролиферации, например, для определения эффективности проводимого химиотерапевтического лечения в динамике, более информативным видится определение активности ТФ в плазме периферической крови, богатой тромбоцитами (ПЛБТ), по сравнению с традиционным исследованием активности ТФ в плазме или сыворотке крови.

Следовательно, при исследовании особенностей активности ферментов катаболизма аденозина и тимидина установили, что наиболее информативным материалом, чья активность ферментов отражала бы особенности опухолевой активности, являются плазма крови, оттекающей от пораженного органа и плазма, богатая тромбоцитами и оттекающая от органа. Однако, следует отметить, что

этот материал, из-за сложностей его получения, может быть использован в ограниченном числе случаев, практически исключительно интраоперационно.

В то же время для ферментов периферического кровотока установлены и подтверждены согласно полученным ранее данным результаты о достоверных изменениях активности по сравнению с контролем. Следовательно, этот материал ввиду доступности может быть использован при индивидуальном мониторинге пациентов.

Таким образом, эпителиальные опухоли желудка и кишечника, немелкоклеточный рак легкого характеризует высокая трансферазная активность ТФ, либо сочетанная как трансферазная, так и фосфорилазная активность тимидинфосфорилазы, что, может оказывать значимый эффект на клеточный метаболит, следовательно, более корректным является их одновременное изучение;

- в эпителиальных опухолях желудка, кишечника, немелкоклеточном раке легких фосфорилазная и трансферазная активности тимидинфосфорилазы имеют свои особенности, которые в свою очередь связаны с индивидуальными характеристиками ангиогенеза и дедифференцировкой (CD34), а именно ТФк ($r=0,79$); с интенсивностью ядерной экспрессии Ki-67 – ТФан ($r=0,76$);

- вследствие установленных корреляций с уровнями ядерной экспрессии Ki-67 и CD34 виды активности ТФ могут стать перспективным биохимическим маркером ЭМТ;

- наиболее информативным материалом, отражающим индивидуальные особенности опухолевой активности, являются плазма крови, оттекающей от пораженного органа и плазма, богатая тромбоцитами и оттекающая от органа. Однако его широкое использование ограничено;

- при индивидуальном мониторинге пациентов возможно исследовать особенности активности ферментов периферического кровотока в динамике, т.к. при наличии опухоли имеются достоверные отличия с контролем $r=0,72$.

РАЗДЕЛ 4

ОСОБЕННОСТИ ПРОЦЕССОВ СВОБОДНО-РАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ

В ходе работы в гомогенатах биопрепаратов опухолей НМРЛ и карцином желудка и кишечника (КЖК) на фоне изучения особенностей активности ксантиноксидазы (КСО) и уровней малонового диацетальдегида (МДА), обладающих прооксидантными свойствами, определялись особенности ферментативной активности ферментов – антиоксидантов (глутатитонпероксидазы (ГПО) и супероксиддисмутазы (СОД)) (Таблица 4.1).

Таблица 4.1 – Активность ферментов – антиоксидантов в карциномах НМРЛ и ЖКТ, а также в смежных нетрансформированных с опухолями тканями (медиана, квартили; W-критерий Вилкоксона)

Показатель	К-ль	НМРЛ	W	p	К-ль	КЖК	W	p
<i>СОД</i>	1,00 (0,80; 1,12)	0,91 (0,74; 1,42)	<i>0,82</i>	<i>0,41</i>	1,11 (0,93; 1,54)	1,32 (1,01; 1,74)	<i>0,93</i>	<i>0,35</i>
ГПО	3,40 (2,31; 5,12)	2,91 (1,90; 4,24)	2,74	0,006	2,23 (1,62; 3,01)	1,61 (1,14; 2,11)	2,52	0,011
КСО	8,46 (7,78; 10,74)	19,40 (17,94; 20,41)	4,70	< 0,001	14,46 (13,11; 16,55)	18,66 (17,11; 20,43)	3,17	0,002
МДА	4,00 (3,19; 5,68)	7,39 (5,1; 9,59)	3,8 2	< 0,001	5,34 (4,00; 7,22)	7,58 (6,13; 9,59)	2,9 8	0,00 3

Примечание - курсивом отмечены показатели, для которых не выявлено

достоверных отличий согласно критерию W.

В отличие от СОД для остальных показателей в образцах карцином имелись достоверные различия по сравнению с нетрансформированными тканями края резекции.

Установили, что на фоне нарастания показателей активности КСО и уровней МДА, активность глутатионпероксидазы имела тенденцию к снижению (Таблица 4.1, Рисунок 4.1).

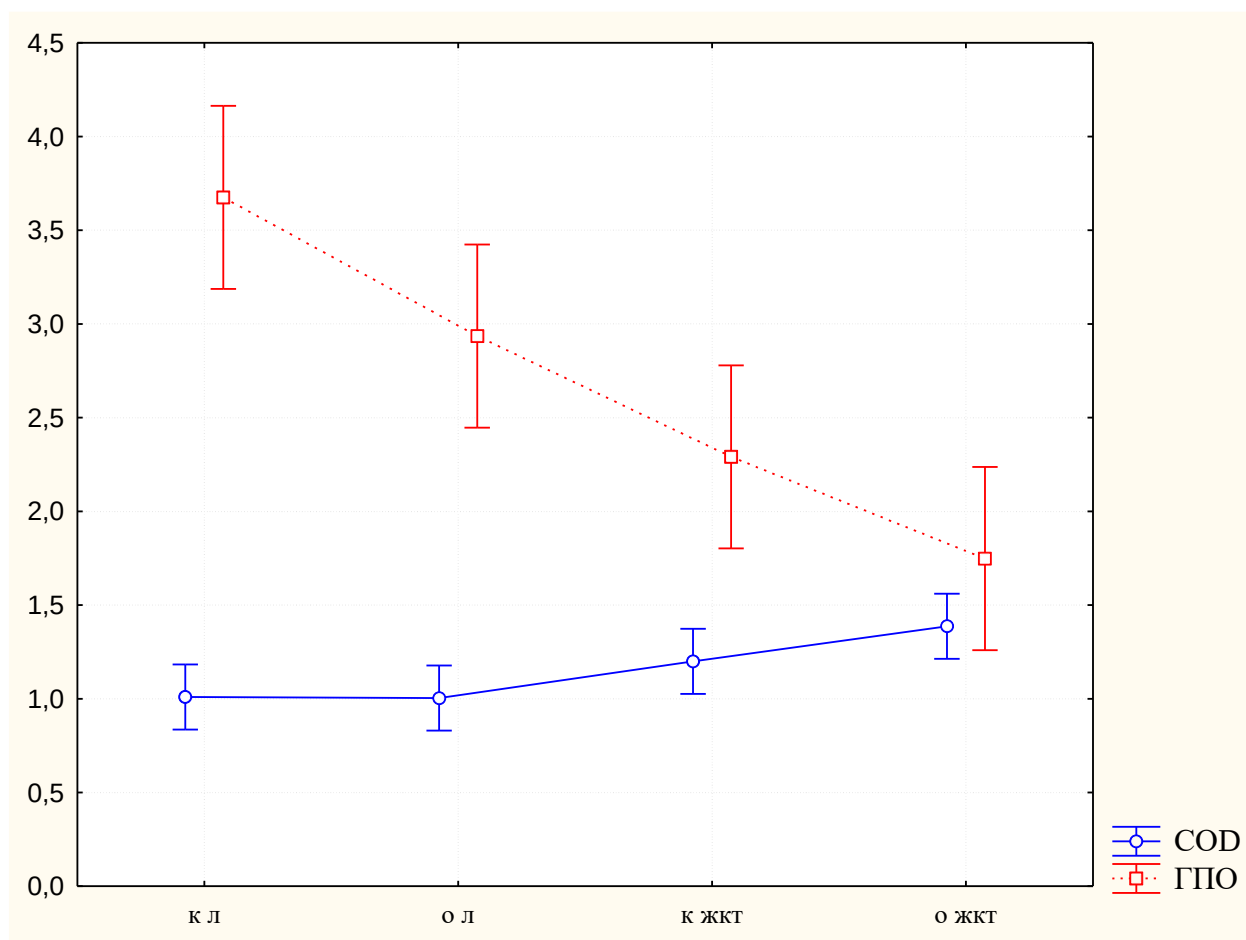


Рисунок 4.1 – Особенности активности ферментов – антиоксидантов в карциномах различной локализации

Примечание – СОД – супероксиддисмутаза; ГПО – глутатионпероксидаза; ОЛ – карциномы НМРЛ; ЖКТ – карциномы колоректального рака и желудка; кл; кЖКТ – нетрансформированные ткани, контроль.

Согласно с U критерием Манна-Уитни при анализе различий по рангам в группах НМРЛ (переменные «ол» на рисунке 4.1) и карциномах ЖКТ («о ЖКТ») есть достоверные отличия между СОД ($p = 0,041$) и ГПО ($p = 0,002$) в зависимости

от локализации карцином. Наиболее выражены выявленные нарушения их сочетанной активности в карциномах желудка и колоректального рака. Это ведет к повышению уровней пероксида водорода, усилению процессов свободно-радикального окисления. Отметим, что для описанных в предыдущем разделе ферментов также нарастание активности было характерно для ТФк ($p = 0,002$). Для остальных ферментов различий, связанных с локализацией карциномы, не выявлено. Так для АДА в опухолях НМРЛ и ЖКТ $p = 0,47$, для ТФан $p = 1,00$.

Итак, отметим, что выявленный дисбаланс активности СОД и ГПО закономерно сопровождался нарастанием показателя ПОЛ – МДА (Рисунок 4.2).

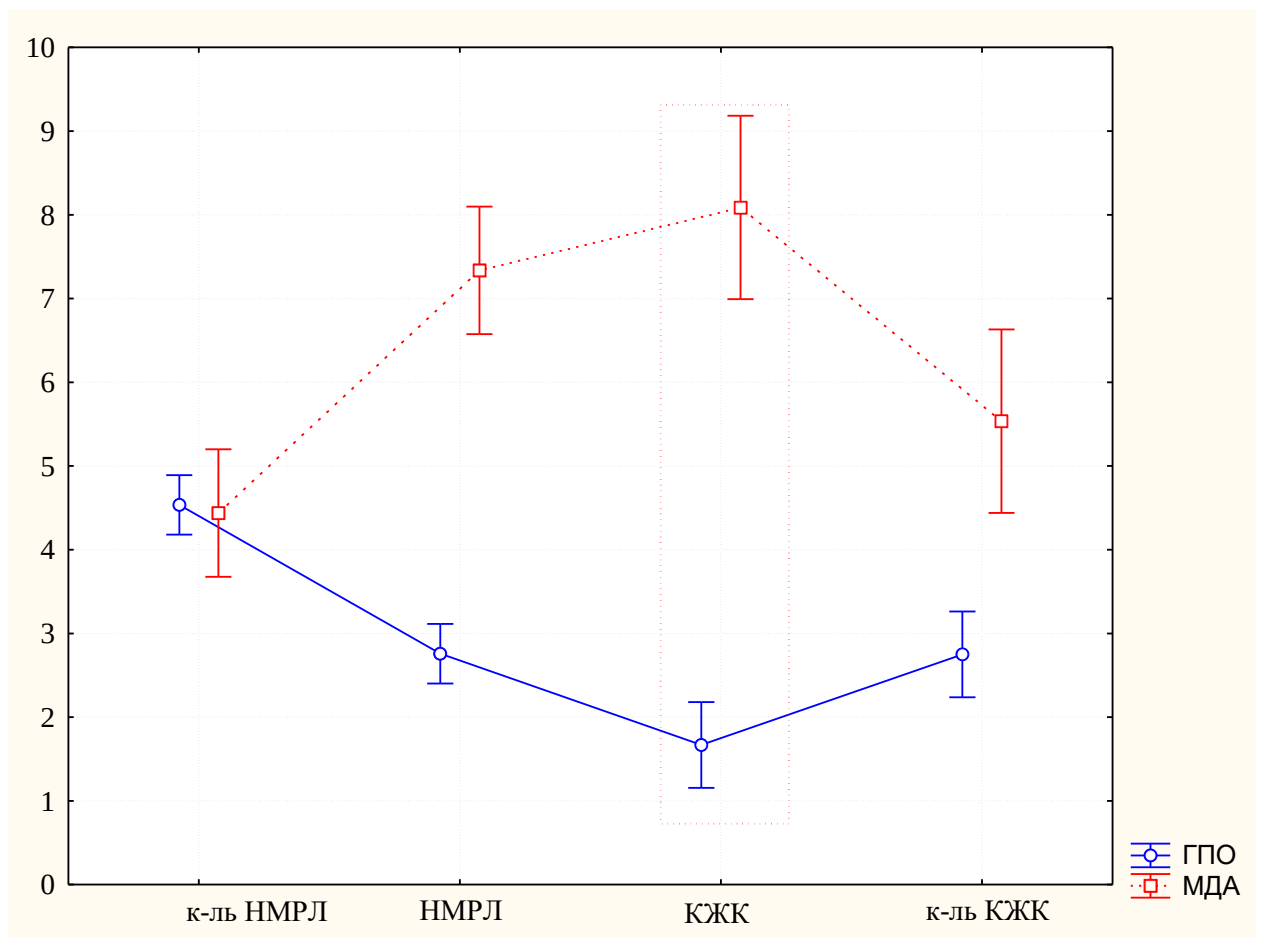


Рисунок 4.2 – Повышение уровней МДА в образцах карцином НМРЛ и КЖК на фоне снижения активности ГПО

Примечания

1) МДА – малоновый диацетальдегид, ГПО – глутатионпероксидаза; к-ль НМРЛ и кЖКТ – нетрансформированные ткани края резекции – контроль.

2) В рамке на графике – при КЖК минимальной активности ГПО соответствуют максимальные уровни МДА.

Как уже было показано в таблице 4.1 для опухолей исследуемых локализаций было характерным нарастание активности фермента катаболизма пуринов – ксантиноксидазы. КСО наряду с формированием мочевой кислоты нарабатывает в ходе реакции анион супероксида. Поэтому является по сути прооксидантом, источником АФК.

Также обращает на себя внимание установленные особенности активности ферментов в зависимости от локализации опухоли. В частности, для КЖК характерны исходно в нетрансформированных тканях более высокая активность КСО и значения уровней МДА (таблица 4.1) по сравнению с легочной тканью и достоверно более низкая активность ГПО.

Учитывая тот факт, что ГПО подвержена окислительной модификации (ОМБ), то подобные изменения с нетрансформированных тканях могут трактоваться как выявленный дисбаланс про- и антиоксидантных процессов.

Чтобы выявить возможные взаимосвязи показателей обмена в тканях далее проводили множественный регрессионный и дисперсионный анализ, расчеты коэффициентов корреляции показателей.

Проводя множественный регрессионный анализ, рассмотрели наличие взаимосвязей между ферментативной активностью в тканях. Также для оценки взаимосвязи их особенностей с опухолевым процессом по сравнению с нетрансформированными тканями края резекции ввели такой качественный показатель как «материал» (Таблица 4.2). Это позволило учитывать особенности ферментативной активности в карциномах по сравнению с нетрансформированными тканями.

Объединенные внутригрупповые корреляции выявлены для пары АДА и ТФан ($r = 0,73$). Данная связь указывает на вероятность шунтирования «запасного пути синтеза» тимидилата за счет вовлечения 2-d-D-рибозы, формируемой в ходе дальнейшего катаболизма продукта реакции АДА – дезоксиинозина.

Примечательно, что новый анализ вновь подтверждает выявленные и описанные ранее в Разделе 3 взаимосвязи особенностей активности ТФан и АДА. Таблица 4.2 – Объединенные внутригрупповые корреляции биохимических показателей в гомогенатах тканей согласно результатам дискриминантного анализа

Показатель	Материал	ТФк	ТФан	АДА	КСО	СОД	ГПО	МДА
Материал	1,000	0,130	0,324	0,265	0,542	0,036	-0,621	0,321
ТФк	0,130	1,000	0,377	0,386	0,404	0,030	-0,368	0,379
ТФан	0,324	0,377	1,000	0,728	0,599	0,538	-0,426	0,266
АДА	0,265	0,386	0,728	1,000	0,697	0,428	-0,383	0,309
КСО	0,542	0,404	0,599	0,697	1,000	0,183	-0,560	0,465
СОД	0,036	0,030	0,538	0,428	0,183	1,000	0,043	-0,109
ГПО	-0,621	-0,368	-0,426	-0,383	-0,560	0,043	1,000	-0,509
МДА	0,321	0,379	0,266	0,309	0,465	-0,109	-0,509	1,000

Косвенно о непосредственной вовлеченности в пути деградации аденозина через реакцию, катализируемую АДА, свидетельствует наличие корреляции такой же силы между АДА и КСО ($r = 0,73$). А о сопряженности процессов катаболизма тимидина и аденозина также могут свидетельствовать положительные связи одинаковой силы катаболической ТФк и КСО, ТФк и АДА ($r = 0,40$ и $0,39$, соответственно). К тому же при этом, как и для пары АДА и ТФан, так и для КСО и ТФан выявлены связи положительные и практически одинаковой интенсивности.

О том, что наряду с вовлеченностью в наработку конечного продукта распада пуринов – мочевой кислоты, данный вид активности КСО также связан со свободно-радикальным окислением свидетельствует отрицательная связь средней

силы между КСО и ГПО ($r = -0,56$). Хотя с активностью СОД и установлена прямая корреляция для КСО и СОД, однако она слабая, не является сколь либо значимой ($r = 0,18$). Вероятно, причина в особенностях активности СОД. Поскольку она весьма изменчива и индивидуальна в образцах тканей. Например, для КСО связь с материалом более выражена ($r = 0,54$), а у СОД она варьировала, не всегда была выше, чем в контроле ($r = 0,04$). Возможно, вариабельность активности СОД в контролях и образцах опухолей и стала причиной отсутствия корреляций СОД активности от вида материала. Однако отрицательная связь средней силы, выявленная для активности ГПО и вида материала, указывает, отрицательная связь средней силы ($r = -0,62$). Также об усилении прооксидантных процессов в тканях образцов опухоли также свидетельствует отрицательная корреляция ГПО и МДА ($r = -0,51$) и положительная между КСО и МДА ($r = 0,47$).

Однако более точным для описания взаимосвязей ферментативной активности при опухолевом росте расчет ранговых корреляций Спирмена, поскольку при этом учитывается показатель их достоверности (Таблица 4.3).

Таблица 4.3 – Ранговые корреляции Спирмена между парами показателей, регистрировавшихся в образцах биопрепаратов карцином НМРЛ и КЖК

	Материал	СОД	ТФк	ТФан	АДА	ГПО	КСО	МДА
Материал		0,39	0,79	0,64	0,65	-0,79	0,68	0,44
СОД	0,39			0,504	0,311			
ТФк	0,79			0,324	0,455	-0,328		0,426
ТФан	0,64	0,504	0,324		0,692	-0,453	0,613	0,319
АДА	0,65	0,311	0,455	0,692		-0,399	0,727	0,356
ГПО	-0,79		-0,328	-0,453	-0,399		-0,505	-0,539
КСО	0,68			0,613	0,727	-0,505		0,457
МДА	0,44		0,426	0,319	0,356	-0,539	0,457	

Примечание – все указанные корреляции значимы на уровне $p < 0,05$.

Итак, в таблице 4.3 приведены лишь достоверные взаимосвязи, характер которых описан с помощью показателя ранговой корреляции Спирмена (ρ) для непараметрических данных.

Данный метод подтвердил наличие корреляций, установленных ранее при дискриминантном анализе. Проводившийся в его рамках канонический анализ позволил определить, что можно пытаться классифицировать материал (нетрансформированная ткань или рак), используя пары ферментативных показателей в качестве корней – классификаторов (Рисунок 4.3).

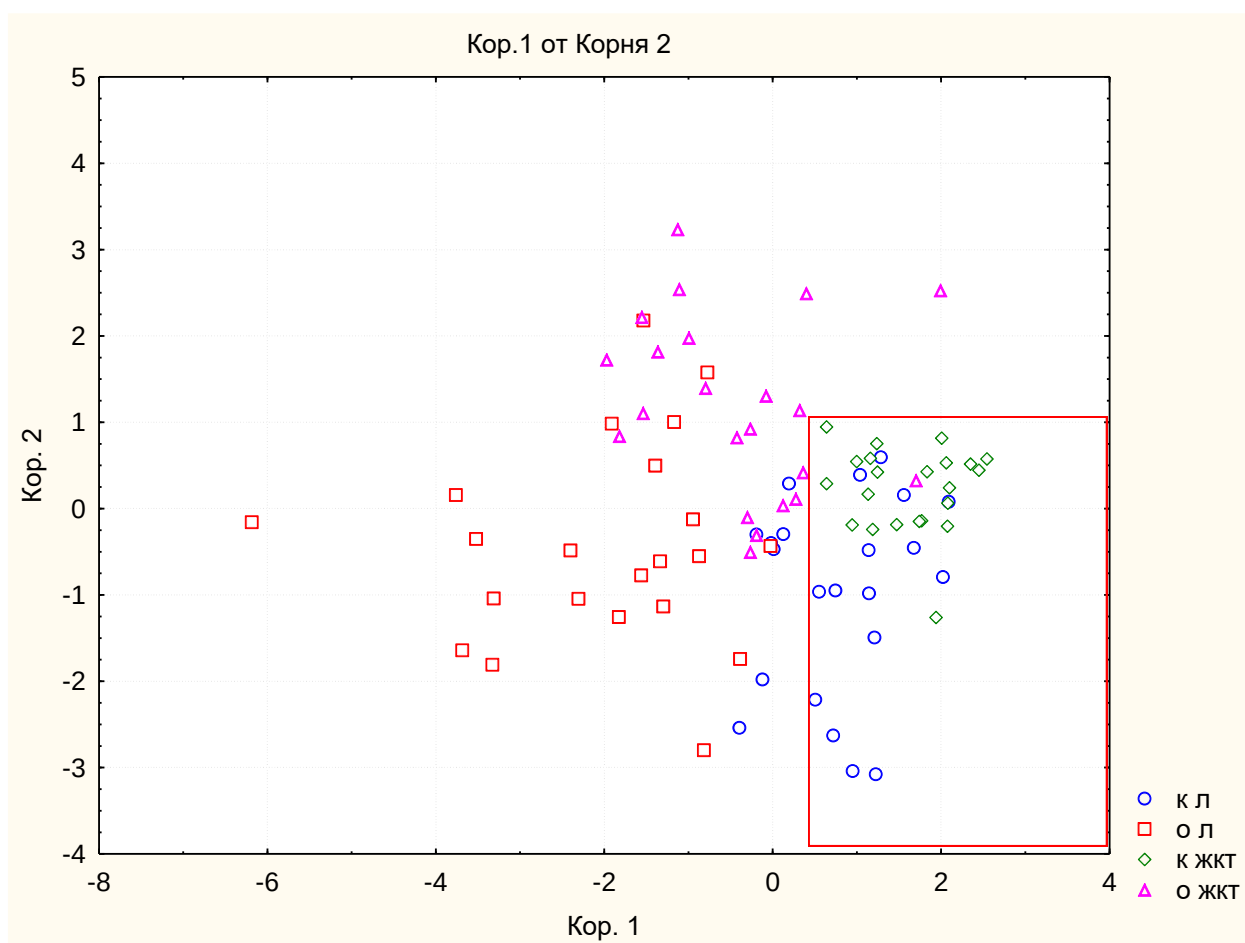


Рисунок 4.3 – Распределение материала в группы опухолевая ткань (ОЛ, О ЖКТ) или нетрансформированная ткань (КЛ, К ЖКТ) в 2-хмерном пространстве значений ГПО и ТФк согласно результатам канонического анализа

Примечания

1) в рамке - большинство случаев контроля, за рамкой – случаи карцином;

2)ОЛ – карциномы НМРЛ; О ЖКТ – карциномы колоректального рака и желудка; кЛ; кЖКТ – нетрансформированные ткани, контроль.

Как видим, ферментативные показатели могут быть специфичными в отношении вида материала (нетрансформированная ткань или опухоль).

Данные результаты канонического анализа хорошо согласуются с результатами расчетов ранговых коэффициентов корреляции Спирмена (таблица 4.3), установившими, что наиболее чувствительными показателями вида материала (нетрансформированный контроль или опухоль) являются особенности активности ТФк и ГПО (зеркальная связь одинаковой силы их активности с материалом, соответственно, ρ для ТФк = 0,79; ρ для ГПО = - 0,79).

Далее проводился анализ однородности значений ферментативных показателей в самих выборках карцином одной локализации. Проведенный анализ указал на отсутствие однородности дисперсий значений СОД, АДА, КСО в выборках при патологии (Таблица 4.4).

Таблица 4.4 – Определение однородности дисперсий биохимических показателей в тканях карцином различных локализаций согласно критерию Левена (F)

Показатель	MS эффект	MS ошибка	F	p
<i>СОД</i>	<i>0,027</i>	<i>0,011</i>	<i>2,50</i>	<i>0,073</i>
ГПО	0,98	0,29	3,40	0,027
ТФ к	4039,32	766,48	5,27	0,004
ТФ ан	9547,81	912,20	10,47	0,001
<i>АДА</i>	<i>5034,23</i>	<i>858,67</i>	<i>6,24</i>	<i>0,067</i>
<i>КСО</i>	<i>0,76</i>	<i>0,95</i>	<i>0,80</i>	<i>0,505</i>
МДА	3,04	1,08	2,82	0,044

Примечание – курсивом отмечены показатели, для которых не выявлено достоверных значений критерия F, характеризующего однородность параметров показателя в его выборке.

Поэтому далее был проведен кластерный анализ. Согласно его результатам каждая группа опухолей в пределах одной локализации структурировалась в два кластера. Так, например, согласно особенностям активности СОД в каждой локализации был сформирован кластер, где активность фермента в образцах опухолей среди одной локализации была выше, чем в другом кластере (рисунок 4.4.).

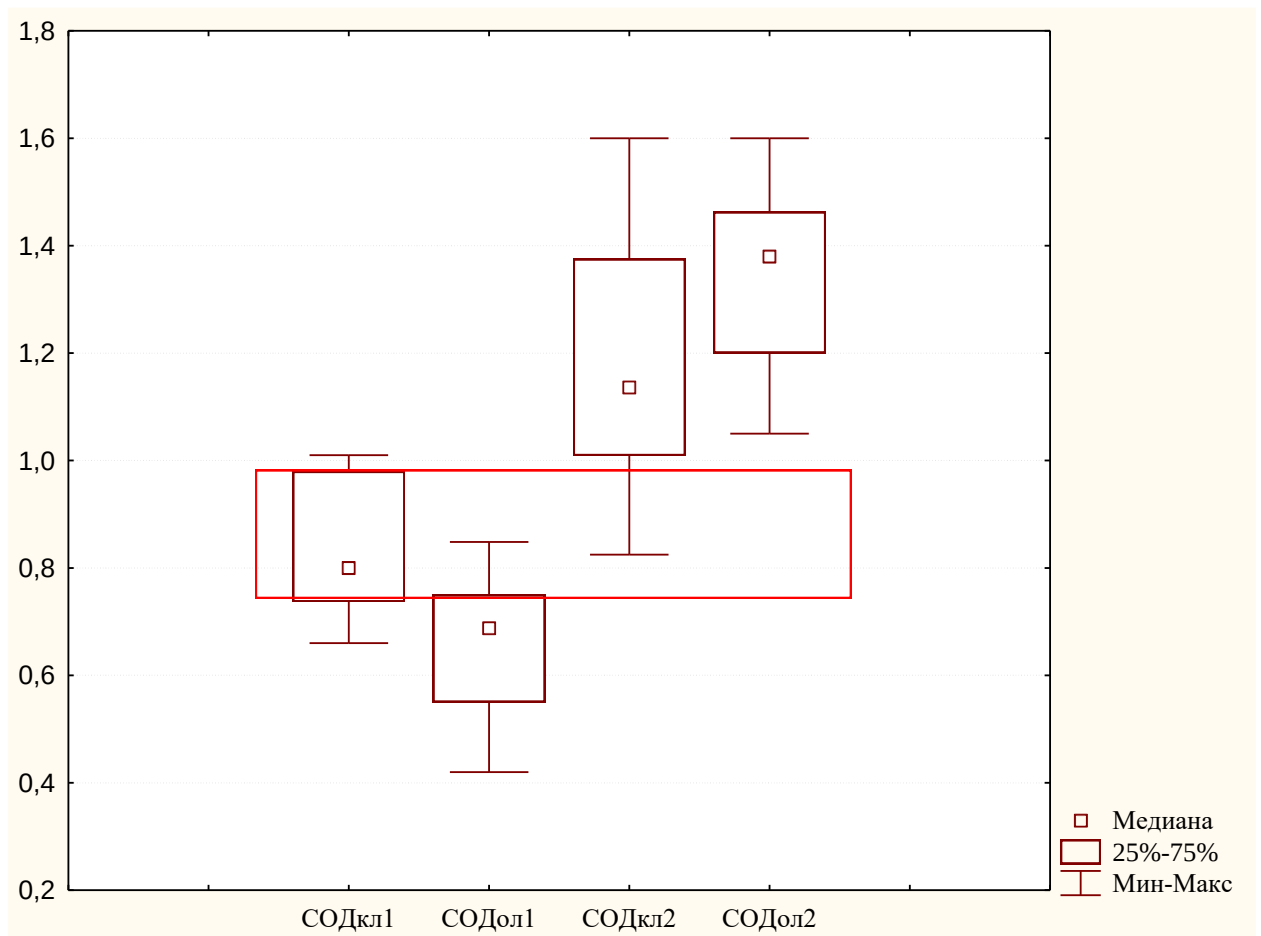


Рисунок 4.4 – Неоднородность распределения случаев карцином легких по активности СОД по результатам кластерного анализа

Отметим, что подобные особенности в неравномерном распределении значений активностей показателя в пределах одной выборки случаев карцином одной локализации можно проиллюстрировать также и на примере АДА (рисунок 4.5). Согласно анализу, как среди случаев НМРЛ, так и среди КЖК, внутри их выборок формировались кластеры, отличавшиеся по активности СОД, АДА, КСО друг с другом. Так, например, согласно его результатам для активности АДА и

при НМРЛ, и при КЖК наблюдали подгруппы (кластеры), где и в контроле (нетрансформированная ткань) и в опухоли активность фермента имела тенденции к повышению или достоверно повышалась (рисунок 4.4. по особенностям активности СОД).

Итак, как следует из результатов кластерного анализа, среди биопрепаратов опухолей одной локализации выявлена их метаболическая неоднородность по активности некоторых ферментов.

Этот факт нуждался в дополнительном анализе.

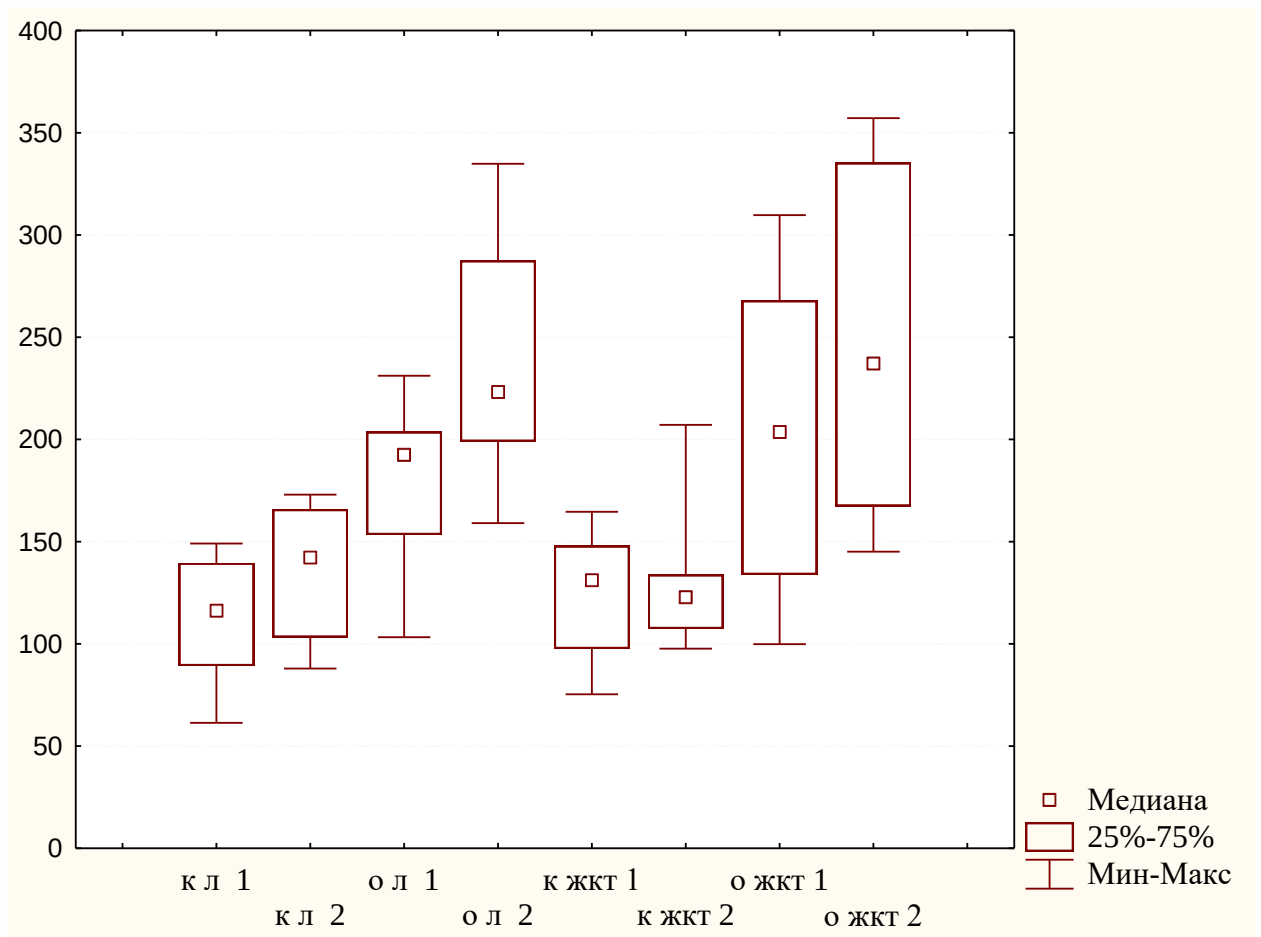


Рисунок 4.5 – Неоднородность распределения значений активности АДА по результатам кластерного анализа в выборках среди карцином одной локализации;
нмоль/мин·мг

Примечание – ОЛ – карциномы НМРЛ, О ЖКТ – карциномы колоректального рака и желудка, кЛ; кЖКТ – нетрансформированные ткани края резекции, распределённые, согласно анализу, в кластеры 1 и 2.

Поскольку размерность единиц активности СОД была минимальной, то анализ по остальным ферментам проводили следующим образом. Все данные по ферментам соответствовали конкретному образцу тканей карциномы, включенному по активности СОД в кластер 1 или 2. Данный подход позволил оценить всю совокупность исследовавшихся биохимических параметров в каждом определенном образце карциномы. В следующем разделе будут приведены результаты дальнейшего сопоставления индивидуальных биохимических показателей с особенностями патоморфологии опухоли по результатам трактовки её индивидуальных морфо-биологических показателей.

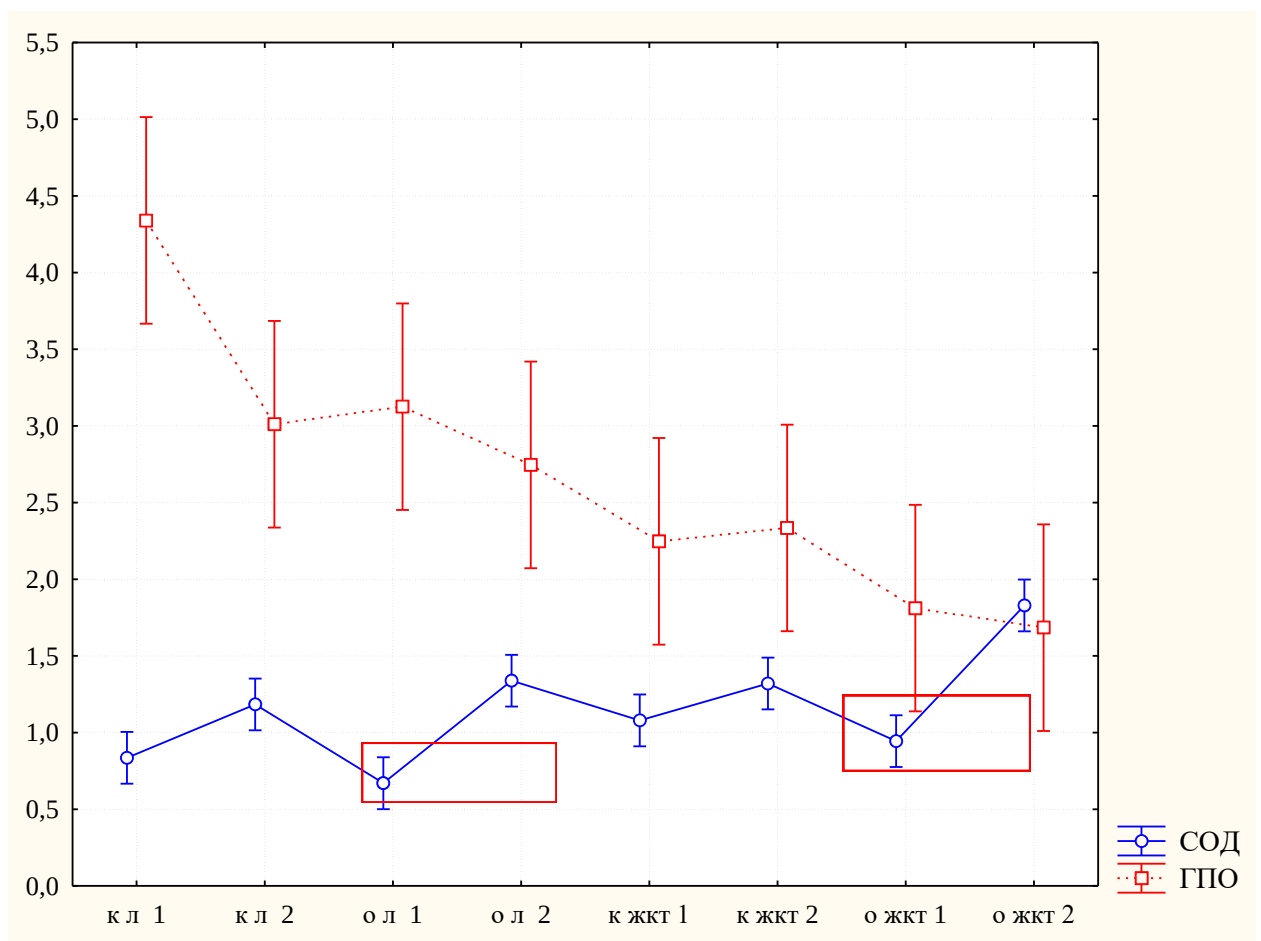


Рисунок 4.6 – Особенности активности ферментов – антиоксидантов в кластерах, выделенных среди карцином одной локализации

Примечания

1) ОЛ – карциномы НМРЛ; О ЖКТ – карциномы колоректального рака и желудка; кл; кЖКТ – нетрансформированные ткани края резекции, распределённые, согласно анализу, в кластеры 1 и 2;

Продолжение таблицы 4.5								
Материал	к л 1	к л 2	о л 1	о л 2	к жкт 1	к жкт 2	о жкт 1	о жкт 2
к жкт 2	0,033		0,001					0,019
о жкт 1								< 0,001
о жкт 2	< 0,001	<0,001	< 0,001	0,029	< 0,001	0,019	< 0,001	
ГПО								
к л 1					0,014	0,022	0,001	< 0,001
к л 2								
о л 1								
о л 2								
к жкт 1	0,014							
к жкт 2	0,022							
о жкт 1	0,001							
о жкт 2	< 0,001							
КСО								
к л 1			0,033	0,027			0,024	0,017
к л 2			0,035	0,038				0,020
о л 1	0,033	0,035			0,001	0,001		
о л 2	0,027	0,038			< 0,001	< 0,001		
к жкт 1			0,001	< 0,001			0,014	0,001
к жкт 2			0,001	< 0,001			0,045	0,003
о жкт 1	0,024			0,001	0,014	0,045		
о жкт 2	0,017	0,020			0,001	0,003		

Примечание – в ячейках удалены недостоверные отличия значений показателя в группах сравнения.

Для активности ГПО не выявлено межгрупповых отличий в образцах опухолей одной локализации, хотя выявлена тенденция к снижению активности ГПО на фоне нарастания активности СОД (рисунок 4.6).

Необходимо отметить, что во вторых кластерах (или подгруппах) среди опухолей одной локализации согласно однофакторному анализу ANOVA наблюдали лишь тенденцию к повышению активности КСО в биообразцах опухолей исследуемых локализаций (таблица 4.5, рисунок 4.7). Однако достоверных различий между кластерами карцином одной локализации не выявлено.

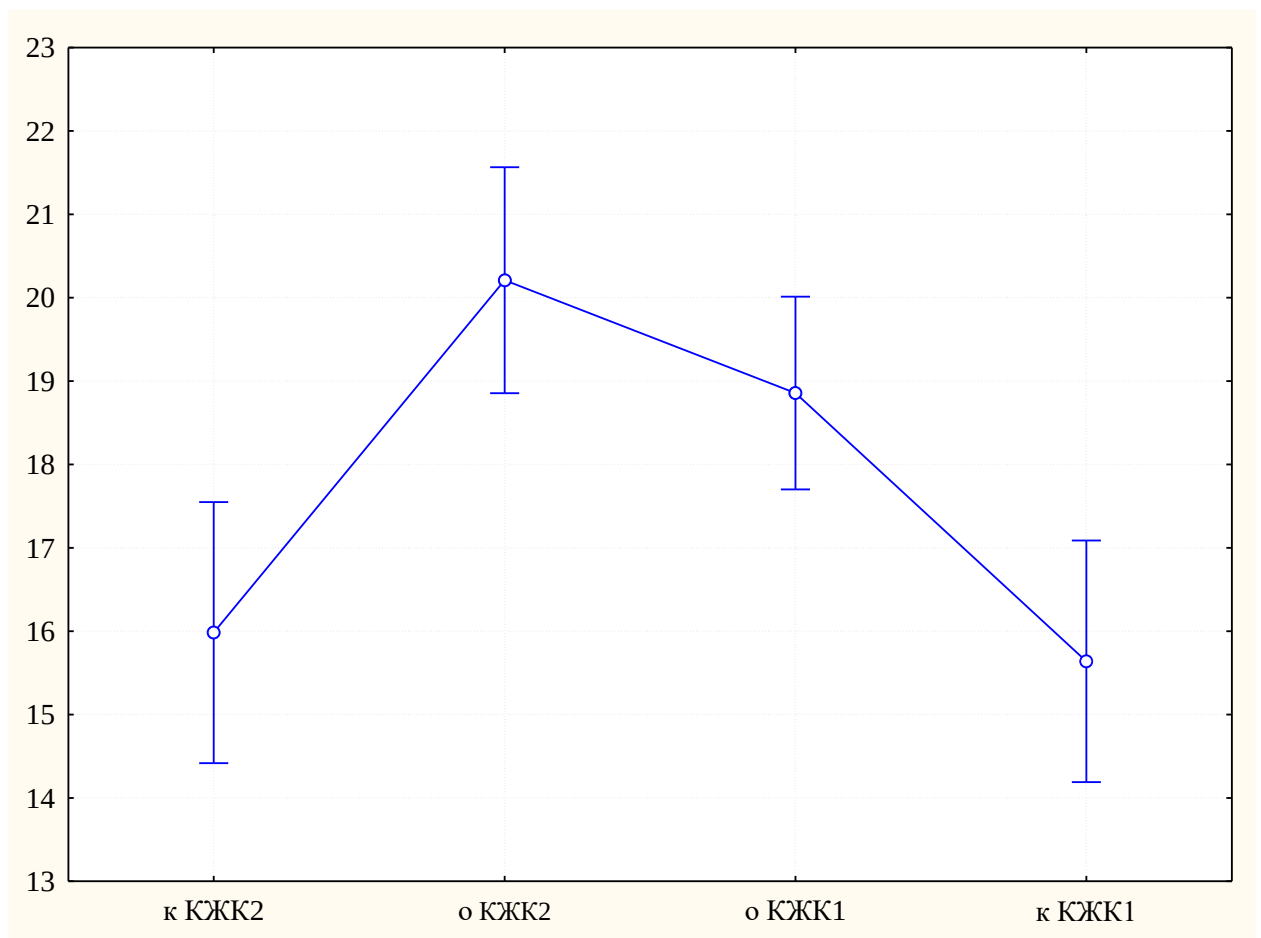


Рисунок 4.7 – Особенности активности КСО в образцах КЖК, разбитых на кластеры согласно особенностям активности СОД

Примечание – О КЖК – карциномы колоректального рака и желудка; к КЖК – нетрансформированные ткани края резекции, распределённые, согласно анализу, в кластеры 1 и 2.

Поскольку и для других ферментов обмена нуклеозидов также была необходимость расчета апостериорного показателя значимости различий после их распределения в кластеры, соответствовавшие образцам опухолей, включенных в

подгруппы 1 или 2 (кластеры 1 или 2) по активности СОД, то результаты расчета критерия Шеффе отражены в таблице 4.6.

Таблица 4.6 – Значения критерия вероятности Шеффе для апостериорных критериев для значений ферментов обмена нуклеозидов в нетрансформированных тканях и карциномах НМРЛ и ЖКТ

Материал	к л 1	к л 2	о л 1	о л 2	к жкт 1	к жкт 2	о жкт 1	о жкт 2
ТФк								
к л 1				< 0,001				
к л 2				< 0,001				
о л 1					< 0,001	0,008		
о л 2	< 0,001	< 0,001			< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,008
к жкт 1			< 0,001	< 0,001				0,004
к жкт 2			0,008	< 0,001				
о жкт 1				< 0,001				
о жкт 2				0,008	0,004			
ТФан								
к л 1				< 0,001			0,012	< 0,001
к л 2				0,002				< 0,001
о л 1								
о л 2	< 0,001	0,002			0,001	0,001		
к жкт 1				0,001				< 0,001
к жкт 2				0,001				< 0,001
о жкт 1	0,012							
о жкт 2	< 0,001	< 0,001			< 0,001	< 0,001		
АДА								
к л 1				0,002				0,018

Продолжение таблицы 4.6								
к л 2				0,014				
о л 1								
о л 2	0,002	0,014			0,005	0,004		
к жкт 1				0,005				0,038
к жкт 2				0,004				0,031
о жкт 1								
о жкт 2	0,018				0,038	0,031		

Примечание – в ячейках удалены недостоверные отличия значений показателя в группах сравнения.

Можно отметить, что между кластерами опухолей одной локализации для ТФ и АДА не выявлено достоверных различий согласно данным таблицы 4.6. Можно лишь отметить, что по активности ТФк опухоли НМРЛ были выше, чем КЖК.

Используя графические возможности ANOVA, проиллюстрируем данные по особенностям активности ферментов обмена нуклеозидов в кластерах опухолей одной локализации (Рисунок 4.8).

Несмотря на отсутствие достоверных отличий по активности ферментов в кластерах одной локализации, можно отметить, что при НМРЛ в подгруппе 2 активность ТФк, ТФан, АДА были выше, чем своей активности в кластерах 1 и 2 КЖК (Таблица 4.6). В то же время однофакторный анализ ANOVA указывает на тенденции во вторых кластерах по нарастанию видов активности ТФ и АДА, а также на достоверные отличия по ТФк и АДА между кластерами опухолей НМРЛ. Таким образом, согласно ранее описанным результатам по активности ферментов – антиоксидантов в этих же образцах опухолей (Таблица 4.5, рисунок 4.6), во вторых подгруппах (кластерах) тенденция к повышению активности ферментов обмена нуклеозидов сочеталась с более низкой активностью ГПО и высокой активностью СОД. Следовательно, проведенный кластерный анализ особенностей ферментативной активности в карциномах одной локализации,

выделение двух подгрупп (кластеров) по особенностям активности СОД, указывает и на особенности активности в образцах этих опухолей по активности остальных ферментов.

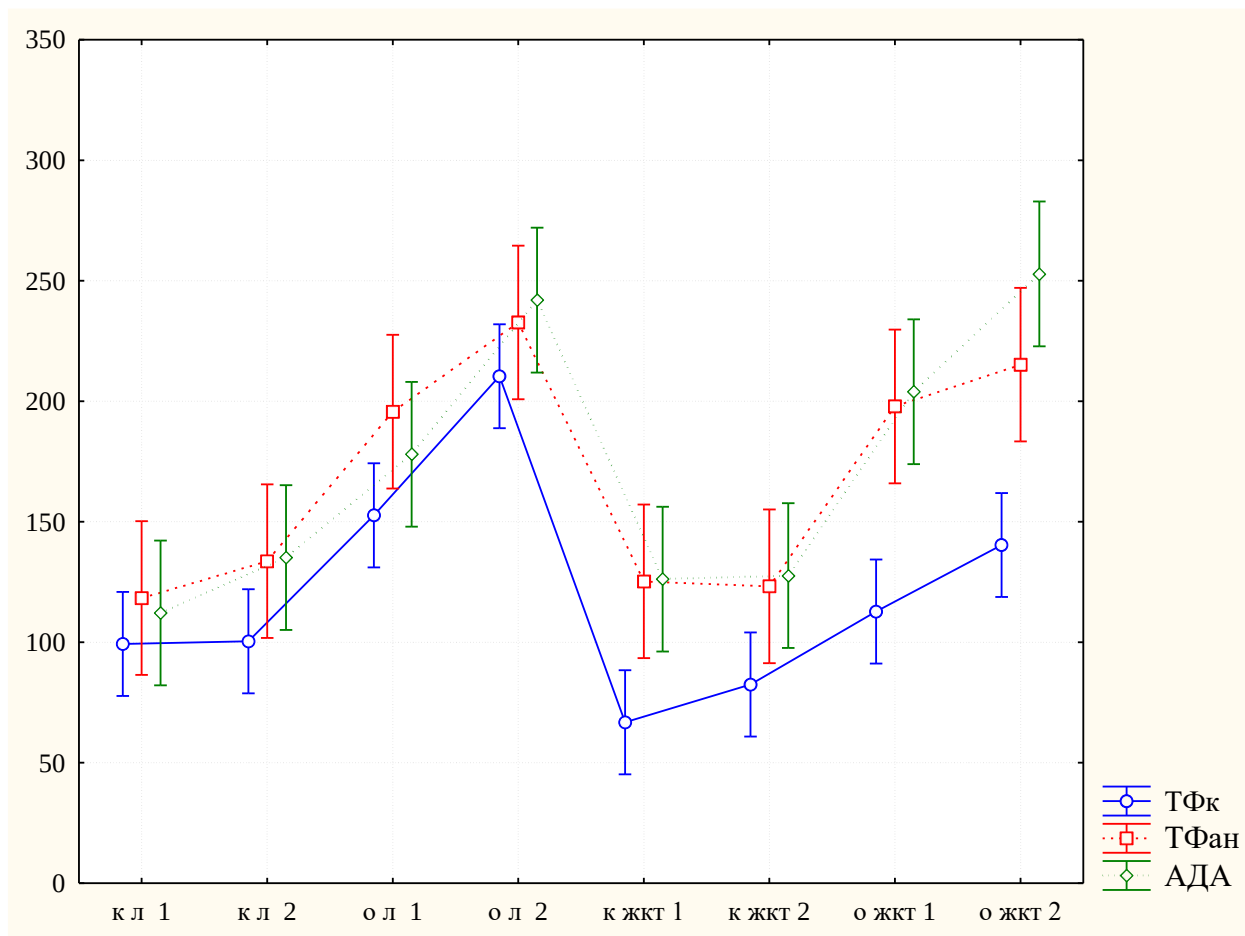


Рисунок 4.8 – Особенности активности ферментов обмена нуклеозидов в кластерах опухолей одной локализации, сформированных согласно с особенностями активности СОД в карциномах

Примечания

1) ОЛ – карциномы НМРЛ, О ЖКТ – карциномы колоректального рака и желудка, кл; кЖКТ – нетрансформированные ткани края резекции, распределённые, согласно анализу, в кластеры 1 и 2;

2) ТФ – тимидинфосфорилаза, АДА – аденозиндезаминаза.

Данные тенденции заслуживают внимания и должны быть проанализированы при помощи дополнительных инструментов статистического анализа.

Предварительно можем отметить, что вторые подгруппы опухолей одной локализации имели дисбаланс активности СОД и ГПО, следовательно, в них более активно протекали процессы свободно-радикального окисления среди всех исследовавшихся биопрепаратов опухолей одной локализации и морфологической группы.

Далее исследовали различия ферментативной активности между подгруппами опухолей одной локализации.

Для сравнения использовали непараметрический тест Колмогорова-Смирнова (таблица 4.7).

Таблица 4.7 – Сравнительный анализ значений биохимических показателей в тканях карцином НМРЛ с учетом их деления на подгруппы

Показатель	НМРЛ 1гр		НМРЛ 2 гр		р
	Среднее	Ст. откл.	Среднее	Ст. откл.	
СОД	0,67	0,12	1,43	0,18	< 0,001
<i>ГПО</i>	<i>3,12</i>	<i>1,19</i>	<i>2,75</i>	<i>1,49</i>	<i>> 0,10</i>
ТФ к	149,04	39,48	205,83	81,33	0,025
<i>ТФ ан</i>	<i>189,32</i>	<i>70,66</i>	<i>228,13</i>	<i>95,57</i>	<i>> 0,10</i>
<i>АДА</i>	<i>178,01</i>	<i>40,56</i>	<i>241,96</i>	<i>56,45</i>	<i>> 0,10</i>
<i>КСО</i>	<i>18,34</i>	<i>2,52</i>	<i>20,01</i>	<i>2,23</i>	<i>> 0,10</i>
<i>МДА</i>	<i>6,78</i>	<i>2,88</i>	<i>8,77</i>	<i>2,69,</i>	<i>> 0,10</i>

Примечание – курсивом отмечены недостоверные отличия значений показателя по сравнению с контролем.

В исследуемых подгруппах установили достоверные отличия между парами несвязанных выборок кластеров НМРЛ 1группа (1-й кластер) и НМРЛ 2 группа

(2-й кластер) для активности не только СОД, но и ТФк (соответственно $p < 0,001$ и $p = 0,025$).

Данный тест более чувствительный по сравнению с критерием Манна-Уитни. Так, согласно U критерия Манна-Уитни при анализе различий по рангам в подгруппах НМРЛ 1 гр и НМРЛ 2 гр есть достоверные отличия не только между СОД и ТФк в выделенных подгруппах, но и для АДА они тоже достоверны ($p = 0,016$).

Применив непараметрический тест Колмогорова-Смирнова также сопоставили значения ферментативной активности в образцах карцином желудка и кишечника (КЖК) в выделенных на основании анализа однородности дисперсий и кластерного анализа подгруппах (таблица 4.8).

Таблица 4.8 – Сравнительный анализ значений биохимических показателей в тканях карцином КЖК с учетом их деления на подгруппы

Показатель	КЖК 1гр		КЖК 2 гр		p
	Среднее	Ст. откл.	Среднее	Ст. откл.	
СОД	0,94	0,26	1,83	0,49	$< 0,001$
<i>ГПО</i>	<i>1,81</i>	<i>0,72</i>	<i>1,68</i>	<i>0,74</i>	$> 0,10$
<i>ТФ к</i>	<i>149,04</i>	<i>69,25</i>	<i>205,83</i>	<i>58,31</i>	$< 0,10$
<i>ТФ ан</i>	<i>196,02</i>	<i>70,66</i>	<i>215,18</i>	<i>95,57</i>	$> 0,10$
<i>АДА</i>	<i>200,48</i>	<i>71,36</i>	<i>262,82</i>	<i>71,06</i>	$> 0,10$
<i>КСО</i>	<i>18,83</i>	<i>1,88</i>	<i>19,51</i>	<i>1,50</i>	$> 0,10$
<i>МДА</i>	<i>7,15</i>	<i>2,40</i>	<i>8,11</i>	<i>2,93</i>	$> 0,10$

Примечание – курсивом отмечены недостоверные отличия значений показателя по сравнению с контролем.

При этом согласно U критерия Манна-Уитни при анализе различий по рангам в подгруппах КЖК 1 гр и КЖК 2 гр есть достоверные отличия не только между СОД, но и для ТФк в выделенных подгруппах ($p = 0,049$). В то время как остальные ферменты не отличались достоверно в подгруппах карцином ЖКТ.

Согласно полученным результатам, при опухолевой патологии выявлены изменения обменных процессов, характеризующиеся усилением прооксидантных процессов. Этому способствовало устойчивое повышение активности КСО, определявшееся как в выборках значений этого показателя в карциномах НМРЛ и КЖК. Данные особенности были выражены и в подгруппах (кластерах) для каждой локализации. Об усилении прооксидантных процессов, в частности ПОЛ, свидетельствовало устойчивое нарастание в опухолях уровней МДА, характерное в одинаковой степени и для кластеров или подгрупп опухолей, так и для их значений в целом в выборках данных по уровням МДА для опухоли определенной локализации. В результате кластерного анализа удалось выделить подгруппы среди исследуемых биопрепаратов опухолей одной локализации и морфологии, характеризовавшихся повышением активности СОД по сравнению с тканями края резекции, служившими индивидуальным контролем. Однако при этом нарастания активности ГПО не выявлено. Скорее наоборот, в кластере 2 для КЖК на фоне максимальных значений активности СОД, активность ГПО была минимальной (Таблицы 4.1; 4.7 и 4.8).

На завершающем этапе провели повторный анализ однородности значений ферментативных показателей в выделенных подгруппах карцином одной локализации. (Таблица 4.9).

Согласно анализу однородность дисперсий значений СОД в них была достигнута. Примечательно, что в них также сохранилась однородность значений МДА, а для ГПО, наоборот, утратилась

В подтверждение гипотезы о том, что вторые кластеры или подгруппы опухолей одной локализации характеризовались усилением прооксидантных процессов по сравнению со своими первыми подгруппами, как при НМРЛ, так и при КЖК, свидетельствует установленная прямая положительная корреляция для

активности СОД и уровней МДА при делении выборок опухолей одной локализации и морфологии на кластеры. Значения коэффициента ранговой корреляции Спирмена для СОД и МДА выявлены соответственно $\rho = 0,60$.

Таблица 4.9 – Определение однородности дисперсий биохимических показателей в подгруппах тканей карцином одной локализации согласно критерию Левена (F)

Показатель	MS эффект	MS ошибка	F	p
СОД	0,15	0,03	4,93	0,007
<i>ГПО</i>	<i>0,06</i>	<i>0,08</i>	<i>0,81</i>	<i>0,50</i>
<i>КСО</i>	0,76	0,95	0,80	0,50
МДА	7,42	0,72	10,25	0,0001

Примечание – курсивом отмечены показатели, для которых не выявлено достоверных значений критерия F, характеризующего однородность параметров показателя в его выборках при делении на кластеры (подгруппы).

Поскольку выше описывались результаты канонического анализа, показавшего возможность дифференцирования материала на группы «нетрансформированная ткань - рак», то после формирования кластеров проверили ещё раз гипотезу о возможности прогнозирования вида материала по показателям ферментативной активности. Для этого повторили ещё раз анализ дискриминантных функций показателей ферментативной активности, оценивая также вероятность использования пары ферментативных показателей в качестве корней – классификаторов (аналогично рисунку 4.3).

Проводившийся в его рамках канонический анализ позволил определить, что можно пытаться классифицировать материал (нетрансформированная ткань или

рак), используя пары ферментативных показателей в качестве корней – классификаторов (рисунок 4.3).

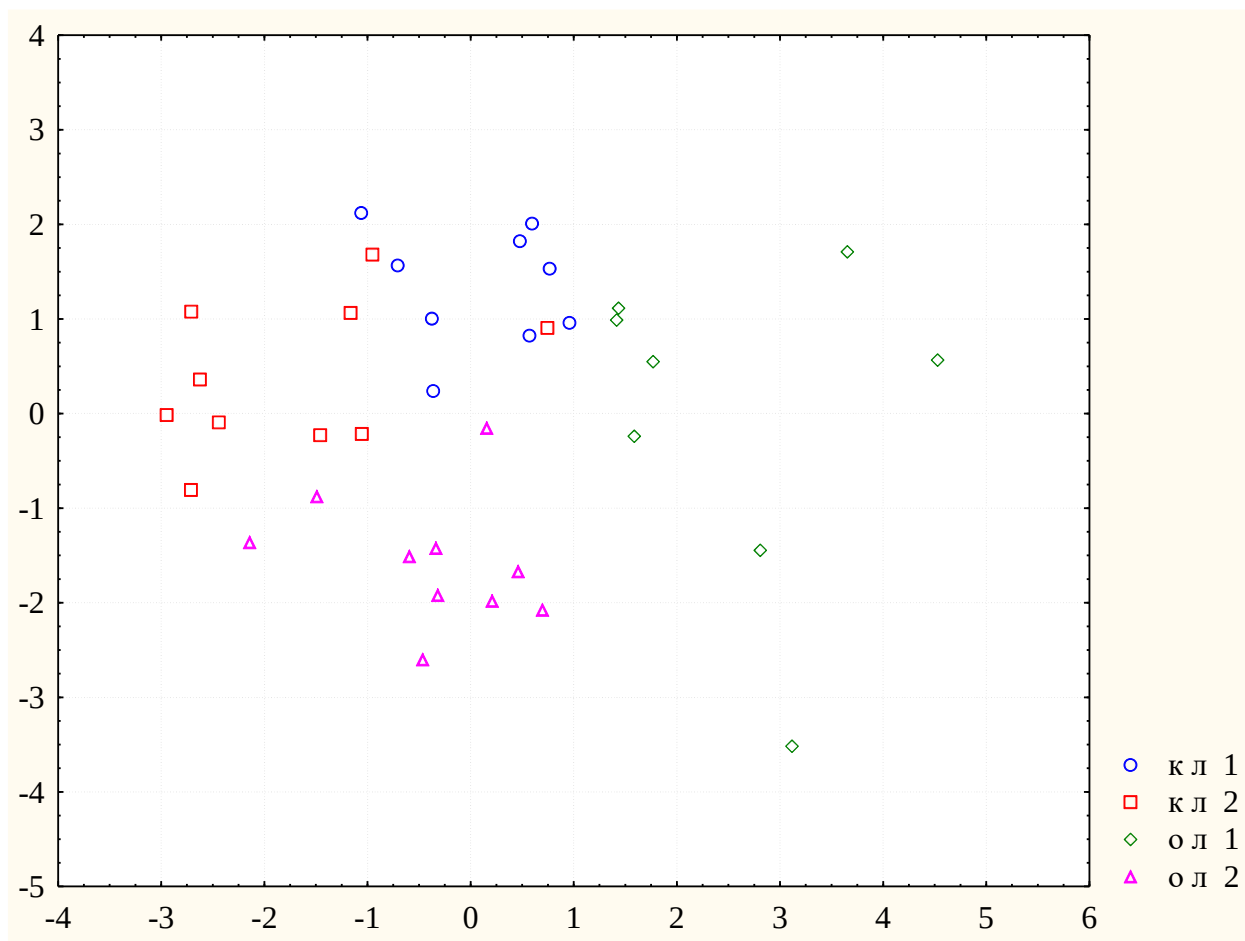


Рис 4.9 – Возможность прогнозирования вида материала по сочетанной активности СОД и ТФ (канонический анализ)

Как видим ферментативные показатели могут быть специфичными в отношении вида материала (нетрансформированная ткань или опухоль). На рисунке 4.9 в двухмерном пространстве показателей активности СОД и Тфк распределены группы материала. Можно видеть, что зона, где сосредоточены случаи контроля находится вне зоны, где располагаются случаи НМРЛ из кластеров 1 и 2. Причем, если зона «контролей» однородна и представлена случаями контроля из обоих кластеров. То случаи карцином распределены неоднородно, группируются в своих секторах.

РАЗДЕЛ 5

О ВЗАИМОСВЯЗИ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ ОПУХОЛИ С
ЕЁ ПАТОМОРФОЛОГИЕЙ

В отличие от ферментов обмена нуклеозидов опухолевая активность ферментов антиоксидантной системы или не отличалась достоверно от контроля (СОД), или снижалась (ГПО) (таблица 5.1.).

Таблица 5.1 – Активность ферментов обмена нуклеозидов и антиоксидантной системы в тканях немелкоклеточного рака легких (НМРЛ), карциномах желудка и кишечника (КЖК)

Е	ТФк		АДА		СОД		ГПО	
Локализация	К-ль	О	К-ль	О	К-ль	О	К-ль	О
НМРЛ (n = 25)	96,1 (78,9; 29,4)	171,1** (120,2; 211,9)	122,3 (103,2; 149,1)	202,3 ** (181,1; 231,1)	1,0 (0,8; 1,1)	0,9 (0,7; 1,4)	3,4 (2,3; 5,1)	2,9 * (1,9; 4,2)
КЖК (n = 22)	71,6 (62,7; 87,3)	130,1** (99,9; 145,1)	125,6 (107,4; 139,5)	234,4 ** (164,6; 276,2)	1,1 (0,9; 1,5)	1,3 (1,0; 1,7)	2,2 (1,6; 3,0)	1,6 * (1,1; 2,1)

Примечание – К-ль – контроли, О – опухоли; * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$ по сравнению с индивидуальным контролем.

Последнее подтверждает выявленная отрицательная связь особенностей активности ГПО с патологией ($r = -0,465$; $p < 0,05$). Причем в КЖК активность ГПО была минимальной по сравнению с НМРЛ ($p = 0,002$). Согласно результатам рангового однофакторного анализа Краскела-Уоллиса и медианного теста (χ^2)

выявили, что особенности активности ГПО и ТФк в опухолях специфичны и связаны с локализацией опухоли. 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 активности в карциномах не были связаны с локализацией.

Важно отметить, что повышение активности ТФк на фоне низкой активности ГПО, выявленное в карциномах, может способствовать повышению уровней как 2-д-D-Риб-1-Ф, так и H_2O_2 . К тому же известно, что 2-д-D-Риб-1-Ф стимулирует генерацию АФК. Это повышает вероятность активации клеточных программ, связанных с опухолевой прогрессией, запускаемых H_2O_2 и 2-д-D-Риб-1-Ф.

Ранее нами было установлено, что опухоли одного патоморфологического типа и локализации неоднородны по видам активности ТФ и АДА. Была выявлена связь изменений активности ТФан и ТФк с интенсивностью процессов пролиферации и ангиогенеза конкретной опухоли. Так, в НМРЛ установлена прямая положительная связь трансферазной активности (ТФан) с уровнями экспрессии маркера пролиферации Ki-67. Фосфорилазная активность (ТФк) коррелировала с уровнями сосудистого маркера CD34.

В данном исследовании проводился кластерный анализ абсолютных значений ферментативной активности в группах опухолей НМРЛ, а также в группе солидных опухолей желудка и кишечника (КЖК). Выявлена её неоднородность в каждой из групп. Опухоли одной локализации статистически распределились в 2 кластера. Для корректного их описания были выбраны кластеры активности СОД, чьи абсолютные значения минимальны среди исследовавшихся ферментов (Таблицы 5.2 и 5.3). Данные по остальным ферментам соответствовали каждому индивидуальному образцу, отнесенному в конкретный кластер (далее – подгруппы 1 и 2) по активности СОД.

Таблица 5.2 – Активность ферментов (Е) АОС и обмена нуклеозидов в опухолях НМРЛ согласно кластерному делению на подгруппы по особенностям активности СОД

Клас теры	НМРЛ 1гр			НМРЛ 2гр		
Е	К-ль	О	р	К-ль	О	р
СОД	0,8 (0,7; 0,9)	0,7 (0,6; 0,8)	0,01	1,1 (1,0; 1,4)	1,4 (1,2; 1,5)	0,07
ГПО	5,1 (2,6; 5,9)	3,3 (2,1; 4,0)	0,01	3,0 (1,8; 4,0)	2,2 (1,5; 4,2)	0,29
ТФк	94,1 (68,0; 129,4)	160,0 (100,0; 177,1)	0,01	98,0 (78,9; 130,2)	209,8 (110,2; 286,3)	0,01
ТФан	123,0 (95,2; 137,9)	199,5 (96,0; 228,4)	0,02	130,1 (106,7; 158,6)	254,3 (129,0; 341,1)	0,01
АДА	116,3 (89,3; 139,5)	192,5 (153,5; 203,7)	0,01	142,3 (103,2; 165,8)	223,2 (199,1; 287,4)	0,01

Примечание – К-ль – контроли, О – опухоли.

Важно отметить, что прямая сильная связь между увеличением активности ТФан и АДА в опухолях данных локализаций сохранялась и в выделенных подгруппах (ранговый коэффициент Спирмена $\rho = 0,740$; $p < 0,001$). В них были выявлены корреляции активностей ТФан и ТФк ($\rho = 0,468$; $p < 0,001$), а также АДА и ТФк ($\rho = 0,545$; $p < 0,001$). Это также может указывать на кооперативные сдвиги активности ферментов обмена дезоксиаденозина и дезокситимидина,

которые могут способствовать и формированию дТМФ (из-за ресинтеза субстрата для тимидинкиназы), параллельному повышению уровня 2-д-Д-Риб-1-Ф в опухоли.

Таблица 5.3 – Активность ферментов (Е) АОС и обмена нуклеозидов в КЖК согласно кластерному делению на подгруппы по особенностям активности СОД

Кластеры	КЖК 1гр			КЖК 2гр		
Е	К-ль	О	р	К-ль	О	р
СОД	1,1 (0,8; 1,3)	1,0 (0,6; 1,1)	0,01	1,4 (0,9; 1,6)	1,7 (1,3; 2,3)	0,02
ГПО	2,2 (1,4; 3,0)	1,9 (1,0; 2,2)	0,08	2,2 (1,9; 3,0)	1,5 (1,1; 2,0)	0,08
ТФк	62,7 (54,0; 84,3)	123,5 (90,8; 137,3)	0,01	77,0 (68,6; 100,1)	135,3 (119,0; 160,8)	0,01
ТФан	112,7 (103,0; 155,0)	200,9 (140,2; 225,2)	0,01	124,3 (103,0; 144,5)	203,9 (144,5; 279,0)	0,01
АДА	131,1 (97,7; 147,9)	203,7 (133,9; 267,9)	0,01	122,8 (107,4; 133,8)	237,2 (167,4; 335,3)	0,01

Примечание – К-ль – контроли, О – опухоли.

Согласно полученным нами результатам, во вторых подгруппах карцином разных локализаций, характеризовавшихся более высокой активностью СОД, повышения активности ГПО не установлено. Наоборот, во 2-й подгруппе карцином желудка и кишечника на фоне максимальной активности СОД ($U =$

21,00, $Z = -2,59$, $p = 0,009$ по сравнению с остальными подгруппами), активность ГПО была минимальной ($U = 14,00$, $Z = -3,05$, $p = 0,002$ по сравнению с 1-й подгруппой карцином КЖК и НМРЛ 1-й и 2-й подгрупп). При этом наблюдалась тенденция к повышению активности ТФк ($U = 30,00$, $Z = -2,00$, $p = 0,045$ для НМРЛ; $U = 30,50$, $Z = -1,97$, $p = 0,049$ для КЖК). В опухолях легких активность АДА во втором кластере также была достоверно выше, чем в первом ($U = 24,00$, $Z = -2,40$, $p = 0,017$). Можно предположить, что вследствие выявленных особенностей метаболизма, для опухолей вторых подгрупп были характерны более высокие уровни продукции $O_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 , и 2-д-D-Риб-1-Ф. Таким образом, кластерный анализ выявил метаболическую неоднородность среди опухолей одной локализации и морфологии.

По результатам дискриминантного анализа наиболее специфичными для выделенных кластеров опухолей одной локализации оказались особенности активности СОД, ТФк, ГПО. (Для СОД лямбда Уилкса 0,160, толерантность 0,94, $p < 0,001$. Для ТФк, соответственно, 0,122; 0,91, $p < 0,001$; ГПО – 0,160; 0,94, $p = 0,030$). Следовательно, в НМРЛ, раке желудка, раке кишечника выявлены подгруппы, характеризовавшиеся дисбалансом активности СОД и ГПО, повышением фосфорилазной активности ТФ без нарастания ее трансферазной активности. Это могло привести к метаболическому стимулированию ангиогенеза, формированию инвазивных свойств опухоли, устойчивости к апоптозу. Например, известно, что H_2O_2 инициирует ассоциацию α и β субъединиц фактора, индуцируемого гипоксией (hypoxia-inducible factor, HIF), запуская реализацию его проангиогенных и антиапоптозных эффектов. ТФк, активируя катаболизм дезокситимидина, помимо собственного воздействия на ангиогенез стимулирует НАДФН₂-оксидазы, формирующие АФК. По мнению Tabata S. и соавт., ТФ способствует активации сигнальных путей, запускаемых H_2O_2 . Так, пероксид водорода активирует ряд чувствительных онкогенов, способствующих опухолевой прогрессии, реализации эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП), метастазированию. Эти свойства H_2O_2 позволили считать, что СОД, которая также его продуцирует, может участвовать

в развитии ЭМП. При этом, опухоль приобретает агрессивные свойства, традиционные методы лечения становятся неэффективными.

Одними из чувствительных к АФК онкогенами, участвующими в программе эпителиально-мезенхимального перехода, являются *Snail*-гены. Кодлируемые *Snail* факторы транскрипции реализуют формирование инвазивных свойств опухоли. Так, вследствие репрессии транскрипции Е-кадгерина, ламинина, интегринов мембран нарушаются межклеточные контакты, клеточно-матриксная адгезия. Активация металлопротеиназ

обеспечивает протеолиз внеклеточного матрикса, белковых компонентов базальных мембран. Изменения клеточной полярности и формы сопровождаются экспрессией мезенхимальных маркеров – виментина, α -актина гладких мышц. Клетки приобретают подвижность, способность к инвазии, метастазированию. Zeng J. и соавт. было экспериментально установлено, что H_2O_2 одновременно подавляет экспрессию Е-кадгерина и стимулирует экспрессию мезенхимальных маркеров (виментина и N-кадгерина). Как АФК, так и ТФ стимулируют активность матриксных металлопротеиназ.

В данном исследовании помимо ферментативной активности были изучены особенности опухолевой экспрессии ряда эпителиальных маркеров, Ki-67, маркера эндотелиоцитов CD34 и мезенхимальных маркеров. Эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) регистрировали по ряду признаков (Рисунки 5.1 – 5.3).

В частности, наблюдали снижение (или отсутствие) мембранной экспрессии Е-кадгерина, появление её в цитоплазме опухолевых клеток (Рисунок 5.1.А).

Также снижалась экспрессия цитокератина AE1/AE3 и цитокератина 18 (Рисунки 5.1.Б и 5.2.А).

Некоторые клетки обособливались, вытягивались, приобретали фибробластоподобную форму (Рисунок 5.2.А). При этом появлялась экспрессия мезенхимальных маркеров, появлялись признаки стволовых клеток (Рисунок 5.3.А и 5.3.Б).

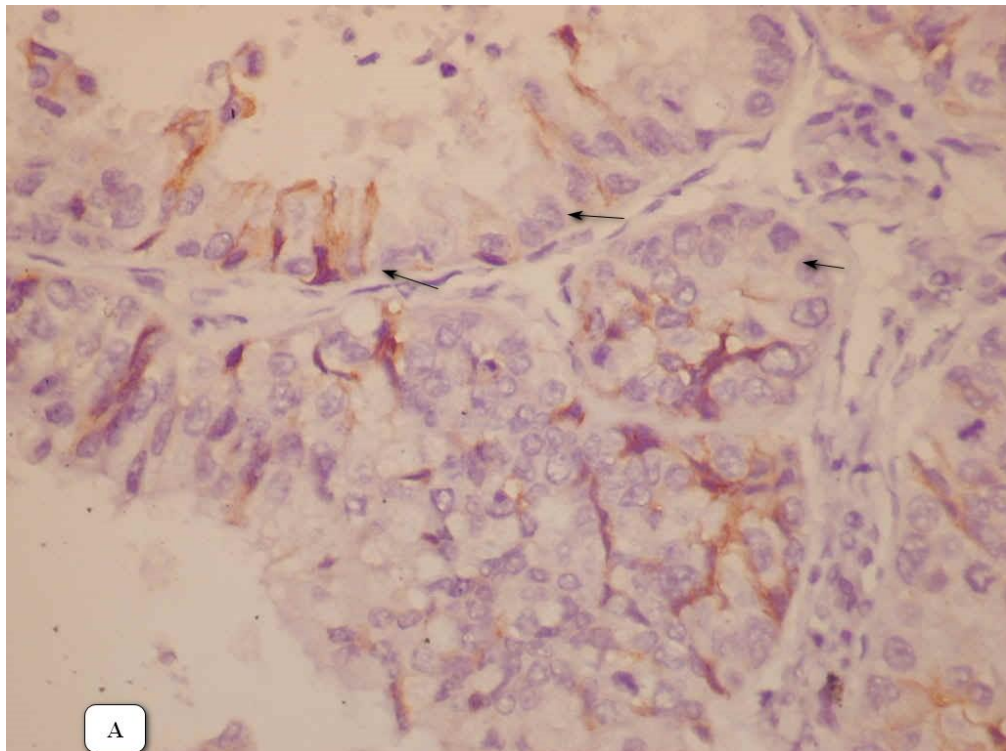


Рисунок 5.1.А – Снижение экспрессии: **А** – Е-кадгерина (ИГХ метод; x400).

Папиллярная аденокарцинома легких, 2-я подгруппа НМРЛ

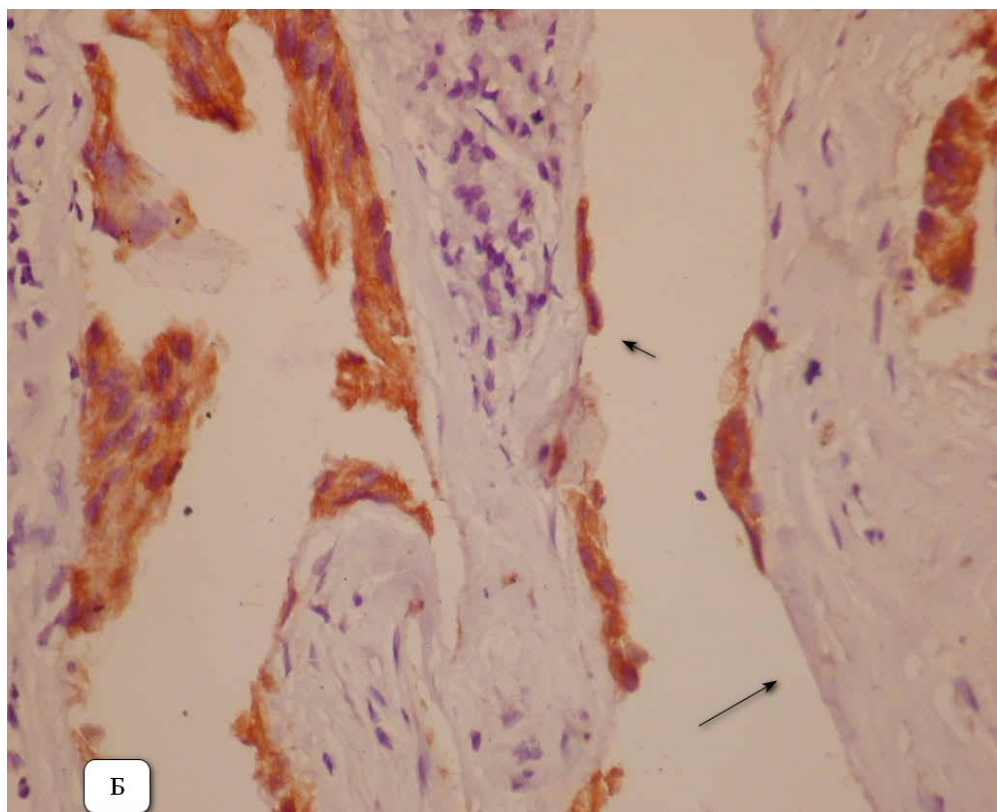


Рисунок 5.1. Б – Снижение экспрессии: **Б** – панцитокератина AE1/AE3 (ИГХ метод; x400). Папиллярная аденокарцинома легких, 2-я подгруппа НМРЛ

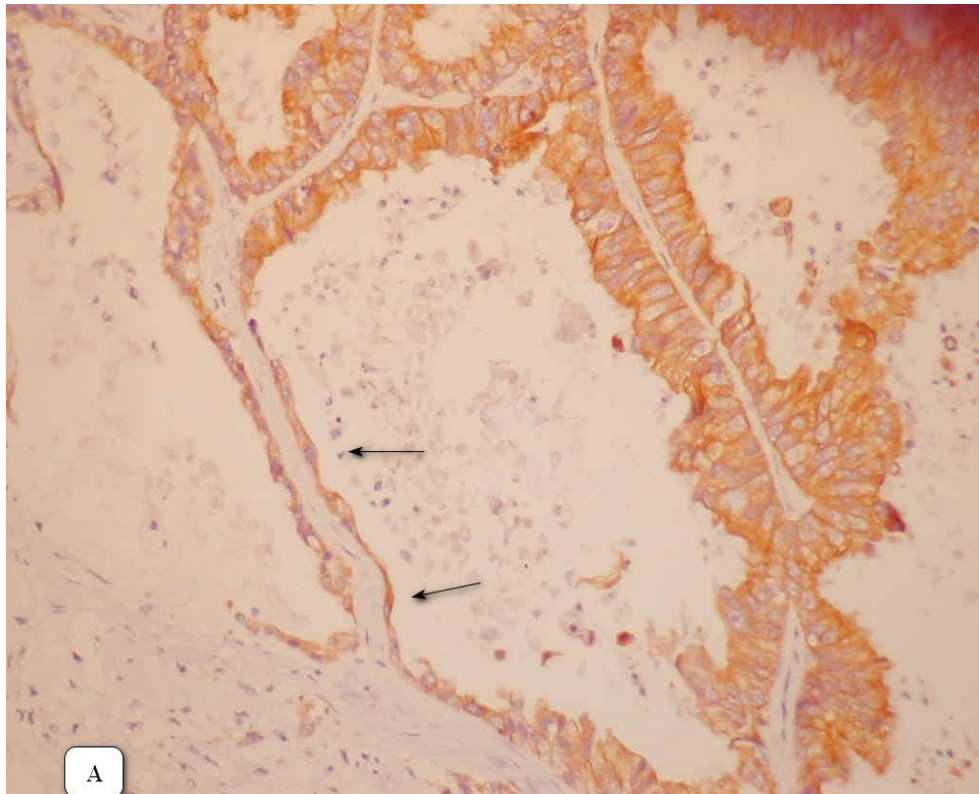


Рисунок 5.2. А. – Особенности экспрессии **А** – цитокератина18 (ИГХ метод; x200). Папиллярная аденокарцинома легких, 2-я подгруппа НМРЛ

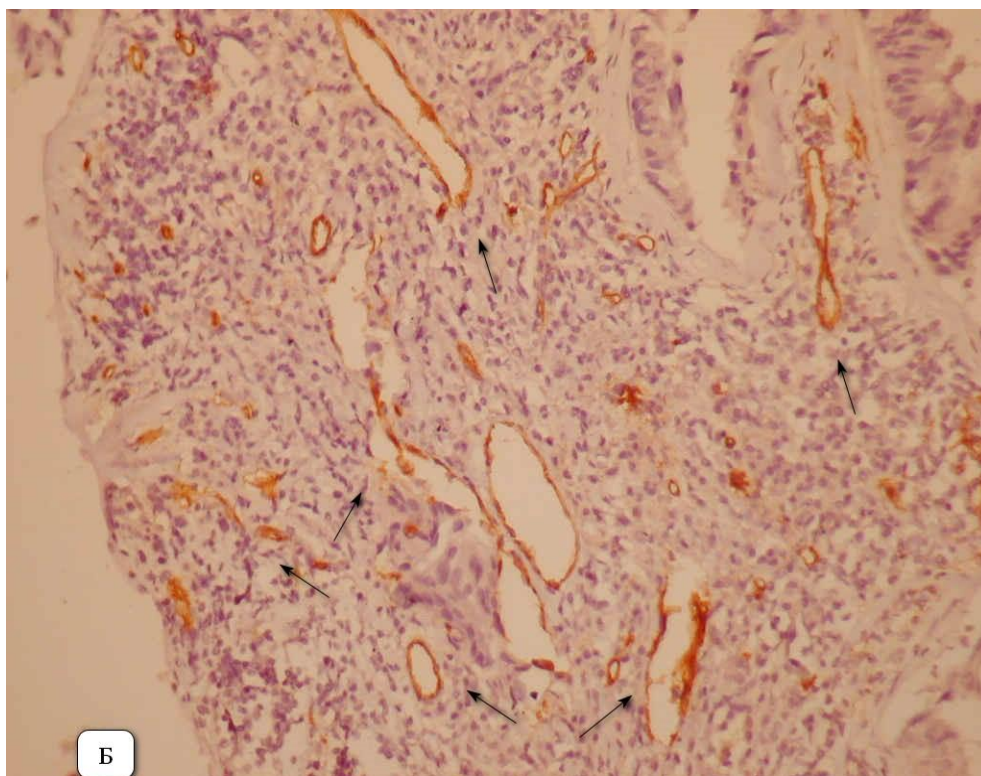


Рисунок 5.2.Б – Особенности экспрессии **Б** – маркера эндотелиоцитов CD 34 (ИГХ метод; x200). Папиллярная аденокарцинома легких, 2-я подгруппа НМРЛ

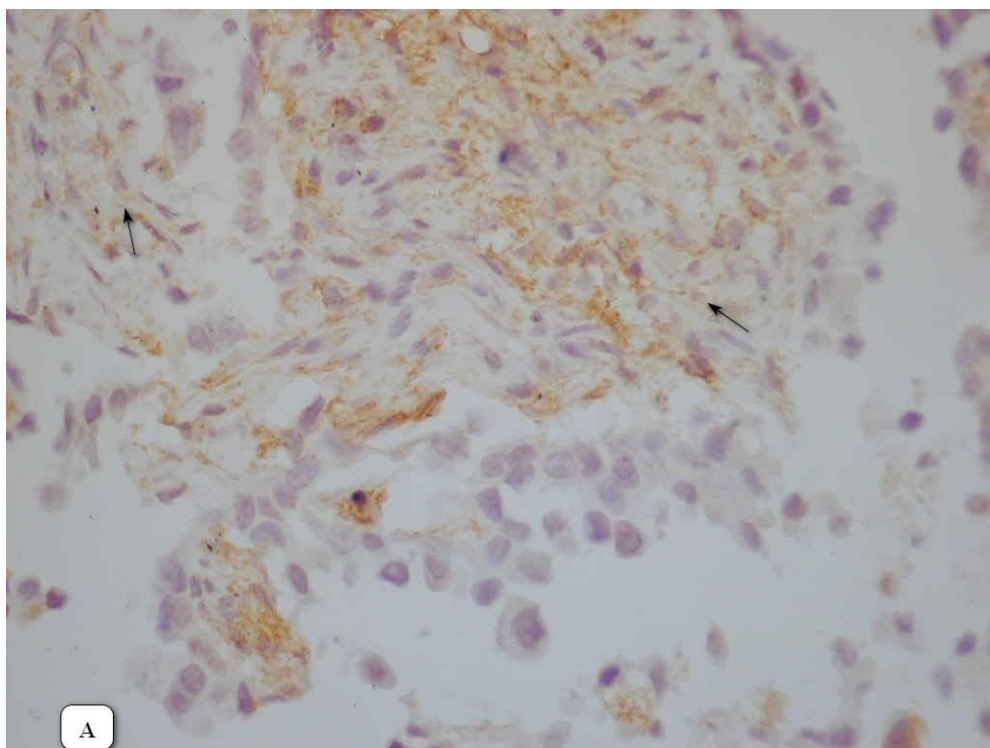


Рисунок 5.3.А – Появление признаков стволовых клеток (ИГХ метод с использованием антител к **А** – D2-40; x400).

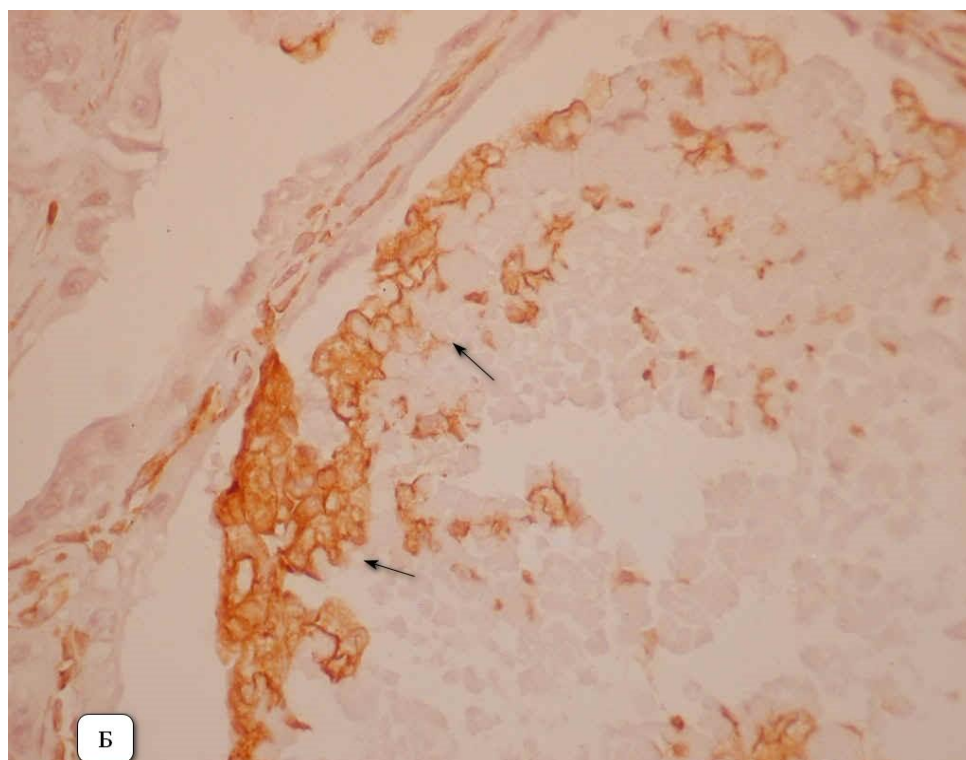


Рисунок 5.3.Б. Появление экспрессия мезенхимальных маркеров (ИГХ метод с использованием антител к **Б** – виментину; x400).

Папиллярная аденокарцинома легких, 2-я подгруппа НМРЛ

Отметим, что в 1-й подгруппе НМРЛ ($n = 16$) в 7 случаях (44 %) были выявлены признаки ЭМП. Во 2-й подгруппе НМРЛ ($n = 9$) переход наблюдали во всех образцах (100 %). В 1-й подгруппе КЖК ($n = 11$) ЭМП зарегистрировали в 6 случаях (54 %), а в их 2-й подгруппе ($n = 10$) переход наблюдали в 8 образцах опухолей (80 %).

Интенсивность пролиферации варьировала. Среди случаев НМРЛ при наличии ЭМП пролиферативная активность чаще была низкой (экспрессия Ki-67 < 10 % клеток). В образцах без ЭМП она была умеренной (Ki-67 20 – 30 %) и высокой (30 – 40 %), достигая иногда 60 %. При раке желудка кишечного типа, в аденокарциномах кишечника, как правило, интенсивность пролиферации была высокой, экспрессия Ki-67 в среднем составляла 30 – 50 %, однако при ЭМП её интенсивность снижалась.

В подавляющем большинстве случаев при эпителиально-мезенхимальном переходе наблюдали выраженную экспрессию сосудистого маркера CD34 и активацию ангиогенеза как при НМРЛ, так и в группе КЖК.

Отметим, что ЭМП наблюдалась преимущественно в опухолях, распределённых по результатам кластерного анализа во вторые подгруппы (соответственно, 100 % образцов опухолей, составлявших 2-ю подгруппу НМРЛ, и 80 % из 2-й подгруппы КЖК). Выявленные в них особенности обмена нуклеозидов, а также СОД, ГПО могли способствовать продукции 2-д-D-Риб-1-Ф, H_2O_2 и развитию их эффектов.

Следовательно в солидных опухолях различной локализации установлено увеличение активности ферментов деградации дезокситимидина и дезоксиаденозина, выявлен дисбаланс ферментов АОС.

Это выражалось в повышении активности ТФ и АДА. Можем считать, что это универсальное свойство карцином исследованных локализаций. В кооперации оба фермента могут обеспечивать как продукцию 2-д-D-Риб-1-Ф, так и ресинтез дезокситимидина. В пользу последнего свидетельствует нарастание силы связи, характеризующей корреляцию трансферазной активности ТФ и АДА в тканях опухоли ($\rho = 0,740$; $p < 0,001$).

Также на основании проведенного в соответствующих главах анализа, можем утверждать, что опухоли одной локализации и патоморфологического типа метаболически неоднородны. Согласно полученным результатам метаболическая неоднородность опухолей одной локализации и одной морфологии наблюдалась по активности антиоксидантных ферментов (СОД, ГПО) и фосфоорилазной активности ТФ.

Нарастание опухолевой фосфоорилазной активности ТФ в среднем в 2 раза на фоне повышения активности СОД и низкой активности ГПО могут формировать условия для стимулирования тканевыми метаболитами (H_2O_2 и 2-д-Д-Риб-1-Ф) опухолевой прогрессии. Предполагаем, что индивидуальные метаболические особенности могут непосредственно способствовать активации сигнальных путей, обеспечивающих формирование агрессивных свойств опухоли, т.ч. реализующих эпителиально-мезенхимальный переход.

Рассмотрим два клинических случая из тех, в которых нами были изучены как патоморфологические, так и метаболические особенности опухоли. Это два случая папиллярной аденокарциномы периферического рака легких одной стадии.

Клинический случай: Б-ой К., 49 лет.

Периферический рак нижней доли левого легкого T₂N₀M₀G₁. Сопутств. – антракоз легких, пневмосклероз.

Индивидуальные значения ферментативной активности:

«опухоль (контроль)»: СОД 1,16 (1,08) у.е.; ГПО 0,97 (1,80) нмоль/мин·мг; ТФк 229,60 (78,82) нмоль/мин·мг; ТФан 131,41 (108,26) нмоль/мин·мг; АДА 159,05 (97,9) нмоль/мин·мг.

Окраска гематоксилин/эозином: папиллярная аденокарцинома.

Иммуно-гистохимический анализ опухоли: признаки ЭМТ +, но очагово; высокие уровни экспрессии сосудистого маркера CD31 (3+), также для CD34 – экспрессия умеренной интенсивности (2+). Экспрессия Ki-67 умеренная, до высокой (30 – 40 % клеток).

По данным активности СОД случай включен во второй кластер, т.н. «НМРЛ 2 подгруппа». Активность ТФк в опухоли в 2,7 раза выше, чем в смежной нетрансформированной ткани. Повышение активности ТФан и АДА незначительное, соответственно, в 1,2 и 1,6 раза.

Клинический случай: Б-ая К., 55 лет.

Периферический рак верхней доли левого легкого, T₂N₀M₀G₁, 2-я клиническая группа. Сопутств. – антракоз легких, пневмокониоз.

Индивидуальные значения ферментативной активности «опухоль (контроль)»: СОД 1,20 (0,90) у.е.; ГПО 3,41 (3,03) нмоль/мин·мг; ТФк 100,94 (80,48) нмоль/мин·мг; ТФан 128,61 (86,67) нмоль/мин·мг; АДА 200,91 (100,45) нмоль/мин·мг;

Окраска гематоксилин/эозином: папиллярная аденокарцинома.

Иммуно-гистохимический анализ опухоли: признаки ЭМП +; *низкие уровни экспрессии сосудистых маркеров CD31 и CD34 (1+); сосудов в строме мало, они узкие, либо тонкостенные, расширенные из одного ряда эндотелиоцитов.*

Экспрессия Ki-67 неравномерная, умеренная до высокой (40 – 50 % клеток).

По данным активности СОД случай включен во второй кластер, т.н. «НМРЛ 2 подгруппа». Активность ТФк в опухоли *лишь незначительно выше активности в смежной нетрансформированной ткани (в 1,2 раза)*. На фоне высокой активности СОД, ГПО в данной опухоли нарастала, была в 3,6 раза выше, чем в первом случае. Повышение активности ТФан и АДА в опухоли, соответственно, в 1,5 и 2 раза, что сопоставимо с первым случаем.

Из этих двух случаев НМРЛ одной морфологической группы, именно в первом, где активность ТФк опухоли высокая, а ГПО крайне низкая, имелись метаболические предпосылки для большей продукции как 2-д-D-Риб-1-Ф, так и H₂O₂, а значит, их сочетанному стимулированию генов, запускающих ангиогенез, инвазию. Это хорошо согласуется с особенностями экспрессии сосудистых и пролиферативного маркеров описанных случаев НМРЛ.

РАЗДЕЛ 6

ОСОБЕННОСТИ МЕТАБОЛИЗМА ЭРИТРОЦИТОВ У ПАЦИЕНТОВ С НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ ЛЕГКИХ, АДЕНОКАРЦИНОМАМИ ЖЕЛУДКА И КИШЕЧНИКА

6.1 Особенности обмена эритроцитов при раке до развития анемии

В канцерогенезе определенное место занимают расстройства микроциркуляции, регионарная гипоксия. Они могут быть обусловлены морфофункциональными изменениями в эритроцитах, в том числе, из-за нарушений метаболизма этих клеток крови. В частности, деформабельность мембран эритроцитов определяется их липидным составом, а его изменения могут быть обусловлены дисбалансом повреждающих и пластических процессов. Одним из наиболее изученных механизмов повреждения клеточных структур является активация процессов окисления, индуцированных активными формами кислорода, об интенсивности которых свидетельствуют уровни малонового диальдегида (МДА). К тому же он сам является токсином, непосредственно стимулирующим окислительную модификацию белков (ОМБ). Следовательно, функция компонентов антиоксидантной системы чрезвычайно важна в процессах жизнедеятельности эритроцитов. Наиболее специфичными для эритроцитов являются супероксиддисмутаза (СОД) и глутатионпероксидаза (ГПО). Для газообменной функции эритроцитов роль молекул - регуляторов выполняют 2,3-дифосфоглицерат (2,3-ДФГ) и аденозин. Аденозиндезаминаза и ксантинооксидаза контролируют концентрацию аденозина и его конечного продукта распада – мочевой кислоты. В рамках настоящего исследования определялись особенности активности ферментов, уровни указанных ключевых метаболитов.

Морфо-функциональные особенности эритроцитов взаимосвязаны с балансом их обменных процессов. У пациентов с распространенными формами опухолевого процесса исследуемых локализаций в эритроцитах определяли особенности ферментативной активности АДА, КСО, СОД, ГПО. Данные по

особенностям их ферментативной активности сопоставляли с уровнями МДА, 2,3-ДФГ. Впервые в рамках исследования сравнивались особенности метаболизма красных клеток крови в зависимости от их уровней циркуляции. Так показатели метаболизма клеток, находившихся в периферическом кровотоке, (кровь получали традиционно из локтевой вены) были сопоставлены с особенностями обменных процессов в своих же эритроцитах, но находящихся в регионарном кровотоке.

Исследуя особенности активности фермента эритроцитов, установили, что при раке в этих клетках крови характерным является выраженное снижение активности АДА (Рисунок 6.1).

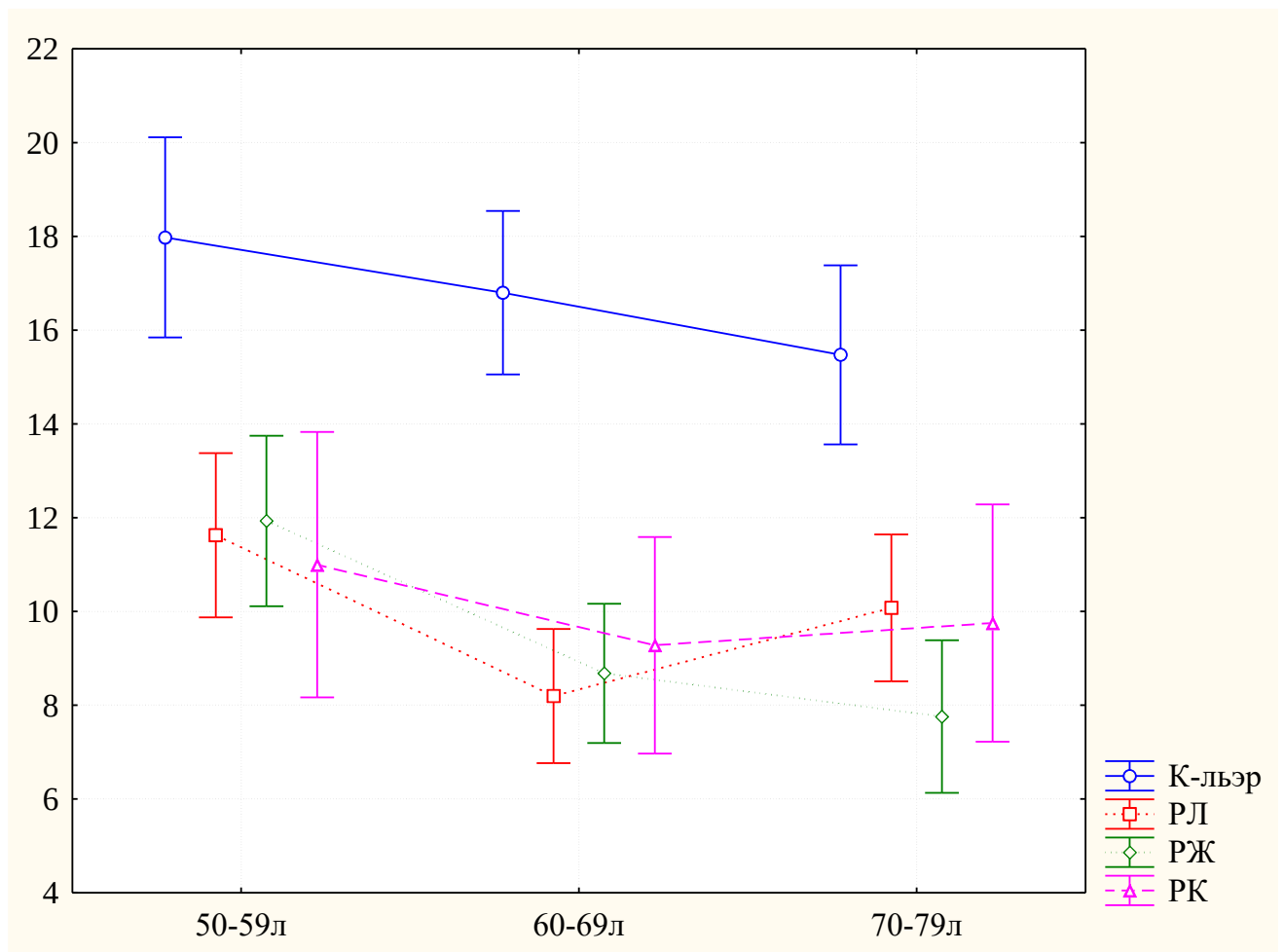


Рисунок 6.1 – Особенности активности аденозиндезаминазы (АДА) эритроцитов в норме и при опухолевой патологии в зависимости от возраста; нмоль/мин·мг

Примечание – к-ль эр – контрольная группа; РЛ – немелкоклеточный рак легких; РЖ – рак желудка; РК – колоректальный рак.

Действительно, для эритроцитов при раке различных локализаций изменения активности противоположны активности АДА в тромбоцитах (Раздел 3). Согласно проведенному однофакторному дисперсионному анализу при опухолевой патологии АДА в эритроцитах снижалась.

Отметим, что такое изменение активности АДА было характерно для всех исследуемых локализаций рака. Согласно результатам анализа апостериорных данных активности АДА (Таблица 6.1) установленные особенности её активности, связанные с опухолевым процессом, достоверны. Сопоставление значений активности проводилось с использованием критерия Тьюки для неравных объемов выборок.

Таблица 6.1 – Результаты сравнения значений активности АДА в нескольких несвязанных выборках

Показатель	Контроль	НМРЛ	РЖ	РК
Контроль		0,0002	0,0002	0,0003
НМРЛ	0,0002		0,99	0,64
РЖ	0,0002	0,99		0,85
РК	0,0003	0,64	0,85	

Примечания

1) Приближенные вероятности для апостериорных критериев

(Ошибка: Межгр. MS = 6,0957, сс = 72,000).

2) Курсивом отмечены недостоверные отличия ферментативной активности.

Причем изменения активности АДА не были связаны с локализацией процесса, носили универсальный характер.

О взаимосвязи сдвигов активности АДА и патологии также свидетельствует выявленное более выраженное угнетение активности АДА в эритроцитах регионарного кровотока по сравнению с образцами крови этих же пациентов, полученных одновременно из локтевой вены.

В частности, если у пациентов с КЖК активность АДА в периферическом кровотоке была в среднем в 1,6 раза ниже контроля, то у этих же пациентов в эритроцитах, циркулирующих в регионарном кровотоке, выявлено более существенное снижение активности в 3,2 раза по сравнению с контролем. Соответственно, $8,80 \pm 2,47$ и $4,28 \pm 2,13$ нмоль/мин·мг. Между подгруппами в зависимости от уровня циркуляции эритроцитов пациентов с КЖК различия также достоверны, согласно критерия Вилкоксона при попарном сопоставлении активности в двух образцах крови (КЖКп, КЖКот) величина критерия $W = 5,16$ ($p < 0,001$).

Для остальных показателей метаболизма эритроцитов при опухолевой патологии также регистрировали их изменения, связанные с основным заболеванием (Таблица 6.2).

Таблица 6.2 – Биохимические показатели эритроцитов в норме и при раках различной локализации (медиана, квартили)

Показатель	Контроль	НМРЛ	РЖ	РК
АДА	13,77 (11,59; 15,88)	9,07 (7,45; 10,30)	8,29 (7,04; 9,39)	7,88 (6,92; 8,89)
СОД	1,93 (1,58; 2,86)	4,66 (3,35; 5,00)	4,54 (3,23; 5,32)	4,17 (3,67; 4,83)
ГПО	6,06 (5,53; 6,38)	4,23 (3,43; 5,44)	4,86 (2,30; 5,93)	3,07 (2,49; 3,55)
КСО	2,99 (2,49; 3,37)	8,99 (5,33; 10,49)	10,13 (8,89; 11,25)	9,25 (8,07; 9,88)
МДА	3,56 (3,21; 3,73)	5,61 (5,26; 5,92)	6,08 (5,64; 7,12)	6,63 (5,77; 7,91)
2,3-ДФГ	3,76 (2,79; 4,79)	6,88 (6,10; 8,24)	9,50 (8,00; 11,28)	9,39 (8,27; 11,22)

Примечание – АДА – аденозиндезаминаза, СОД – супероксиддисмутаза, ГПО – глутатионпероксидаза, КСО – ксантиноксидаза, МДА – малоновый диацетальдегид, 2,3-ДФГ – 2,3-дифосфоглицерат.

В частности выявлен дисбаланс активности СОД и ГПО. Так для опухолей, исследуемых локализаций, установлено нарастание активности СОД (в среднем в 2 раза), а активность ГПО при этом, наоборот, снижалась (в среднем в 1,5 раза) (Таблица 6.2, Рисунок 6.3).

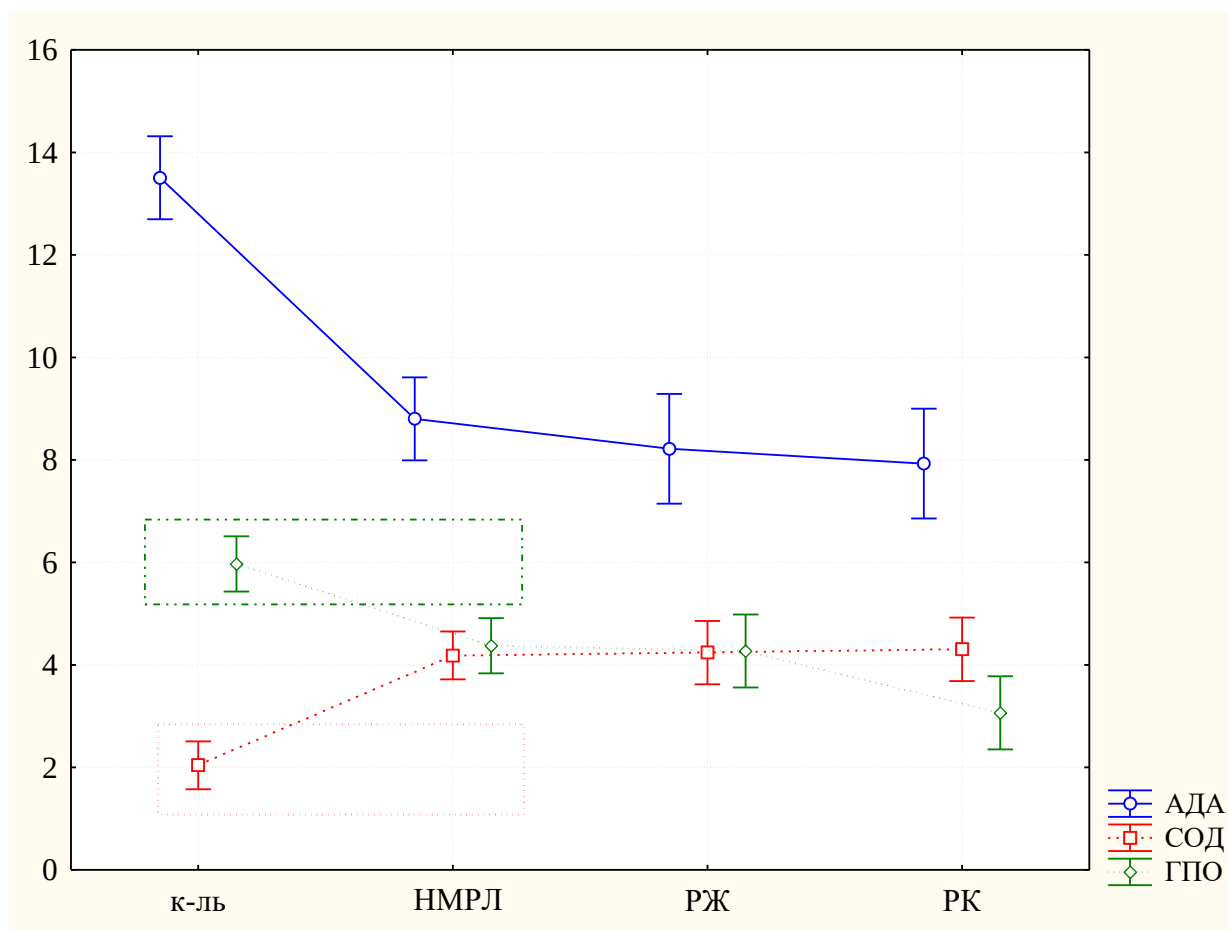


Рисунок 6.2 – Активность АДА, СОД, ГПО в эритроцитах при раке различных локализаций

Примечание – рамками отмечены достоверные отличия активности СОД, ГПО в норме и при раке различных локализаций.

На фоне этих изменений активности ферментов-антиоксидантов также установили нарастание активности КСО (Таблица 6.2, Рисунок 6.3), что хорошо

согласуется с повышением активности СОД, которая использует в качестве субстрата супероксидный анион, формируемый КСО.

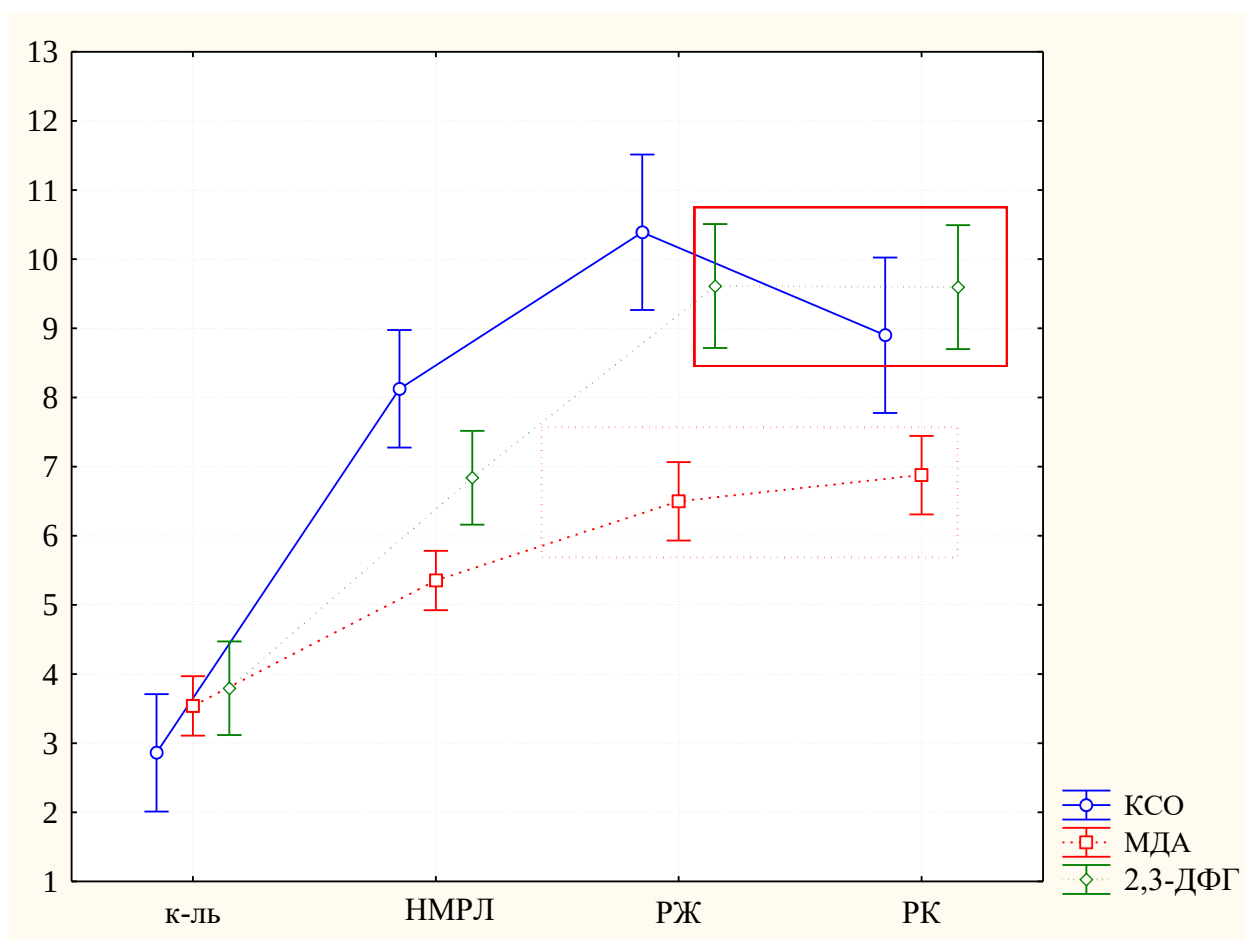


Рисунок 6.3 – Активность КСО и уровни МДА, 2,3-ДФГ в эритроцитах при раке различных локализаций

Примечание – Рамками отмечены достоверные отличия активности МДА, 2,3-ДФГ в норме и при раке различных локализаций.

Значения биохимических показателей эритроцитов при патологии сопоставлены со значениями контроля (Таблица 6.3).

Для сравнения использовали непараметрический тест Колмогорова-Смирнова.

Таблица 6.3 – Сравнительный анализ значений биохимических показателей эритроцитов в норме и при опухолевой патологии

Показатель	Контроль		Рак		p
	Среднее	Ст. откл.	Среднее	Ст. откл.	
АДА	13,50	2,47	8,80	1,73	< 0,001
СОД	2,04	0,67	4,18	1,32	< 0,001
ГПО	5,97	0,81	4,37	1,17	< 0,005
Нб	129,33	12,43	129,33	10,20	> 0,10
НСТ	40,85	3,93	40,85	3,49	> 0,10
КСО	8,13	0,68	8,13	2,83	< 0,001
МДА	5,35	0,59	5,35	0,88	< 0,001
2,3-ДФГ	6,84	1,15	6,84	1,72	< 0,001

Примечания

1) курсивом отмечены недостоверные отличия значений показателя по сравнению с контролем;

2) Нб – гемоглобин, г/л; НСТ – гематокрит, %.

Данный тест более чувствительный по сравнению с критерием Манна-Уитни.

Согласно полученным результатам, при опухолевой патологии выявлены изменения обменных процессов, характеризующиеся усилением прооксидантных процессов и напряженностью газотранспортной функции эритроцитов. При этом были установлены общие тенденции, характерные для НМРЛ, РЖ, РК.

Крайне важно отметить, что при этом не было выявлено отличий в содержании Нб и значениях НСТ между эритроцитами, служившими контролем и эритроцитами пациентов при опухолях исследуемых локализаций (таблица 6.3). То есть ещё до развития анемии выявлены нарушения обмена в эритроцитах при раке. Как известно, является сопутствующим синдромом, чьё развитие сопряжено с неблагоприятным прогнозом по основному заболеванию.

Дальнейший анализ показал наличие специфических изменений в зависимости от локализации опухоли. Установили, что для уровней МДА и 2,3-ДФГ было характерно более выраженное их сочетанное нарастание при КЖК по сравнению с НМРЛ, о чём свидетельствуют данные анализа с использованием в качестве апостериорных тестов критерия Шеффе (Таблица 6.4).

Таблица 6.4 – Значения критерия вероятности Шеффе для апостериорных критериев для значений МДА И 2,3-ДФГ эритроцитов в норме и при раке различных локализаций

МДА				
Материал	контроль	НМРЛ	РЖ	РК
контроль		0,00003	0,00	0,00
НМРЛ	0,00003		0,022	0,001
РЖ	0,00	0,022		0,83
РК	0,00	0,001	0,83	
2,3-ДФГ				
Материал	контроль	НМРЛ	РЖ	РК
контроль		0,00001	0,00	0,00
НМРЛ	0,00001		0,0001	0,0001
РЖ	0,00	0,0001		1,00
РК	0,00	0,0001	1,00	

Примечание – курсивом отмечены недостоверные отличия значений показателя в группах сравнения.

При этом согласно результатам дискриминантного анализа наиболее значимыми корреляциями среди пар показателей характеризовались Нб и НСТ, что было абсолютно закономерным, но также и МДА и 2,3-ДФГ (Таблица 6.5).

Таблица 6.5 – Объединенные внутригрупповые корреляции биохимических показателей эритроцитов при патологии согласно результатам дискриминантного анализа

Показатель	АДА	СОД	ГПО	Нб	НСТ	КСО	МДА	2,3-ДФГ
АДА	1,00	-0,07	0,15	-0,01	-0,10	0,23	0,02	-0,12
СОД	-0,07	1,00	-0,12	0,07	0,12	-0,08	-0,09	0,17
ГПО	0,15	-0,12	1,00	0,28	0,28	-0,03	-0,03	-0,15
Нб	-0,01	0,07	0,28	1,00	0,82	-0,14	-0,06	0,02
НСТ	-0,10	0,12	0,28	0,82	1,00	-0,10	-0,05	-0,00
КСО	0,23	-0,08	-0,03	-0,14	-0,10	1,00	0,19	0,09
МДА	0,02	-0,09	-0,03	-0,06	-0,05	0,19	1,00	0,54
2,3-ДФГ	-0,12	0,17	-0,15	0,02	-0,00	0,09	0,54	1,00

Можно отметить, что положительная слабая связь между особенностями активности АДА и КСО указывает на то, аденозин не единственный источник мочевой кислоты, а также на возможность потребления промежуточных метаболитов катаболизма аденозина в других процессах обмена.

Как уже было отмечено выше (таблица 6.3), важно отметить, что при этом исследуемые выборки данных характеризовались отсутствием различий по Нб и НСТ между контролем и патологией (Рисунок 6.4 А и Б).

Таким образом, ещё до развития анемии в эритроцитах пациентов, страдающих от НМРЛ или КЖК (то есть при раке желудка или колоректальном раке, т.е при карциномах желудка и кишечника), выявлены достоверные изменения обменных процессов, характеризовавшиеся усилением ПОЛ, а значит и ОМБ, что могло сопровождаться дисфункцией эритроцита.

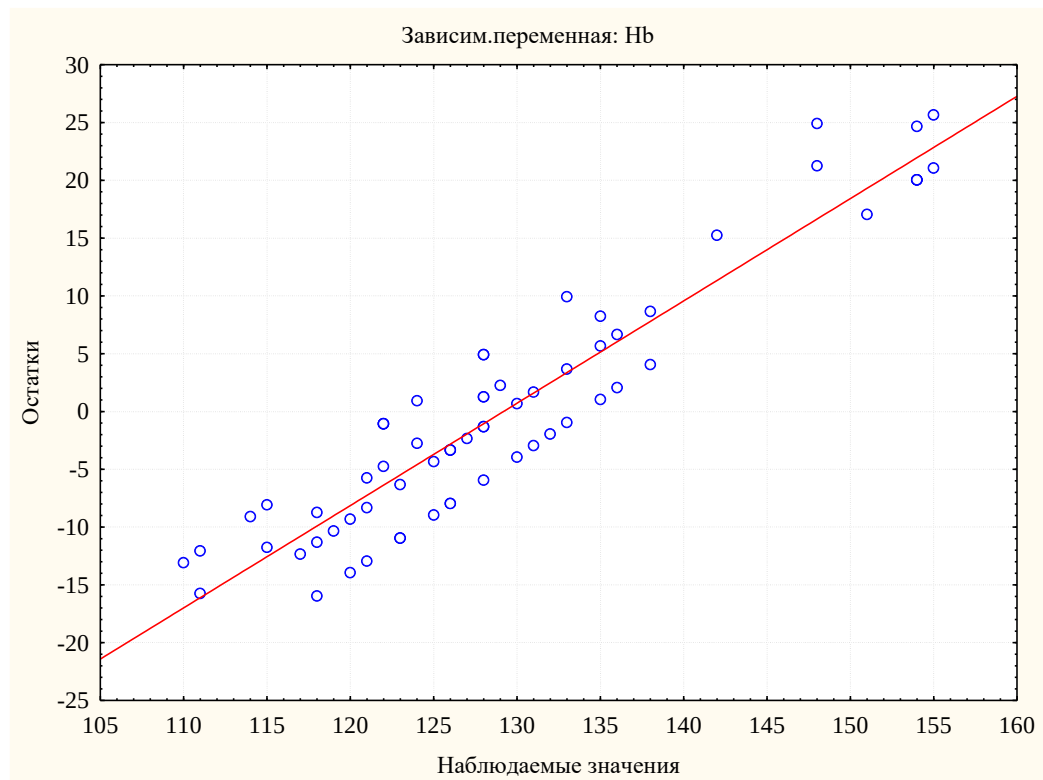


Рисунок 6.4 А – Наблюдаемые остатки значений переменных по Hb в эритроцитах при опухолевой патологии

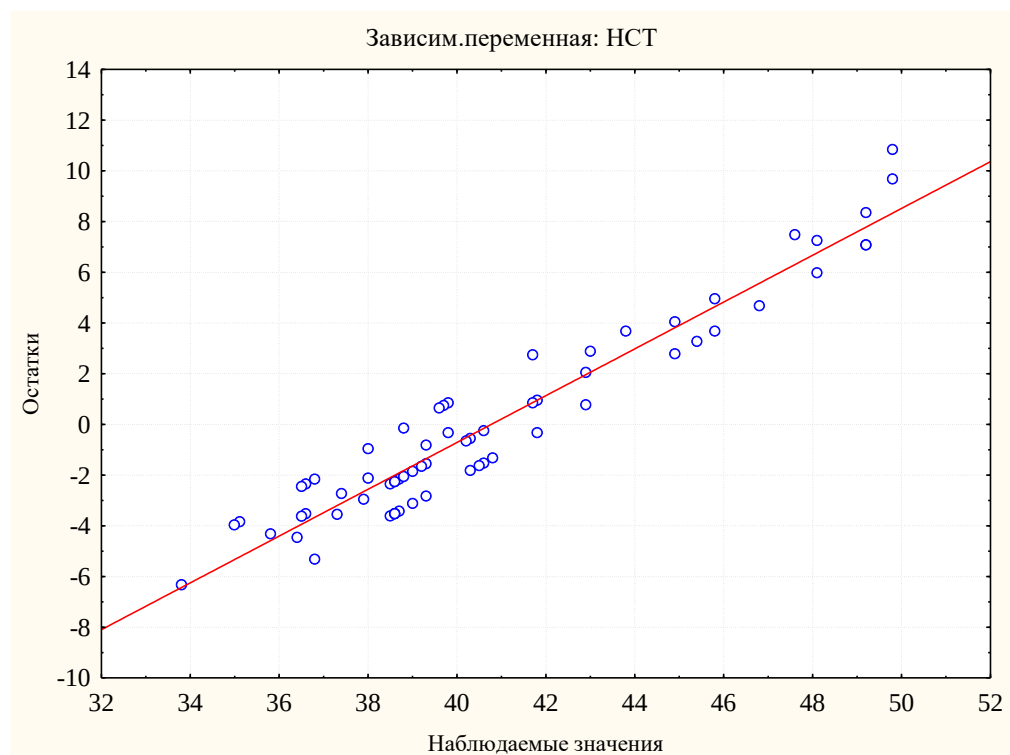


Рисунок 6.4. Б – Наблюдаемые остатки значений переменных по HCT в эритроцитах при опухолевой патологии

О сопряженности нарушений газообмена и ПОЛ свидетельствует выявленная в результате дискриминантного анализа положительная корреляция МДА и 2,3-ДФГ (Таблица 6.5). Причем обращает на себя внимание тот факт, что если корреляция и сила связи между гемоглобином и гематокритом ожидаемы, то МДА и 2,3-ДФГ продемонстрировали довольно выраженную взаимосвязь поскольку для остальных показателей подобных корреляций не установлено.

О взаимосвязи нарушений обменных процессов в эритроците и патологии также свидетельствует тот факт, что выраженность нарушений обмена зависела от уровня циркуляции красных клеток крови.

Так, дисметаболические процессы были максимально выражены в эритроцитах, циркулировавших в региональном кровотоке, в так называемых «оттекающих от опухоли» эритроцитах по сравнению с их системной циркуляцией, то есть в клетках, находившихся в периферическом кровотоке.

Согласно полученным данным, в эритроцитах регионарного кровотока достоверно нарастали те дисметаболические процессы, которые были установлены в эритроцитах периферического кровотока при КЖК. (Таблица 6.6, где КЖК п – показатели эритроцитов системного уровня циркуляции, КЖКот – соответственно, показатели регионарного кровотока).

Так, при исследовании активности ферментов в «оттекающей крови» от *Locus morbi* активность АДА была резко в 1,8 раза ниже, чем в эритроцитах, циркулирующих удаленно от опухолевого очага, то есть в системном кровотоке.

Активность КСО и ГПО имели те же тенденции, что и АДА, но менее выраженные, поскольку снижение их активности в «оттекавших от органа» эритроцитах было лишь в 1,3 раза ниже по сравнению с эритроцитами этих же пациентов, но полученных из системного кровотока, $p = 0,001$ и $p = 0,008$, соответственно.

Причем нарастание активности КСО косвенно свидетельствует о напряженности энергообмена в эритроцитах, поскольку КСО в частности является ферментом катаболизма аденилата, уровни которого в эритроците значительно превышают уровни гуанилата.

В тоже время сохранялись пусть слабые взаимосвязи между активностью ферментов катаболизма аденозина. Так, например, согласно Таблице 6.6 значительное снижение активности АДА в «оттекающей крови» сопровождалось гораздо менее выраженным, но все же достоверным однонаправленным изменением активности КСО в «оттекающей крови», то есть её снижением.

Таблица 6.6 – Значения биохимических показателей эритроцитов при карциномах желудка и кишечника (КЖК), регистрировавшиеся в периферическом кровотоке и в регионарном (медиана, квартили; W-критерий Вилкоксона)

Показатель	КЖК п	КЖК от	W	p
АДА	8,66 (7,84; 9,25)	4,80 (4,30; 5,73)	3,51	0,001
КСО	11,41 (9,02; 12,42)	8,88 (6,98; 10,53)	3,18	0,001
ГПО	3,04 (2,88; 4,38)	2,41 (1,34; 2,49)	2,65	0,008
МДА	5,90 (5,51; 8,11)	6,73 (5,90; 8,72)	3,41	0,001
2,3-ДФГ	9,23 (8,41; 11,33)	15,77 (10,64; 18,17)	2,93	0,003

На фоне выявленных изменений ферментативной активности наблюдали тенденцию к дальнейшему повышению уровней МДА ($p = 0,001$). Что также согласовывалось с угнетением активности ГПО, являлось показателем интенсивности процессов ПОЛ. На этом фоне регистрировали нарастание уровней 2,3-ДФГ в 1,7 раза по сравнению с его уровнями в эритроцитах этих же пациентов, циркулирующих в системном кровотоке ($p = 0,003$).

Также можно отметить, что некоторые биохимические показатели в эритроцитах, «оттекавших от органа», коррелировали со своими значениями в эритроцитах, циркулирующих в системном кровотоке.

Так, для активностей КСО, ГПО и уровней МДА, а также 2,3-ДФГ выявлены сильные прямые связи между своими показателями в КЖКп и КЖКот (соответственно, их ранговые корреляции Спирмена при условии $p < 0,05$ составили 0,77; 0,90; 0,91 и 0,72).

Причем убедителен характер и сила связей, поскольку сами показатели между собой хорошо взаимосвязаны патогенетически.

Возможно предположить, что для изменения этих показателей процессы, происходящие в зоне опухолевого поражения существенны для их изменений в системе целостного организма. Вероятно, что выявленные корреляции отражают в некоторой мере мнение о системном характере влияния опухоли на организм.

Также существенный интерес для нас представляли возможные корреляции между различными биохимическими показателями эритроцитов. Для уточнения их характера использовали непараметрический показатель ранговых корреляций Спирмена (Таблица 6.7).

Среди показателей метаболизма эритроцитов определили, что для эритроцитов регионарного кровотока к специфичным, связанным с наличием опухолевого процесса свойствам относятся следующие: снижение активности АДА и ГПО (показатель ранговой корреляции Спирмена $\rho = -0,78$ и $-0,63$).

Это хорошо согласуется с сильной прямой связью для уровней 2,3-ДФГ, нараставших в эритроцитах регионарного кровотока, что свидетельствовало об ухудшении газообмена в эритроцитах при дисбалансе их метаболизма.

Также хорошо согласуется со снижением активности АДА, что ведёт к повышению уровней аденозина, который, как известно инициирует формирование интермедиата гликолиза - 2,3-ДФГ.

Таблица 6.7 – Ранговые корреляции Спирмена между парами показателей, регистрировавшихся у пациентов с карциномами желудка или кишечника в эритроцитах периферического и регионарного уровней циркуляции

	Материал	АДА	КСО	ГПО	МДА	2,3-ДФГ
Материал		-0,78		-0,63		0,68
АДА	-0,78		0,45			-0,66
КСО		0,45		0,49		
ГПО	-0,63		0,49			
МДА						
2,3-ДФГ	0,68	-0,66				

Примечание – отмеченные корреляции значимы на уровне $p < 0,05$.

Также о чувствительности установленных корреляций свидетельствует наличие прямых средней силы связей, выявленных для КСО и АДА, поскольку это ферменты одного общего процесса - катаболизма аденилата. А так как в виду особенностей своей активности КСО – она поставщик АФК, то положительная связь между КСО и ГПО активностями ($p = 0,49$) хорошо согласуется с антиоксидантной функцией ГПО.

Дальнейший анализ всей совокупности переменных генеральной выборки по биохимическим параметрам эритроцитов при патологии показал неоднородность распределения показателей эритроцитов, как по ферментативной активности, так и по уровням гемоглобина и гематокрита.

Однофакторный анализ предсказанных значений выборки и остатков по значениям Нв и НСТ указывал на наличие в ряде случаев у пациентов анемии (Рисунок 6.5 А и Б).

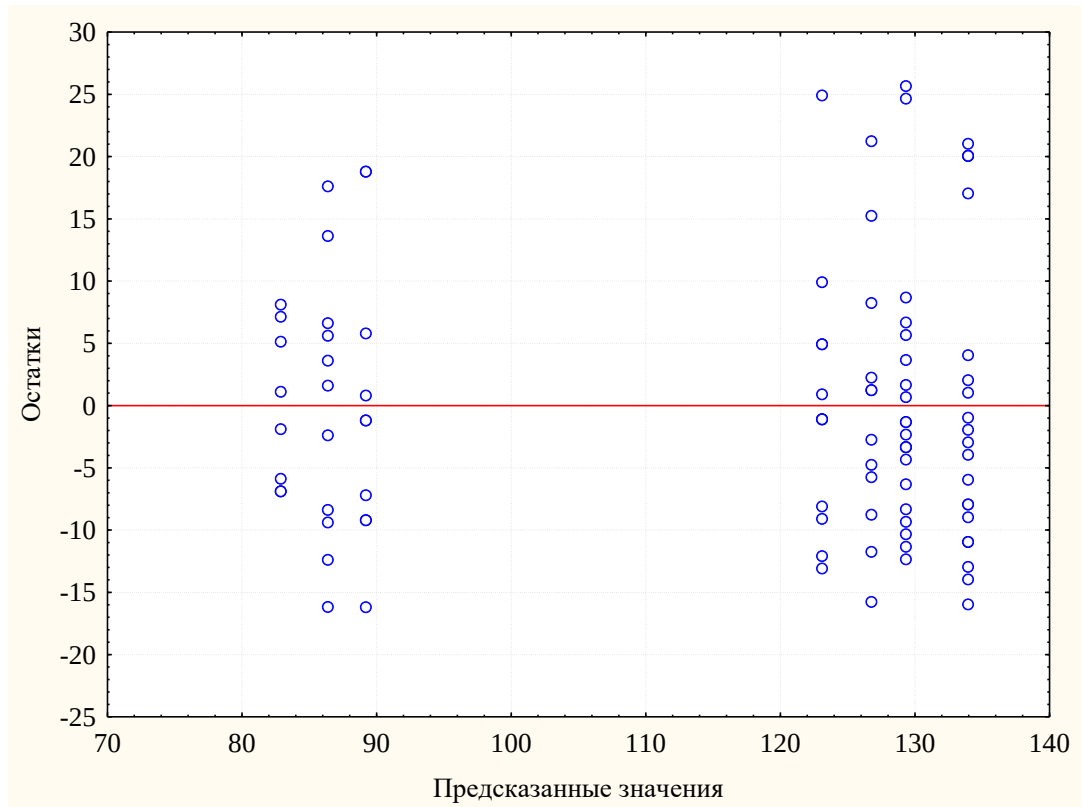


Рисунок 6.5. А – Наблюдаемые остатки значений переменных по Hb

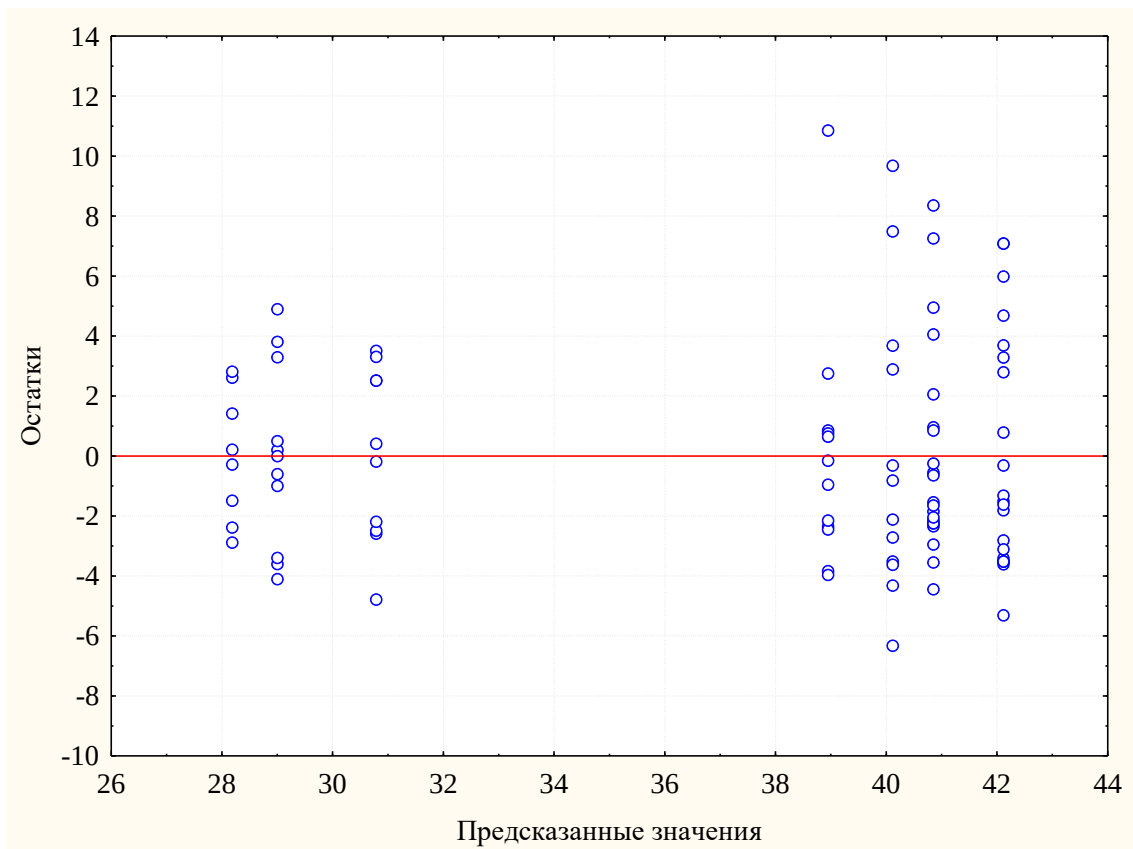


Рисунок 6.5. Б – Наблюдаемые остатки значений переменных по HtC в эритроцитах при опухолевой патологии (генеральная выборка)

Согласно выявленному характеру распределения предсказанных значений показателей гемоглобина и гематокрита, а также остатков, формировались две группы материала в каждой локализации – без анемии и с её наличием. Характер разброса абсолютных значений и гемоглобина и гематокрита (рисунок 6.5. А и Б) убедительно об этом свидетельствуют.

Проведенный анализ однородности значений показателей в выборках при патологии помимо её отсутствия для значений Hb и HCT, ассоциированных с развитием анемии, также определил неоднородность значений 2,3-ДФГ при патологии (Таблица 6.8). Очевидно, что данный показатель может быть также неспецифически связан с развитием анемии, так как это согласуется с «синдромом старения» эритроцитов у онкологических больных.

Таблица 6.8 – Определение однородности дисперсий биохимических показателей эритроцитов пациентов при раке различных локализаций согласно критерия Левена (F)

	MS	MS	F	p
АДА	4,92	0,74	6,61	0,0006
СОД	1,50	0,31	4,86	0,0042
ГПО	3,48	0,41	8,42	0,0001
Hb	28,90	47,24	0,61	0,6100
HCT	5,31	5,34	1,00	0,4012
KCO	12,51	1,07	11,70	0,0001
МДА	1,39	0,33	4,21	0,0090

Примечание – курсивом отмечены показатели, для которых не выявлено достоверных значений критерия F, характеризующего однородность значений показателя в его выборке.

Действительно, наличие анемического синдрома делает необходимым дальнейший анализ полученных результатов с учетом наличия либо отсутствия анемии.

6.2. Особенности обмена эритроцитов при раке на фоне развития анемии

При анализе полученных данных определили, что показатели ферментативной активности варьировали. Например, в 12% случаев активность ГПО не отличалась достоверно от контроля. В подавляющем большинстве случаев – 86 % она была ниже контроля. При этом СОД также не всегда отличалась от контроля, хотя, наоборот, в большинстве случаев повышалась. Провели кластерный анализ (пример – Рисунок 6.6)

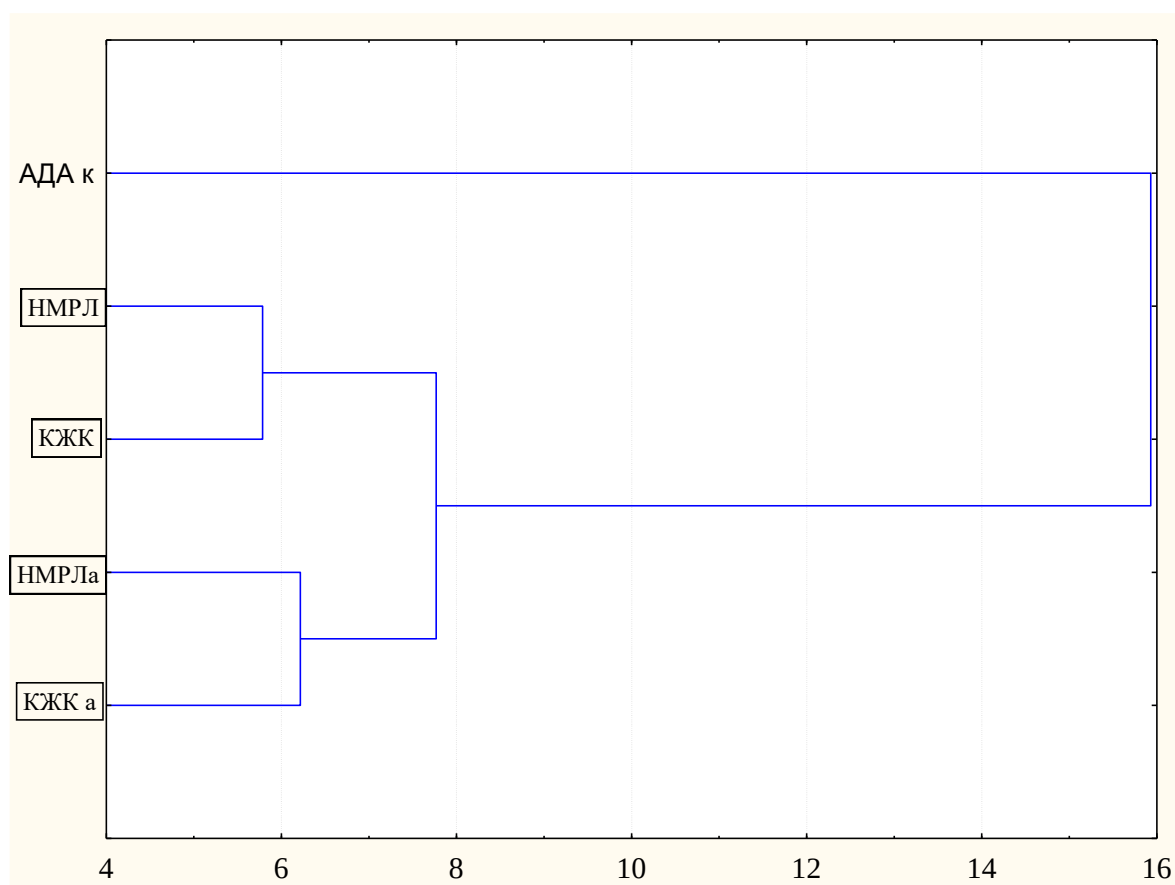


Рисунок 6.6 – Кластерный анализ абсолютных значений ферментативной активности АДА эритроцитов в норме и при опухолевой патологии

Действительно, согласно кластерному анализу выборки показателей ферментативной активности и уровней метаболитов в эритроцитах при патологии были неоднородны. Поскольку были выявлены случаи анемии, то попытались сопоставить особенности ферментативной активности в зависимости от наличия анемии. Согласно результатам анализа, действительно, для каждого фермента выявлены кластеры (подгруппы), в которых особенности активности ферментов в эритроцитах сопряжены с наличием анемического синдрома. На примере активности АДА согласно рисунка 6.6 для каждой локализации при анемии наблюдались более выраженные нарушения обменных процессов в эритроцитах.

Таким образом, проведенный кластерный анализ значений показателей обмена эритроцитов выявил их неоднородность. Для НМРЛ, КЖК им определены подгруппы (кластеры), где нарушения метаболизма были наиболее выражены (таблицы 6.9 и 6.10).

Таблица 6.9 – Активность ферментов – антиоксидантов и аденозиндезаминазы в эритроцитах по результатам кластерного анализа (медиана, квартили; нмоль/мин·мг белка)

	Контроль (n = 19)	НМРЛ (n = 29)		КЖК (n = 45)	
Кластер		1	2	1	2
СОД	2,51 (1,58; 3,00)	2,88 (1,86; 4,27)	3,34 * (2,11; 4,59)	3, 21 (2,06; 4,70)	3,95 * (2,82; 5,95)
ГПО	6,67 (5,87; 7,86)	5,28 (3,99; 7,65)	2,62 ** (0,90; 3,22)	5,04 * (4,55; 6,08)	1,58 ** (0,89; 2,54)
АДА	13,88 (9,42; 16,65)	10,02 * (7,89; 12,58)	6,45 ** (4,71; 8,95)	8,63 ** (7,43; 9,88)	4,28 ** (3,48; 6,84)

Примечание – * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$ по сравнению с контролем.

Для всех локализаций определили общие тенденции среди показателей обмена, распределенных во вторые подгруппы (кластеры). В этих подгруппах на фоне повышения активности СОД наблюдалось выраженное снижение активности ГПО.

Таблица 6.10 – Активность ксантиноксидазы, значения некоторых биохимических показателей в эритроцитах по результатам кластерного анализа

	Контроль (n = 19)	НМРЛ (n = 29)		КЖК (n = 45)	
Кластер		1	2	1	2
Нб	131 (125; 138)	127 (123; 133)	88 ** (80; 95)	123 (116; 128)	84 ** (77; 91)
НСТ	40,60 (38,70; 45,40)	39,30 (38,60; 41,80)	30,90* (28,30; 33,30)	38,40 (36,55; 40,75)	28,40 ** (25,80; 30,80)
КСО	2,99 (2,49; 3,40)	8,99 ** (5,33; 9,50)	9,39 ** (7,87; 9,91)	9,60 ** (8,58; 10,52)	8,84 ** (7,87; 9,53)
МДА	3,56 (3,21; 3,72)	5,61 * (5,26; 5,90)	6,36 ** (5,77; 7,88)	6,28 ** (5,72; 7,66)	7,37 ** (5,90; 8,72)
2,3-ДФГ	3,76 (2,79; 4,71)	6,88 ** (6,10; 8,23)	13,98 ** (12,33; 12,33)	9,17 ** (8,22; 10,98)	15,77 ** (14,07; 16,68)

Примечание – * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$ по сравнению с контролем.

Причем эритроциты, выделенные во второй кластер при КЖК, отличались минимальной активностью фермента, ниже в 4,2 раза контроля, но и в 1,7 раза ниже активности во втором кластере при НМРЛ ($p = 0,03$).

Вероятно, особенности развития дисметаболических процессоов, установленные в эритроцитах онкобольных, свидетельствуют о большей их интенсивности в эритроцитах при раке ЖКТ. Возможно, что это взаимосвязано с выраженным характером, который носят процессы свободно-радикального окисления в слизистых желудка или кишечника, описанными в Разделе 4. Следовательно, возможной причиной этого могут быть дисметаболические процессы в эритроцитах, ведущие к их дисфункции, а значит развитию гемической гипоксии.

При помощи непараметрического критерия Вилкоксона при сопоставлении биохимических показателей между подгруппами определили их достоверные отличия (таблица 6.11).

Таблица 6.11 – Сравнительный анализ особенностей биохимических показателей обмена эритроцитов, сопутствующих развитию анемии при опухолевой патологии (W-критерий Вилкоксона)

Показатель	W НМРЛ/ НМРЛа	p	W КЖК/ КЖКа	p
Нб	2,80	0,005	3,82	< 0,001
НСТ	2,83	0,005	3,78	< 0,001
АДА	2,80	0,010	3,82	< 0,001
КСО	2,09	0,037	2,15	0,031
СОД	2,50	0,011	1,16	0,253
ГПО	2,80	0,005	3,82	< 0,001
МДА	3,56	0,036	1,73	0,084
2,3-ДФГ	2,81	0,005	3,18	0,002

Примечание – курсивом отмечены показатели, между которыми отсутствуют достоверные отличия.

Далее анализировали особенности биохимических показателей в эритроцитах, сопутствующие развитию анемии. При этом лишь для СОД и МДА эритроцитов при КЖК различия при наличии анемии недостоверны. В свою очередь это можно пояснить тем, что по своим значениям они более выражены именно при КЖК, поскольку в своей основной группе близки к значениям при анемии при НМРЛ. Для уточнения выявленных тенденций в нарушениях метаболизма эритроцитов в организме онкологического больного при развитии синдрома анемии был проведен однофакторный анализ ANOVA взаимосвязей показателей обмена с наличием синдрома анемии (рисунки 6.7 и 6.8).

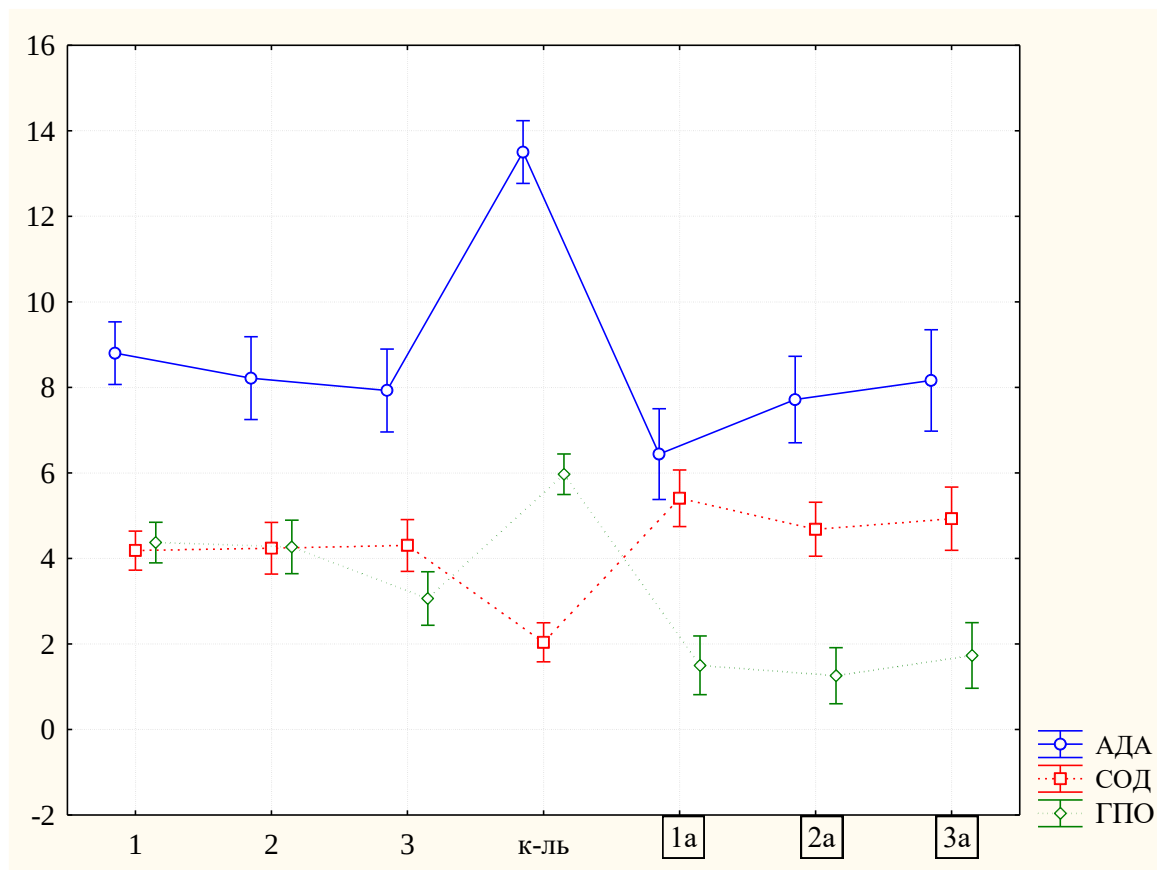


Рисунок 6.7 – Активность АДА, СОД, ГПО в эритроцитах при раке различных локализаций без сопутствующей анемии и при развитии анемии

Примечания

- 1) 1– НМРЛ без анемии, 1a – НМРЛ при развитии анемии;
- 2) 2– РЖ без анемии, 2a – РЖ с развитием анемии;

3) 3– РК без анемии, 3а – РК с развитием анемии.

Данный график особенностей нарушений обменных процессов в эритроцитах онкологических больных в зависимости от развития анемического синдрома указывает на то, что при этом синдроме наблюдаются выраженный дисбаланс активности СОД и ГПО. Поскольку при этом в эритроцитах может формироваться H_2O_2 и оказывать токсические эффекты ввиду низкой активности ГПО.

Активность КСО сохранялась высокой (при анемии отмечена лишь тенденция к её снижению по сравнению с основной группой; однако при этом и при НМРЛ, и при КЖК активность КСО была 3 раза выше контроля).

Это также способствовало усилению процессов свободно-радикального окисления, поскольку формировало дополнительные количества H_2O_2 .

В пользу нарастания прооксидантных процессов при развитии анемии у онкологических больных свидетельствуют более высокие уровни МДА, выявленные в подгруппах с развитием анемии как при НМРЛ, так и при РЖ, и при РК (рисунок 6.8, таблица 6.11).

Как видно по результатам дисперсионного анализа при развитии анемии для всех показателей тенденции, сопровождавшие дисметаболические нарушения в эритроцитах, развившиеся на фоне опухолевого процесса сохранялись.

Для некоторых показателей установлено более выраженное их изменение не только по сравнению с контролем, но и по сравнению с нарушениями, имевшими место при развитии опухолевого процесса, но ещё не сопровождавшимися развитием анемии. Прежде всего, это дисбаланс активности ферментов-антиоксидантов.

Так как активность ГПО, наоборот, в подгруппах со снижением гемоглобина и гематокрита была более низкой, снижаясь при НМРЛ с сопутствовавшей анемией в 2 раза по сравнению с эритроцитами при НМРЛ без анемического синдрома.

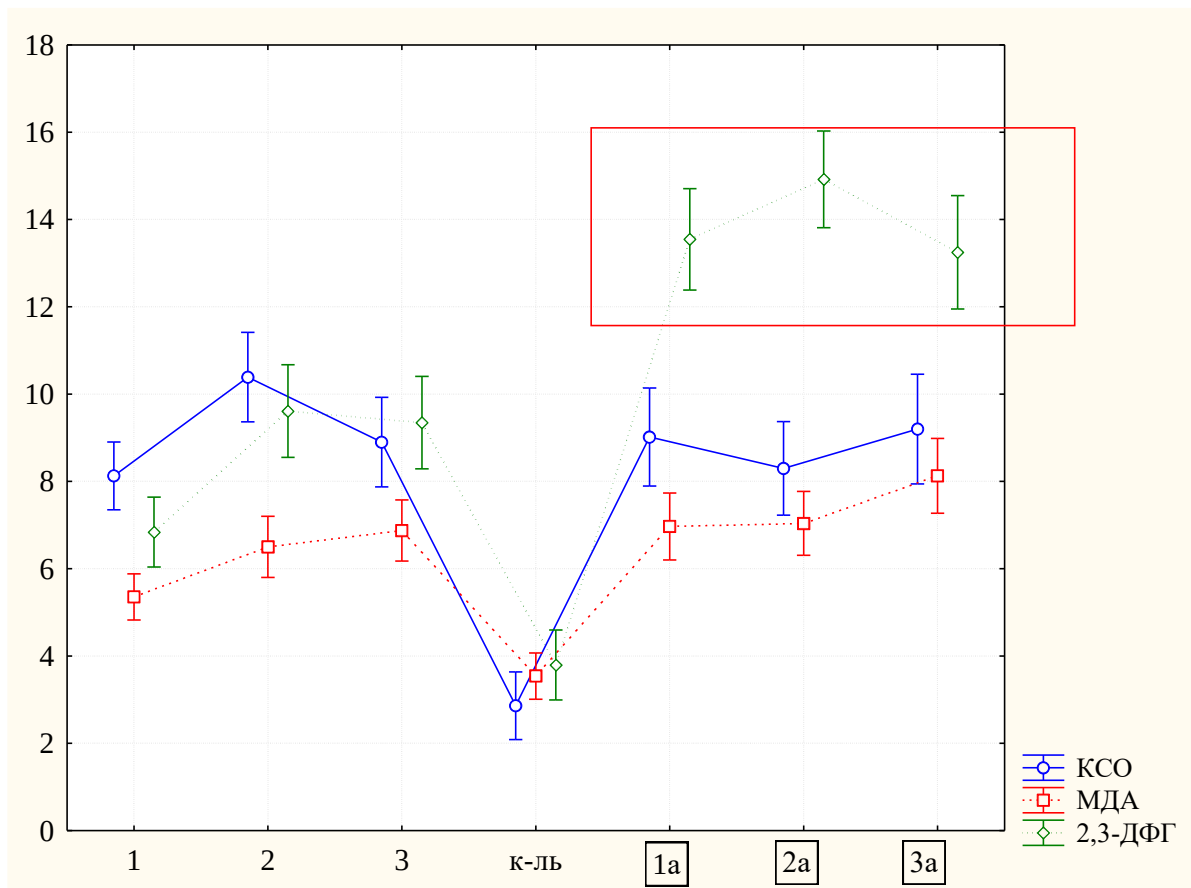


Рисунок 6.8 – Активность КСО, уровни МДА, 2,3-ДФГ в эритроцитах при раке различных локализаций без сопутствующей анемии и при развитии анемии

Примечания

- 1) 1– НМРЛ без анемии, 1a – НМРЛ при развитии анемии;
- 2) 2– РЖ без анемии, 2a – РЖ с развитием анемии;
- 3) 3– РК без анемии, 3a – РК с развитием анемии;
- 4) рамкой отмечено значительное повышение уровней 2,3-ДФГ в эритроцитах при развитии анемии.

Отметим подобный характер нарушений, но большей степени силы был выявлен для пациентов, страдавших карциномами желудка или кишечника (КЖК) (Рисунок 6.7, Рисунок 6.8).

При КЖК в сочетании с анемией снижение ГПО было наиболее резким, активность фермента в 3,2 раза была ниже по сравнению с эритроцитами при КЖК без анемического синдрома.

Закономерным при этом было повышение уровней МДА в подгруппах эритроцитов при развитии анемии. Так, при НМРЛ с сопутствующим анемическим синдромом в этих эритроцитах регистрировали повышение уровней МДА в 3,7 раза по сравнению с контролем. В то время как на до анемическом этапе было выявлено повышение МДА в группе НМРЛ в 1,8 раза по отношению к контролю (Таблица 6.10).

Отметим, что при раке желудка или кишечника данные тенденции по усилению процессов ПОЛ были еще значительнее. Так, при КЖК с сопутствующим анемическим синдромом в эритроцитах повышение уровней МДА было в 4,2 раза по сравнению с контролем, а до развития анемии оно превышало контроль в 2,4 раза (Таблица 6.10).

Необходимо отдельно отметить, что установленное отсутствие однородности дисперсии значений переменных 2,3-ДФГ в выборках при патологии также оказалось ассоциированным с наличием анемического синдрома. Соответственно, были выявлены не только достоверные отличия его значений между кластерами значений показателя при определенной локализации процесса, протекающего без развития анемии по сравнению с его же значениями для опухолевого процесса этой же локализации, но протекающего с сопутствующим развитием анемического синдрома.

Так, согласно данным, приведенным для значений 2,3-ДФГ в зависимости от наличия анемии видно, что в подгруппах с анемией и для НМРЛ, и для КЖК характерно максимальное нарастание его уровней по сравнению с контролем (соответственно, в 1,8 и 2,4 раза). В случае развития анемии его значения резко возрастали (соответственно в 3,7 раза при анемии при НМРЛ; в 4 раза при анемии при КЖК).

Таким образом, установлено, что при развитии анемического синдрома при раках различных локализаций отмечается развитие дисфункции эритроцитов, ведущей к ухудшению газообмена в тканях. Данные нарушения сопряжены с синдромом анемии, указывают на риск развития гемической гипоксии, что может способствовать формированию агрессивного фенотипа опухоли.

Нами также исследованы корреляции между показателями метаболизма, связанные с развитием анемического синдрома у пациентов при раке различных локализаций (таблица 6.12).

Отметим, что выявленный дисбаланс активности ферментов-антиоксидантов, закономерное нарастание уровней МДА и 2,3-ДФГ указывают на то, что для канцерассоциированной анемии существенным фактором риска её развития являются окислительные процессы, которые неизбежно ведут к дисфункции гемоглобина, нарастанию концентрации его нефункциональной окисленной формы – метгемоглобина. Это подтверждается наличием прямых сильных связей между особенностями активности ГПО (наряду с метгемоглобинредуктазой – главный детоксикант эритроцита) и уровнями гемоглобина и гематокрита.

Таблица 6.12 – Значения коэффициента ранговой корреляции Спирмена ρ (попарное сравнение показателей обмена эритроцитов при раке различных локализаций, протекающего с сопутствующим развитием анемии)

Е	АДА	СОД	ГПО	НЬ	НТС	КСО	МДА	2,3-ДФГ
АДА	1,00	-0,58	0,61	0,46	0,41	-0,41	-0,55	-0,68
СОД	-0,58	1,00	- 0,54	-0,41	-0,37	0,42	0,54	0,60
ГПО	0,61	-0,54	1,00	0,76	0,74	-0,37	-0,61	-0,77
НЬ	0,46	-0,41	0,76	1,00	0,92	-0,32	-0,57	-0,70
НТС	0,41	-0,37	0,74	0,92	1,00	-0,32	-0,54	-0,70
КСО	-0,41	0,42	-0,37	-0,32	-0,32	1,00	0,61	0,54
МДА	-0,55	0,54	-0,60	-0,57	-0,54	0,61	1,00	0,74
2,3-ДФГ	-0,68	0,60	-0,77	-0,70	-0,70	0,54	0,74	1,00

Примечание – все корреляции статистически значимы на уровне $p < 0,050$.

Как представлено в таблице 6.12 корреляции активности ГПО с этими ключевыми показателями жизнедеятельности эритроцита описаны значениями коэффициента ранговой корреляции Спирмена $\rho = 0,76$ для Hb и $\rho = 0,74$ для ГПО и НТС.

О том, что это сопровождается нарушением газотранспортной функции эритроцитов, свидетельствует выявленное резкое нарастание уровней 2,3-ДФГ в подгруппах с развитием анемии (рисунок 6.8), коррелирующих со снижением активности ГПО ($\rho = -0,77$).

Это объясняет отсутствие однородности дисперсий в генеральной совокупности данных при патологии, выявленное нами ранее не только для Hb и НТС, но и для 2,3-ДФГ (таблица 6.8). Также, эта гипотеза об особенностях патогенеза анемии, ассоциированной с опухолевым ростом, и роли в нём прооксидантных процессов подтверждается установленной выраженной корреляцией 2,3-ДФГ с уровнями МДА в выборках по различным локализациям рака на до анемического этапе (таблица 6.5). Которая усиливалась при развитии анемии (таблица 6.13) ($\rho = 0,74$). Также наличием достоверных отрицательных связей средней силы между уровнями МДА и Hb ($\rho = -0,57$); МДА и НТС ($\rho = -0,54$).

Также можно предположить, что развитие самой анемии связано с разрушением метгемоглобина, усилением внутрисосудистого гемолиза, следовательно напряженностью эритропоэза и его истощением в итоге.

Это предположение хорошо согласуется с выявленными корреляциями между исследуемыми показателями Hb и НТС, в частности практически линейным характером зависимости между их уровнями (рисунок 6.9). В свою очередь, что хорошо согласуется с высокими значениями показателя ранговой корреляции Спирмена, указывавшего на прямую чрезвычайной силы связь ($\rho = 0,92$).

Это в результате вело к возникновению связей одинаковой силы этих показателей жизнедеятельности эритроцитов с изменениями их уровней 2,3-ДФГ

(сильная отрицательная связь одинаковой силы уровней 2,3-ДФГ и Hb ρ Спирмена = -0,70; для 2,3-ДФГ и НТС ρ Спирмена = -0,70, соответственно).

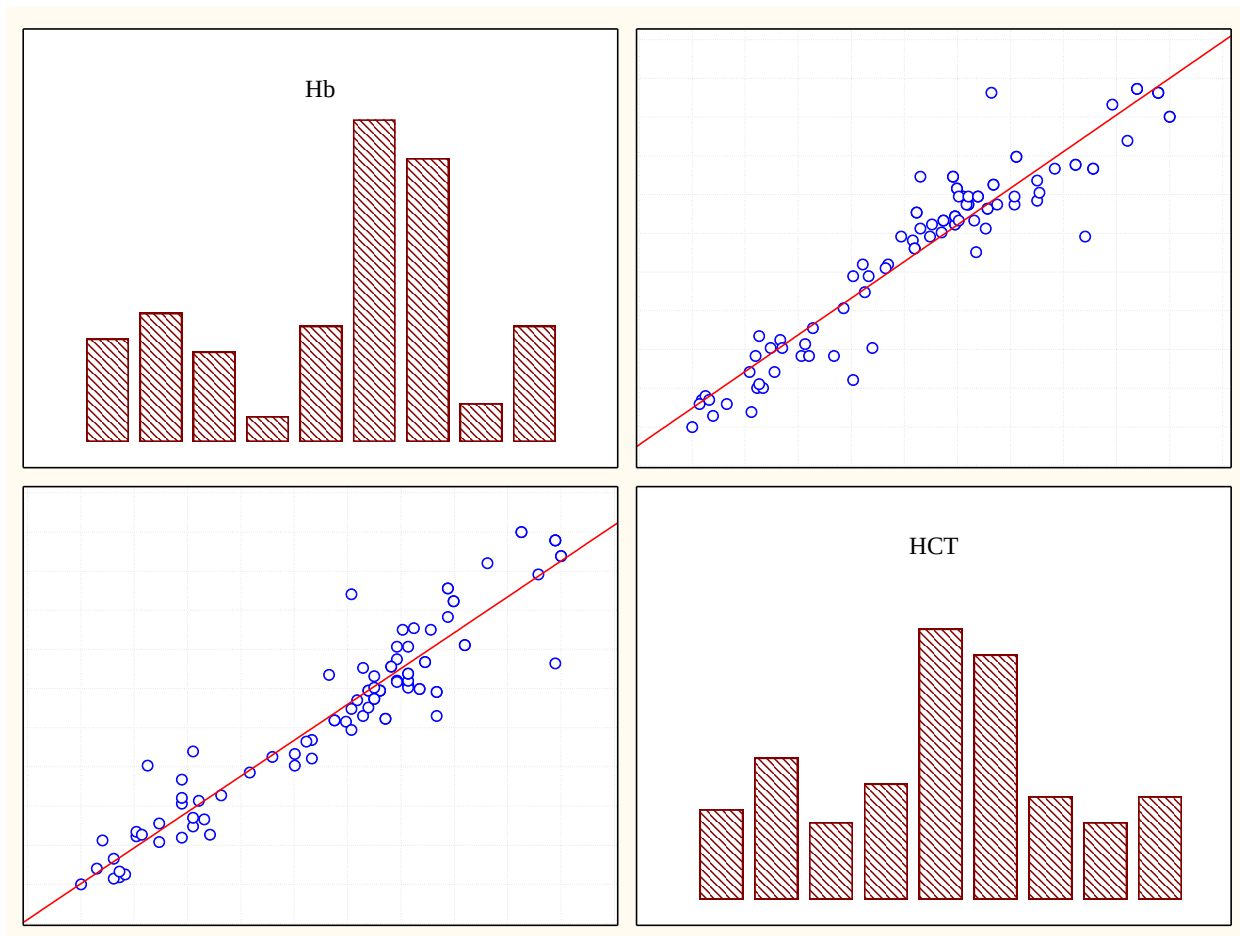


Рисунок 6.9 – Матрицы корреляций между значениями Hb и НТС эритроцитов при раке по результатам дискриминантного анализа

Описанные выше корреляции по результатам ранговой корреляции Спирмена подтверждался при дискриминантном анализе, согласно приведенным в таблице 6.14 данным по выявленным полным корреляциям между показателями.

Как и в предыдущем анализе, корреляции наибольшей силы, выявленные методом дискриминантного анализа. Характеризовали взаимосвязи между уровнями Hb и НТС ($r = 0,95$); ГПО и Hb ($r = 0,76$); ГПО и НТС ($r = 0,73$).

Также отметим сильную связь между уровнями МДА и 2,3-ДФГ ($r = 0,67$). Её же иллюстрирует рисунок 6.10.

Выявленные тенденции при ранговом анализе в отношении сильных отрицательных связей между биохимическими параметрами обмена эритроцитов

также подтверждались полными отрицательными корреляциями между ними при дискриминантном анализе: 2,3-ДФГ и Hb ($r = -0,74$); 2,3-ДФГ и НТС ($r = -0,70$); 2,3-ДФГ и ГПО ($r = -0,76$), а также 2,3-ДФГ и АДА ($r = -0,64$).

Таблица 6.13 – Объединенные внутригрупповые корреляции биохимических показателей эритроцитов при патологии согласно результатам дискриминантного анализа

Показатель	АДА	СОД	ГПО	Hb	НСТ	КСО	МДА	2,3-ДФГ
АДА	1,00	-0,63	0,63	0,44	0,39	-0,58	-0,56	-0,64
СОД	-0,63	1,00	-0,57	-0,43	-0,37	0,53	0,57	0,60
ГПО	0,63	-0,57	1,00	0,76	0,73	-0,48	-0,60	-0,76
Hb	0,44	-0,43	0,76	1,00	0,95	-0,37	-0,56	-0,74
НСТ	0,39	-0,37	0,73	0,95	1,00	-0,35	-0,50	-0,70
КСО	-0,58	0,53	-0,48	-0,37	-0,35	1,00	0,60	0,57
МДА	-0,56	0,57	-0,60	-0,56	-0,50	0,60	1,00	0,67
2,3-ДФГ	-0,64	0,60	-0,76	-0,74	-0,70	0,57	0,67	1,00

О возможной взаимосвязи процессов транспорта кислорода и функционального состояния гемоглобина также косвенно свидетельствует наличие связи между активностями АДА и ГПО ($r = 0,63$). Поскольку АДА снижает уровни аденозина, стимулирующего продукцию 2,3-ДФГ, то видится закономерным при повышении уровней последнего наблюдается при снижении активности АДА ($r = -0,64$).

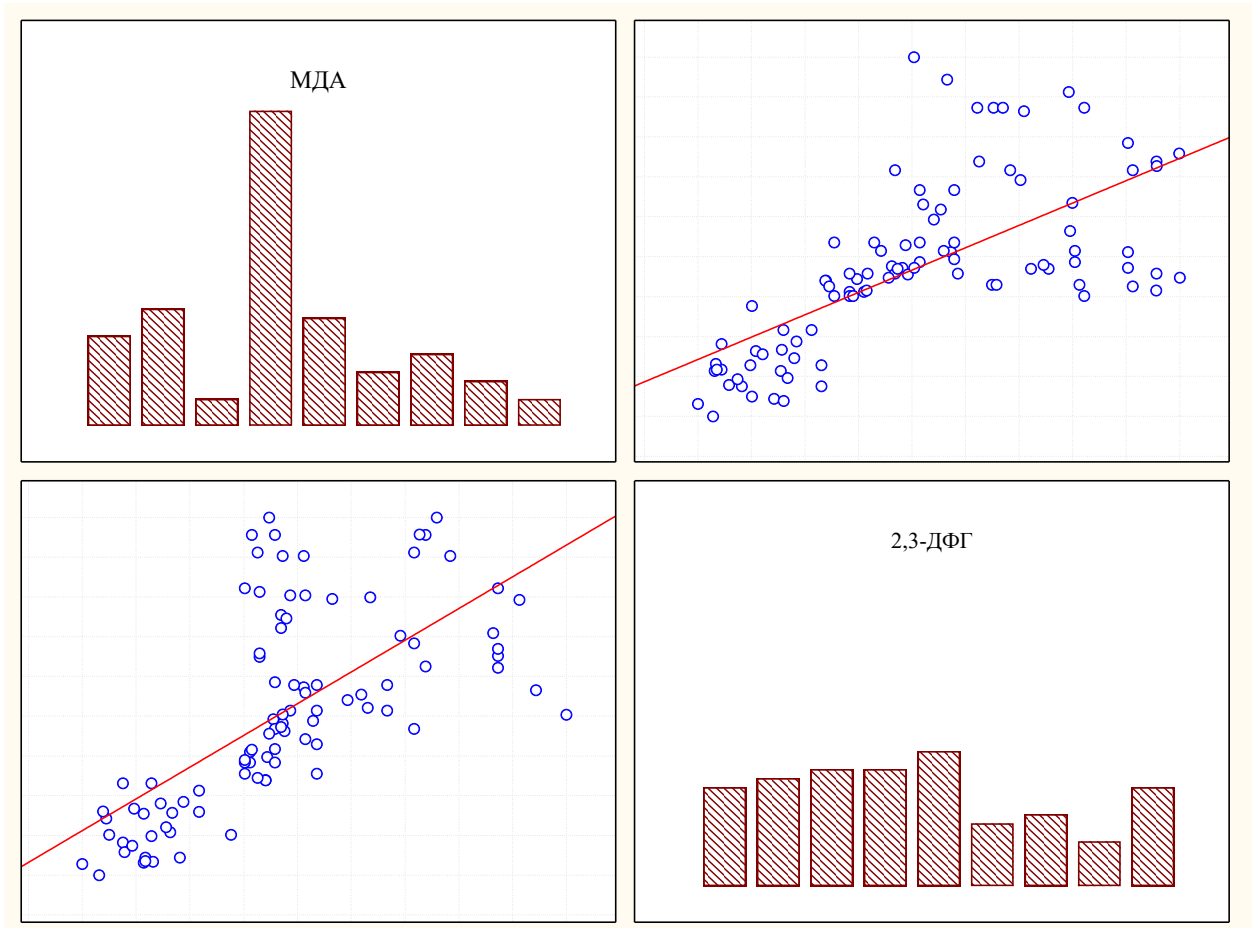


Рисунок 6.10 – Матрицы корреляций между значениями МДА и 2,3-ДФГ эритроцитов при раке по результатам дискриминантного анализа

По результатам дискриминантного анализа наиболее специфичными для выделенных кластеров эритроцитов для опухолей одной локализации оказались особенности активности АДА и КСО. (Для АДА лямбда Уилкса 0,019, толерантность 0,90, $p < 0,0001$. Для КСО соответственно, 0,025; 0,90, $p < 0,0001$). Отметим, что активность ГПО, как и СОД не всегда отличались между кластерами, поскольку изначально одна снижалась, а вторая росла в основных подгруппах, поэтому уровень значимости различий активности в кластерах для ГПО и СОД $p = 0,10$ $p = 0,11$ соответственно (согласно таблицам 6.9 и 6.14).

Помимо ферментативной активности показателями, определявшими свойства кластеров, были определены МДА, 2,3-ДФГ.

Таблица 6.14 – Результаты анализа дискриминантных функций биохимических показателей в кластерах в норме и при раке различных локализаций в зависимости от наличия анемии

Показатель	Уилкса лямбда	Частная лямбда	F- исключ 6,81	р- уровн и	Толер .	1- толер. R
АДА	0,019	0,679	6,38	0,000	0,898	0,102
<i>СОД</i>	<i>0,015</i>	<i>0,879</i>	<i>1,85</i>	<i>0,099</i>	<i>0,938</i>	<i>0,062</i>
<i>ГПО</i>	<i>0,015</i>	<i>0,882</i>	<i>1,81</i>	<i>0,106</i>	<i>0,888</i>	<i>0,112</i>
<i>НЬ</i>	0,017	0,781	3,77	0,002	0,324	0,676
<i>НСТ</i>	<i>0,014</i>	<i>0,969</i>	<i>0,43</i>	<i>0,854</i>	<i>0,319</i>	<i>0,681</i>
КСО	0,025	0,532	11,89	0,000	0,903	0,097
МДА	0,016	0,836	2,65	0,021	0,948	0,052
2,3-ДФГ	0,021	0,639	7,64	0,000	0,963	0,037

Примечание – курсивом отмечены показатели, не являющиеся специфическими для кластеров с анемией среди опухолей одной локализации.

Учитывая установленные корреляции в результате дискриминантного анализа, ранговой корреляции при исследовании особенностей показателей метаболизма эритроцитов при раке с сопутствующим развитием анемии, а также результаты ранговой корреляции показателей эритроцитов в зависимости от уровней циркуляции, провели канонический анализ с корнями показателей. В 24-мерном пространстве показателей метаболизма (по 8 показателей, исследовавшихся в контроле, в эритроцитах при раке на до анемическом этапе, в эритроцитах при раке с сопутствующим развитием анемии) установили, что выделенные группы эритроцитов больных при НМРЛ, РЖ, РК без развития анемии достоверно отличаются по показателям метаболизма от эритроцитов при

раке этих же локализаций, но осложненном развитием анемии (отличия статистически значимы по критерию χ -квадрат, $p < 0,001$).

В качестве иллюстрации закономерностей нарушений метаболизма эритроцитов при развитии анемии на рисунке 6.11 приведено распределение групп при патологии в 2-мерном пространстве двух показателей метаболизма.

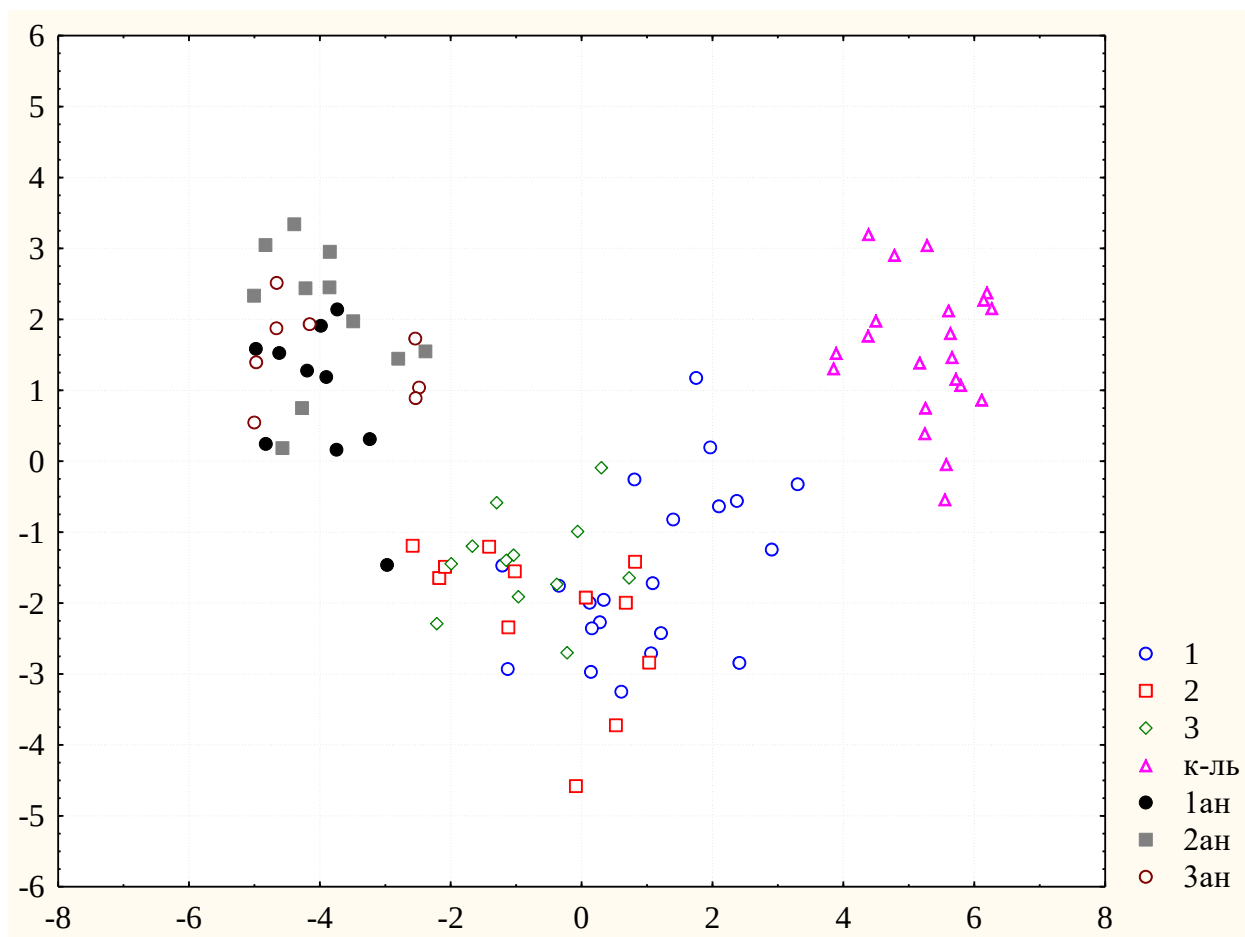


Рисунок 6.11 – Распределение эритроцитов при раке по группам патологии в 2-мерном пространстве значений АДА и ГПО по результатам канонического анализа

Примечания

- 1) 1 – НМРЛ без анемии, 1ан – НМРЛ при развитии анемии;
- 2) 2 – РЖ без анемии, 2ан – РЖ при развитии анемии;
- 3) 3 – РК без анемии, 3ан – РК при развитии анемии;
- 4) к-ль – контроль.

Согласно анализу, можно отметить, что при развитии анемии обменные процессы в эритроцитах отличаются не только от контроля, но и от метаболизма эритроцитов у онкологических больных, у которых не наблюдалось развития анемии.

Таким образом, наиболее чувствительными ферментативными тестами для прогнозирования дисфункции эритроцита можно считать АДА и ГПО, для которых определялись корреляционные связи с уровнями метаболитов, определяющих дисфункцию эритроцита и развитие анемии.

РАЗДЕЛ 7

ОСОБЕННОСТИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ МЕТАЛЛОВ ПЕРЕМЕННОЙ
ВАЛЕНТНОСТИ В КЛЕТКАХ КРОВИ И ТКАНЯХ КАРЦИНОМ

Наряду с исследованием в биоматериале биохимических и морфо-биологических показателей, также определялось содержание металлов переменной валентности. В таблице 7.1 содержатся данные по содержанию в исследуемых опухолях железа (Fe), меди (Cu), кобальта (Co), цинка (Zn). Достоверность различий устанавливали, используя непараметрический W-критерий Вилкоксона, специализированный для сравнения пары зависимых переменных (в каждой паре случаев – образец опухоли и смежной ткани края резекции, служивший индивидуальным контролем).

Таблица 7.1 – Содержание металлов переходной группы в тканях карцином желудка и кишечника (КЖК) (медиана, квартили; W-критерий Вилкоксона); мкг/г

Показатель	Контроль n = 12	Опухоль n = 12	W	p
Fe	46,00 (29,00; 56,00)	64,65 (51,00; 78,00)	2,86	0,004
Cu	18,10 (13,25; 38,35)	21,90 (15,30; 49,95)	2,20	0,028
Co	97,05 (35,05; 153,40)	29,15 (24,45; 114,60)	1,96	0,075
Zn	5,00 (2,31; 7,30)	3,45 (1,40; 4,50)	2,50	0,013

Так, в тканях карцином желудка и кишечника (КЖК) выявлены особенности перераспределения металлов этой группы по сравнению с нетрансформированными тканями.

Согласно результатам, карциномы желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) характеризовались более высоким содержанием железа по сравнению с нетрансформированными тканями ($p = 0,004$).

Исследуя особенности распределения металлов переменной валентности в биоматериале, проводили проверку распределения их показателей на нормальность, согласно его результатам для корректного сравнения использовали инструменты непараметрической статистики, что не исключало возможности в качестве иллюстративного метода использовать графические возможности однофакторного анализа ANOVA.

На рисунке 7.1 приведены данные однофакторного анализа ANOVA, иллюстрирующие особенности распределения железа в тканях аденокарцином желудка и колоректального рака, а также эритроцитах в зависимости от уровня их циркуляции в системе кровотока у одних и тех же пациентов при карциномах ЖКТ, указанных локализаций.

В эритроцитах уровни железа закономерно превышали его содержание в тканях в 2,7 – 5 раз (в зависимости от уровня циркуляции эритроцитов), о чем свидетельствует кривая однофакторного анализа ANOVA. Данный инструмент обеспечивает наглядное иллюстрирование реальных достоверных отличий, установленных нами методами обработки апостериорных значений – критериев Шеффе, Дункана, Дуннета.

В частности, согласно критерия Шеффе различия по содержанию данного металла в тканях и эритроцитах достоверны на уровне значимости $p < 0,001$; согласно критерия Дуннета для значений переменной Fe для апостериорных критериев при 2-хстороннем сравнении отличия между тканями и эритроцитами достоверны $p = 0,0001$.

Также достоверность различий подтверждалась при помощи критерия Краскела-Уоллиса: $p = 0,002$ и $p = 0,018$ для ЭV и ЭО и тканей.

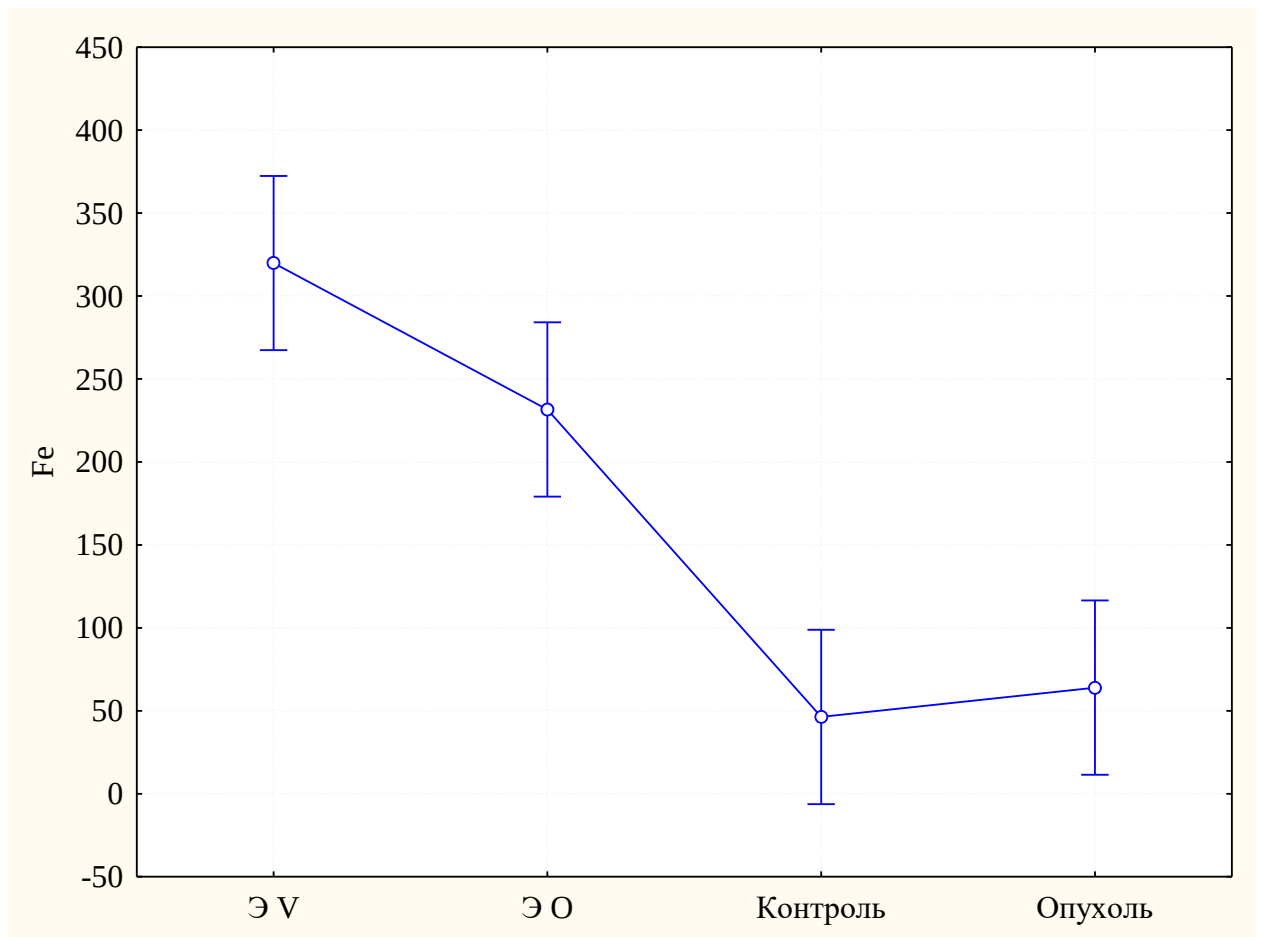


Рисунок 7.1 – Особенности содержания железа (Fe) в тканях и эритроцитах крови при карциномах ЖКТ; мкг/г

Примечания

1) контроль – нетрансформированные слизистые желудка (кишечника), опухоль – аденокарцинома соответствующей локализации, ЭV- эритроциты системного кровотока, ЭО - эритроциты регионарного кровотока;

2) вертикальные столбцы равны 0,95 доверительных интервала.

Безусловно, эти результаты были ожидаемыми, но они характеризуют использованный инструментальный метод спектрометрического анализа.... по определению содержания уровней металлов переменной валентности в различном биоматериале как чувствительный. Действительно, данные по особенностям содержания железа хорошо согласуются с особенностями биологии эритроцитов, для которых главным белком, определяющим их способность транспортировать

газы крови, является гемоглобин. Это хромопротеин, содержащий железо, чья концентрация в эритроците высока, как известно, оставляет в норме 110 – 160 г/л.

Далее, исследуя содержание в биоматериале трёх остальных металлов (Cu, Co, Zn), обнаружили, что и их распределение в тканях опухолей, нетрансформированных тканях краёв резекции (контроль), эритроцитах, тромбоцитах крови имело свои особенности.

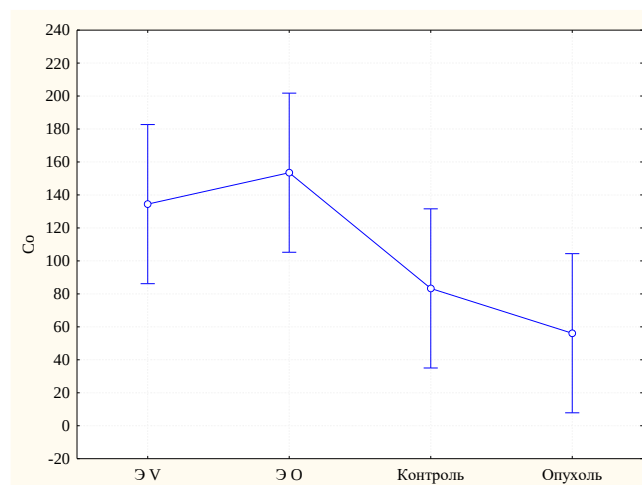
В частности, установили, что для кобальта характерно более высокое его содержание в эритроцитах по сравнению с тканями (рисунок 7.2. А) крови при карциномах ЖКТ; мкг/г. Согласно критерия Шеффе различия по содержанию данного металла в тканях и эритроцитах достоверны на уровне значимости $p < 0,050$. Согласно критерия Дуннета для значений переменной Co для апостериорных критериев при 2-хстороннем сравнении отличия между тканями и эритроцитами достоверны $p = 0,046$. Также достоверность различий подтверждалась при помощи рангового дисперсионного анализа Краскела-Уоллиса: $p = 0,0013$ и $p = 0,003$ для ЭV и ЭО и тканей карцином.

При этом, в тканях карцином отмечена тенденция к снижению уровней металла по сравнению с индивидуальным контролем, однако различия не достоверны (таблица 7.1). Возможно, это связано с небольшим объемом выборки и вариабельностью абсолютных значений среди различных образцов карцином.

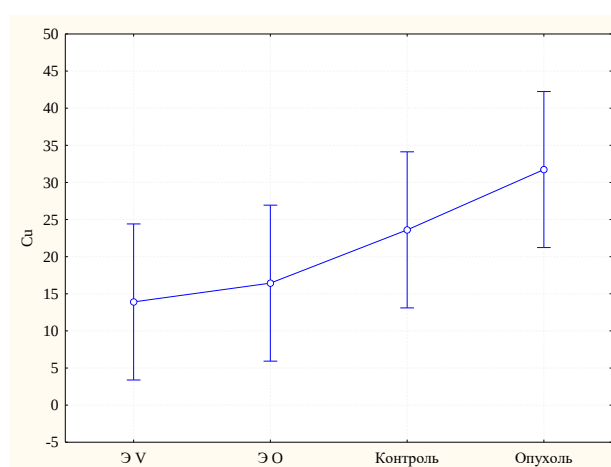
Выявлено повышение уровней меди в карциномах ЖКТ (таблица 7.1; критерий Вилкоксона $W = 2,20$; $p = 0,028$) по сравнению с нетрансформированными тканями края резекции органа (рисунок 7.2.Б).

При этом для цинка в тканях опухолей было характерно более низкое его содержание, чем в нетрансформированных тканях (таблица 7.1; критерий Вилкоксона $W = 2,50$; $p = 0,013$) по сравнению с нетрансформированными тканями края резекции органа (рисунок 7.2. В).

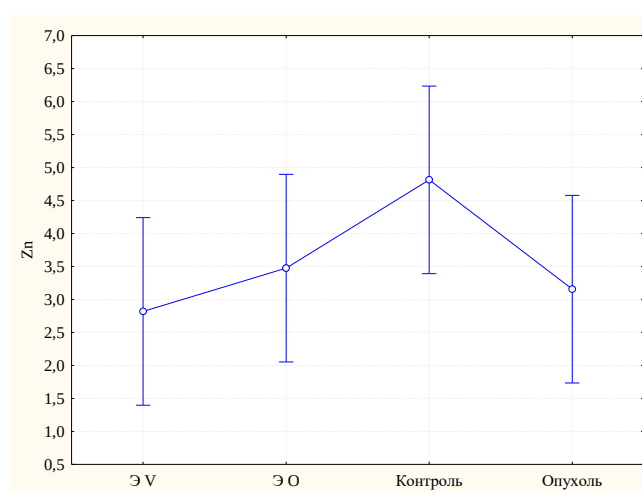
Уровни цинка в эритроцитах были сопоставимы по абсолютному значению с его содержанием в тканях и не отличались от них (рисунок 7.2.В). Так согласно критерия Шеффе различия по содержанию данного металла в тканях и эритроцитах недостоверны ($p > 0,050$); согласно критерия Дуннета $p = 0,97$.



А – Особенности содержания кобальта (Co)



Б – Особенности содержания меди (Cu)



В – Особенности содержания цинка (Zn)

Рисунок 7.2 (А, Б, В) –содержание металлов в тканях и эритроцитах крови при карциномах ЖКТ; мкг/г

Хотелось бы отметить, что несмотря на то, что в абсолютных значениях установленное повышение уровней Cu в тканях карцином было незначительным, на фоне повышения железа это могло способствовать нарастанию прооксидантных процессов за счёт неферментативных реакций Фентона и Мелори – Вейса, протекающих с участием этих металлов.

Соответственно, в аденокарциномах ЖКТ уровни железа составляли в среднем $63,12 \pm 22,00$ мкг/г, а меди $31,73 \pm 23,69$ мкг/г. В то время как в контроле их уровни при этом были соответственно $49,91 \pm 18,93$ мкг/г и $23,61 \pm 17,26$ мкг/г. В результате соотношение металлов сохранялось в карциномах как 2 : 1, но при этом содержание железа было в 1,5 раза выше, чем в нетрансформированных тканях.

Также неблагоприятным при этом выглядит установленное для цинка в тканях опухолей более низкое его содержание, чем в нетрансформированных тканях ($4,5 \pm 1,12$ мкг/г в контроле и $3,0 \pm 0,88$ мкг/г в карциномах).

Это косвенно могло свидетельствовать о снижении уровней белков - антиоксидантов, содержащих цинк, что согласуется с отсутствием достоверного повышения активности СОД (Раздел 4) в карциномах. Это способствовало дисбалансу про- и антиоксидантных процессов.

Таким образом, установлены изменения в уровнях металлов переменной валентности, способствующие протеканию металлкатализируемых реакций неферментативного окисления в ходе которых пероксид водорода мог быть преобразован в гидроксил анион-радикал.

Далее сопоставили между собой уровни металлов в самих эритроцитах в зависимости от их уровня циркуляции в системном кровотоке (таблица 7.2).

Согласно **W**-критерию Вилкоксона для содержания железа установлены особенности, связанные с уровнем нахождения эритроцита в регионарном кровотоке или в системе центрального кровообращения.

В частности, установлено достоверное снижение уровней железа в эритроцитах регионарного кровотока, в так называемой «оттекающей от опухоли крови» (таблица 7.2).

Таблица 7.2 – Содержание металлов переходной группы в эритроцитах у пациентов с карциномами желудка и кишечника (КЖК) в зависимости от уровня их циркуляции в системе кровотока (медиана, квартили; W-критерий Вилкоксона); мкг/г

Показатель	Э V n = 12	Э О n = 12	W	p
Fe	284,54 (229,04; 432,45)	176,50 (119,25; 310,80)	2,59	0,010
Cu	10,60 (7,70; 19,35)	13,90 (4,30; 26,95)	1,33	0,18
Co	137,00 (59,50; 161,00)	129,50 (56,50; 256,00)	0,55	0,58
Zn	2,20 (0,55; 4,00)	3,10 (1,95; 5,15)	1,07	0,29

Примечание – Э V- эритроциты системного кровотока; Э О - эритроциты регионарного кровотока.

При этом можно отметить, что в среднем в них уровни Fe составляли $231,62 \pm 110,42$ мкг/г, в то время как у этих же пациентов в эритроцитах системного кровотока наблюдались более высокие уровни железа $320,00 \pm 98,13$ мкг/г.

Итоги анализа дискриминантных функций также указали на то, что для железа в тканях имелись достоверные различия по сравнению с эритроцитами (Лямбда Уилкса: 0,69, критерий исключений $F = 21,62$, $p < 0,001$).

Далее сопоставим особенности распределения исследовавшихся металлов в различных клетках крови (эритроциты и тромбоциты) с учетом их нахождения в системном кровотоке (центральное кровообращение или регионарный кровоток).

Установили, что в тромбоцитах крови содержание металлов переменной валентности не зависело от уровня их циркуляции (таблица 7.3).

Таблица 7.3 – Содержание металлов переходной группы в тромбоцитах у пациентов с карциномами желудка и кишечника (КЖК) в зависимости от уровня их циркуляции в системе кровотока (медиана, квартили; W-критерий Вилкоксона)

Показатель	T V n = 12	T O n = 12	W	p
Fe	47,85 (22,25; 89,20)	81,90 (29,30; 102,35)	1,51	0,131
Cu	12,20 (6,80; 17,50)	14,25 (7,62; 22,65)	1,33	0,182
Co	80,50 (30,00; 200,50)	119,00 (35,50; 216,90)	0,65	0,515
Zn	2,86 (2,00; 5,50)	6,00 (0,60; 11,90)	1,96	0,051

Примечание – TV– тромбоциты системного кровотока; TO – тромбоциты регионарного кровотока.

Можно отметить, что содержание железа, цинка и кобальта в тромбоцитах широко варьировало. При этом, при сопоставлении с помощью непараметрического W-критерия Вилкоксона (тест специфичен для сравнения пары связанных показателей) значений показателей содержания металлов в тромбоцитах системного и регионарного кровотока, достоверных отличий между ними не выявлено.

При исследовании особенностей в содержании металлов для тромбоцитов крови по сравнению с эритроцитами провели ранговый дисперсионный Краскела-

Уоллиса и дискриминантный виды анализов (таблицы 7.4 - 7.6) и ряд дополнительных процедур статистического анализа, в частности для визуализации установленных особенностей использовали графические инструменты однофакторного дисперсионного анализа ANOVA.

Выраженные различия между клетками крови по содержанию металлов выявлены лишь для железа (таблица 7.4).

Таблица 7.4 – Результаты рангового дисперсионного анализа, сравнение показателя различия рангов (R) – критерия Краскела-Уоллиса (z) для переменных значений содержания железа в тканях и в клетках крови; мкг/г

Материал	Контроль R	Опухоль R	Э V R 39,2	Э О R 32.8	Т V R 11,4	Т О R 14,7
Контроль		<i>1,47</i>	4,63 $p < 0,001$	3,63 $p = 0,002$	<i>0,62</i>	<i>1,85</i>
Опухоль	<i>1,47</i>		3,92 $p = 0,001$	2,96 $p = 0,018$	<i>0,85</i>	<i>0,39</i>
Э V	4,63 $p < 0,001$	3,63 $p = 0,002$		<i>1,12</i>	4,86 $p < 0,001$	4,29 $p < 0,001$
Э О	3,92 $p = 0,001$	2,96 $p = 0,018$	<i>1,12</i>		3,75 $p = 0,001$	3,17 $p = 0,009$

Примечание – недостоверные значения отмечены курсивом, для достоверных различий указано двустороннее значение p .

Согласно анализа в эритроцитах уровни железа были выше как по сравнению с тканями, так и по сравнению с тромбоцитами (таблица 7.4; рисунки 7.2 и 7.3). В частности, согласно критерия Шеффе его уровни в эритроцитах были достоверно выше, чем в тромбоцитах (таблица 7.5).

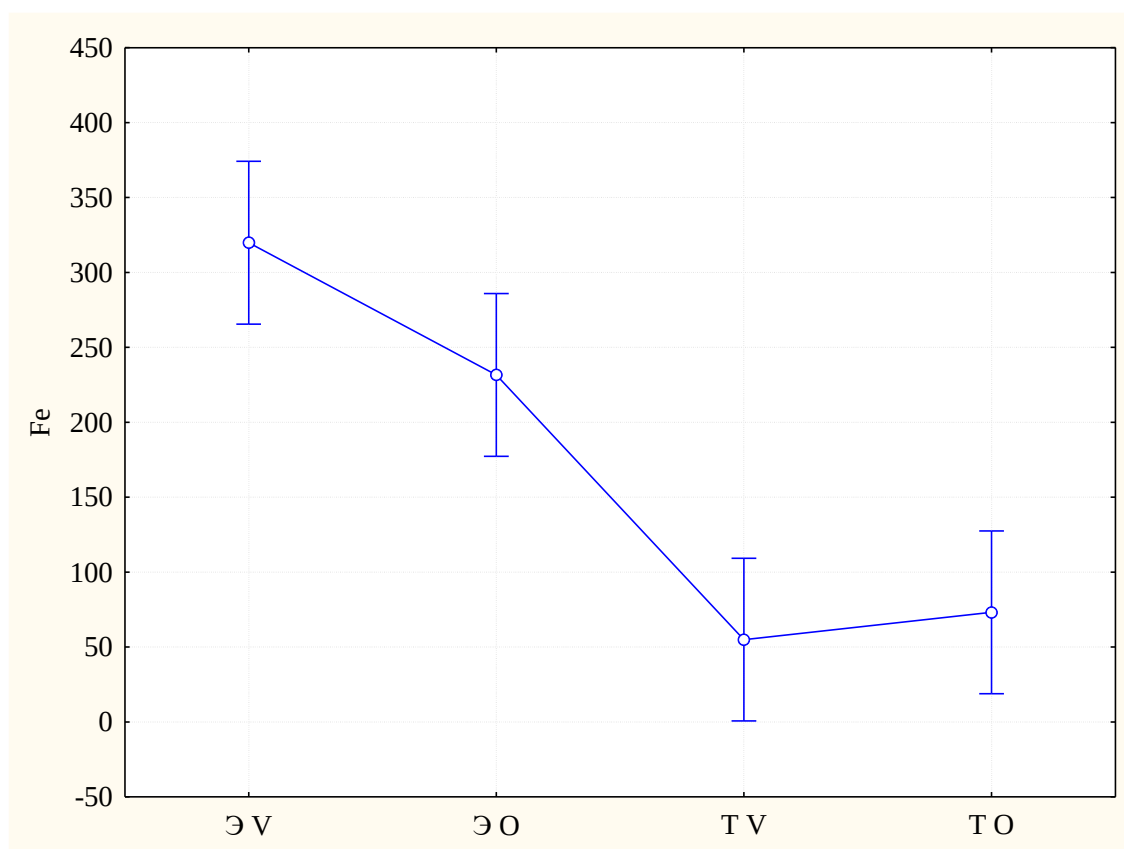


Рисунок 7.3 – Особенности содержания железа (Fe) в клетках крови при карциномах ЖКТ; мкг/г

Примечание

- 1) ЭV – эритроциты системного кровотока,
 ЭО – эритроциты регионарного кровотока,
 TV и TO – соответственно, тромбоциты этих уровней циркуляции;
- 2) вертикальные столбцы равны 0,95 доверительных интервала.

Таблица 7.5 – Значения критерия Шеффе для апостериорных показателей содержания металлов в клетках крови в зависимости от их уровней циркуляции

Переменная железо (Fe) Ошибка: Межгр. MS = 8714,8				
Материал	Э V	Э О	Т V	Т О
Э V		0,163	< 0,001	< 0,001
Э О	0,163		0,001	0,002
Т V	< 0,001	0,001		0,973
Т О	< 0,001	0,002	0,973	
Переменная медь (Cu) Ошибка: Межгр. MS = 175,43				
	Э V	Э О	Т V	Т О
Э V		0,974	0,997	0,906
Э О	0,974		0,996	0,994
Т V	0,997	0,996		0,966
Т О	0,906	0,994	0,966	
Переменная кобальт (Co) Ошибка: Межгр. MS = 9889,8				
	Э V	Э О	Т V	Т О
Э V		0,974	0,955	0,999
Э О	0,974		0,782	0,946
Т V	0,955	0,782		0,979
Т О	0,999	0,946	0,979	
Переменная цинк (Zn) Ошибка: Межгр. MS = 13,42				
	Э V	Э О	Т V	Т О
Э V		0,979	0,934	0,125
Э О	0,979		0,997	0,266
Т V	0,934	0,997		0,364
Т О	0,125	0,266	0,364	

Продолжение таблицы 7.5

Примечания

- 1) ЭV – эритроциты системного кровотока;
 ЭО – эритроциты регионарного кровотока;
 Т V – тромбоциты системного кровотока;
 ТО – тромбоциты регионарного кровотока;
- 2) *курсивом* отмечены недостоверные отличия значений показателей в группах сравнения.

Это, безусловно, хорошо согласуется с особенностями белкового состава эритроцитов, содержанием в них гемоглобина.

Согласно критерия Дуннетта, для значений переменной Fe для апостериорных критериев при 2-хстороннем сравнении отличия достоверны по сравнению с тромбоцитами. Например, для эритроцитов периферической крови (ЭV) по сравнению с тромбоцитами этого же уровня циркуляции $p < 0,001$, для тромбоцитов и эритроцитов регионарного кровотока (оттекающей крови) $p = 0,001$.

Также проведен анализ показателей содержания других металлов в клетках крови.

Согласно анализу (по результатам применения теста Шеффе (критерия достоверности различий для апостериорных значений изучаемых показателей)) не выявили различий между содержанием меди в клетках крови (таблица 7.5; рисунок 7.4).

Это также подтверждалось результатами рангового дисперсионного анализа Краскела-Уоллиса, не выявившего различий в их содержании в эритроцитах крови по сравнению с тромбоцитами.

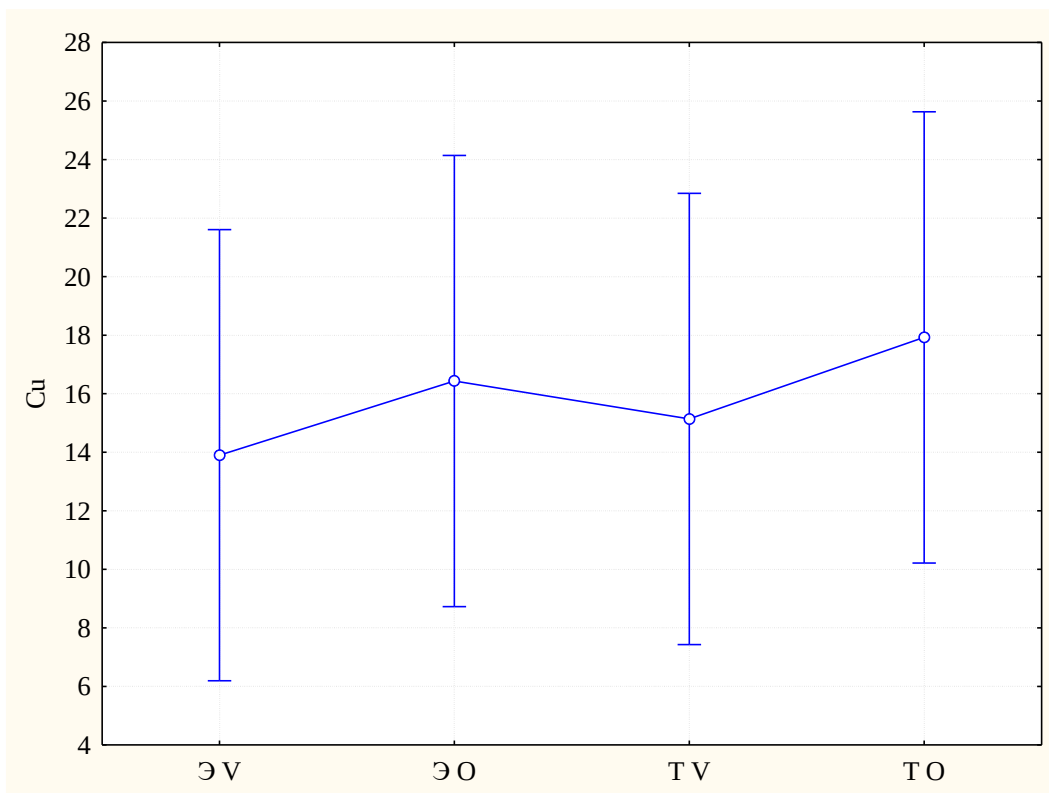


Рисунок 7.4 – Особенности содержания меди (Cu) в клетках крови при карциномах ЖКТ; мкг/г

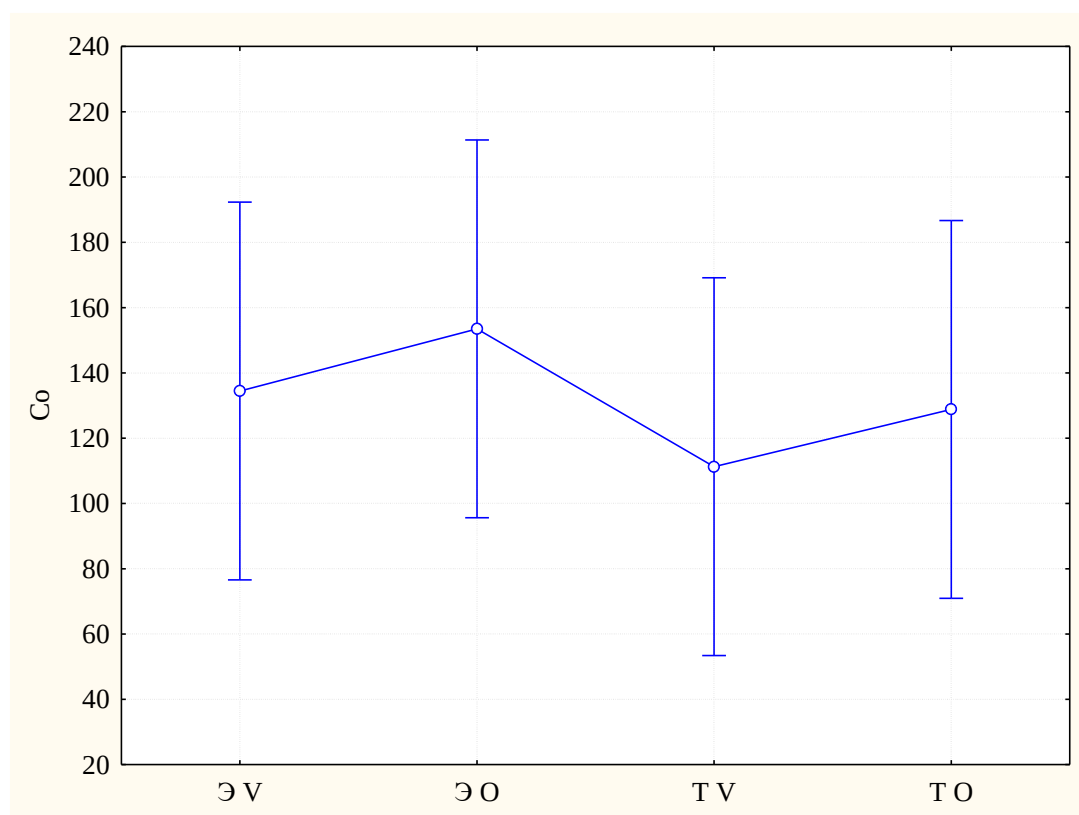


Рисунок 7.5 – Особенности содержания кобальта (Co) в тканях и эритроцитах крови при карциномах ЖКТ; мкг/г

Для кобальта также как и для меди не установлено различий в его содержании в эритроцитах и тромбоцитах (таблица 7.5; рисунок 7.5).

Это также подтверждалось результатами рангового дисперсионного анализа Краскела-Уоллиса.

Также, согласно этим методам статистической обработки результатов, можно отметить выраженную тенденцию по повышению уровней цинка в тромбоцитах отекающей крови по сравнению с эритроцитами, циркулирующими как в регионарном, так и в системном кровотоке (рисунок 7.6).

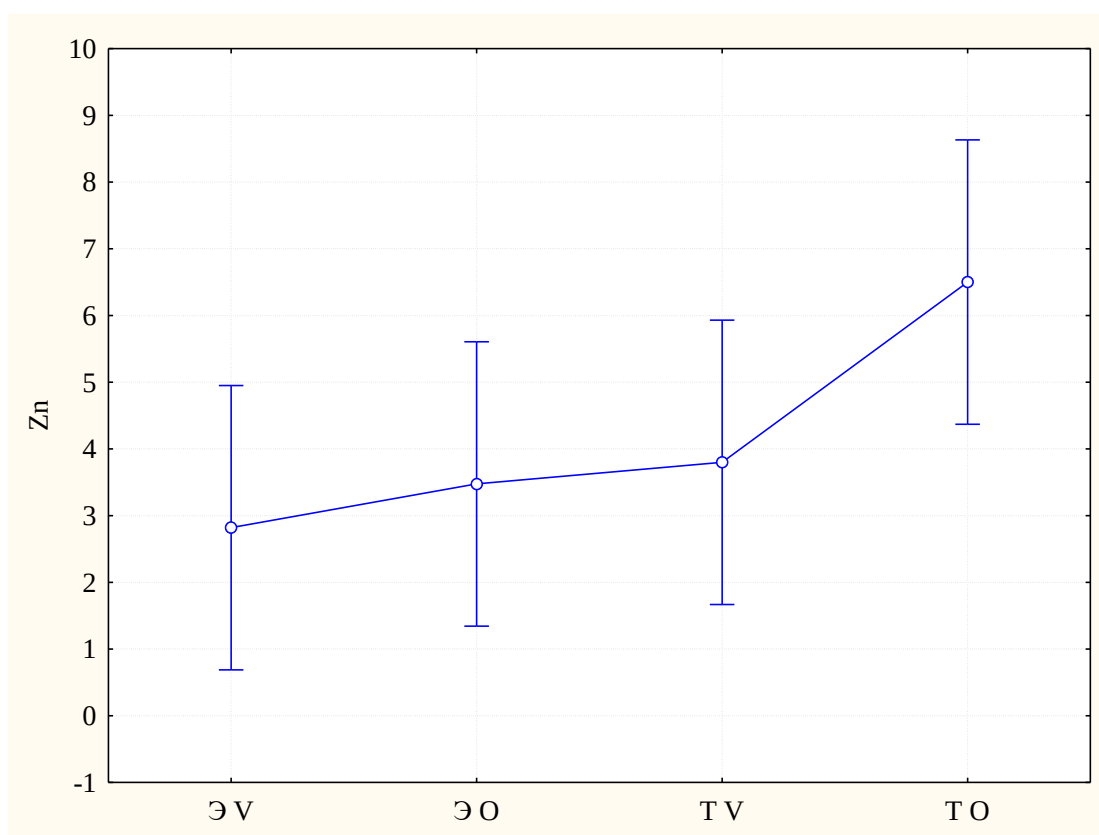


Рисунок 7.6 – Особенности содержания цинка (Zn) в тканях и эритроцитах крови при карциномах ЖКТ; мкг/г

Эта тенденция по более низкому содержанию цинка в эритроцитах не подтверждалась критерием Шеффе, не установившим достоверности различий в

содержании цинка для эритроцитов системного кровотока и тромбоцитов регионарного кровотока (таблица 7.5).

Однако критерии размахов Дункана (для приближенных вероятностей апостериорных значений переменных) и Дуннета (теста определения вероятности различий) были достоверны на уровне значимости $p = 0,028$ и $p = 0,047$, соответственно.

Итак, на данном этапе не удалось выявить особенности в содержании меди, кобальта в клетках крови, а для цинка выявили лишь слабые тенденции. Лишь по содержанию железа для эритроцитов и тромбоцитов крови установлены выраженные отличия (Таблицы 7.4; 7.5).

Согласно выявленному ранее снижению уровней железа в эритроцитах регионарного кровотока по сравнению с клетками, находящимися в системном кровотоке (Таблица 7.2), отсутствие по сравнению с тромбоцитами тенденции к повышению цинка у «оттекающих от опухоли» эритроцитов, также может быть связано с усилением дисметаболических процессов и свободно-радикального окисления в эритроцитах регионарного кровотока.

Для уточнения полученных предварительных данных прибегли к процедурам дискриминантного анализа. Результаты анализа дискриминантных функций указывали на 2 значимые переменные в модели их функций, чьи значения зависят от вида материала – это железо и цинк (таблица 7.6).

Таблица 7.6 – Итоги анализа дискриминантных функций для показателей содержания металлов в клетках крови онкологических больных; мкг/г

Показатель	Лямбда Уилкса	Лямбда Частная	F	p
Fe	0,81	0,36	23,52	< 0,001
Cu	0,31	0,96	0,58	0,630
Co	0,32	0,93	1,00	0,400
Zn	0,36	0,81	3,06	0,039

Примечание – курсивом отмечены показатели содержания металлов, для которых достоверные отличия отсутствовали.

Также исследовали наличие корреляций между изучаемыми показателями (Таблица 7.7).

Таблица 7.7 – Объединенные внутригрупповые корреляции между показателями содержания металлов в клетках крови при патологии согласно результатам дискриминантного анализа

Металл	Fe	Cu	Co	Zn
Fe	1,00	0,22	0,17	0,31
Cu	0,22	1,00	-0,06	0,26
Co	0,17	-0,06	1,00	0,28
Zn	0,31	0,26	0,28	1,00

Примечание – число переменных в модели: 4 (Fe, Cu, Co, Zn); Лямбда Уилкса: 0,23 приближение $F(12,84) = 5,34$; $p < 0,001$

Отметим, что слабая прямая связь характерна для железа и цинка, следовательно, в клетках с большим содержанием железа должно быть и выше содержание цинка, данная тенденция утрачена у эритроцитов регионарного кровотока по сравнению с тромбоцитами. Возможно, это также было обусловлено нарастанием в них дисметаболических процессов, описанных в Разделе 6.

Учитывая установленные в результате дискриминантного анализа особенности в содержании металлов переменной валентности провели канонический анализ с корнями показателей.

В 16-мерном пространстве показателей метаболизма (по 4 показателя (Fe, Cu, Co, Zn), исследовавшихся в эритроцитах и тромбоцитах в зависимости от уровней

их циркуляции в кровотоке (всего 4 вида материала), у онкологических больных установили, что выделенные группы эритроцитов и тромбоцитов больных при КЖК в зависимости от уровня их циркуляции в системе кровотока отличаются по содержанию металлов (отличия статистически значимы по критерию χ -квадрат, $p < 0,001$).

В качестве иллюстрации закономерностей распределения металлов в зависимости от вида клетки крови и её нахождения в системе кровотока. Так, на рисунке 7.7 приведено распределение групп материала в 2-мерном пространстве двух металлов (железа и цинка).

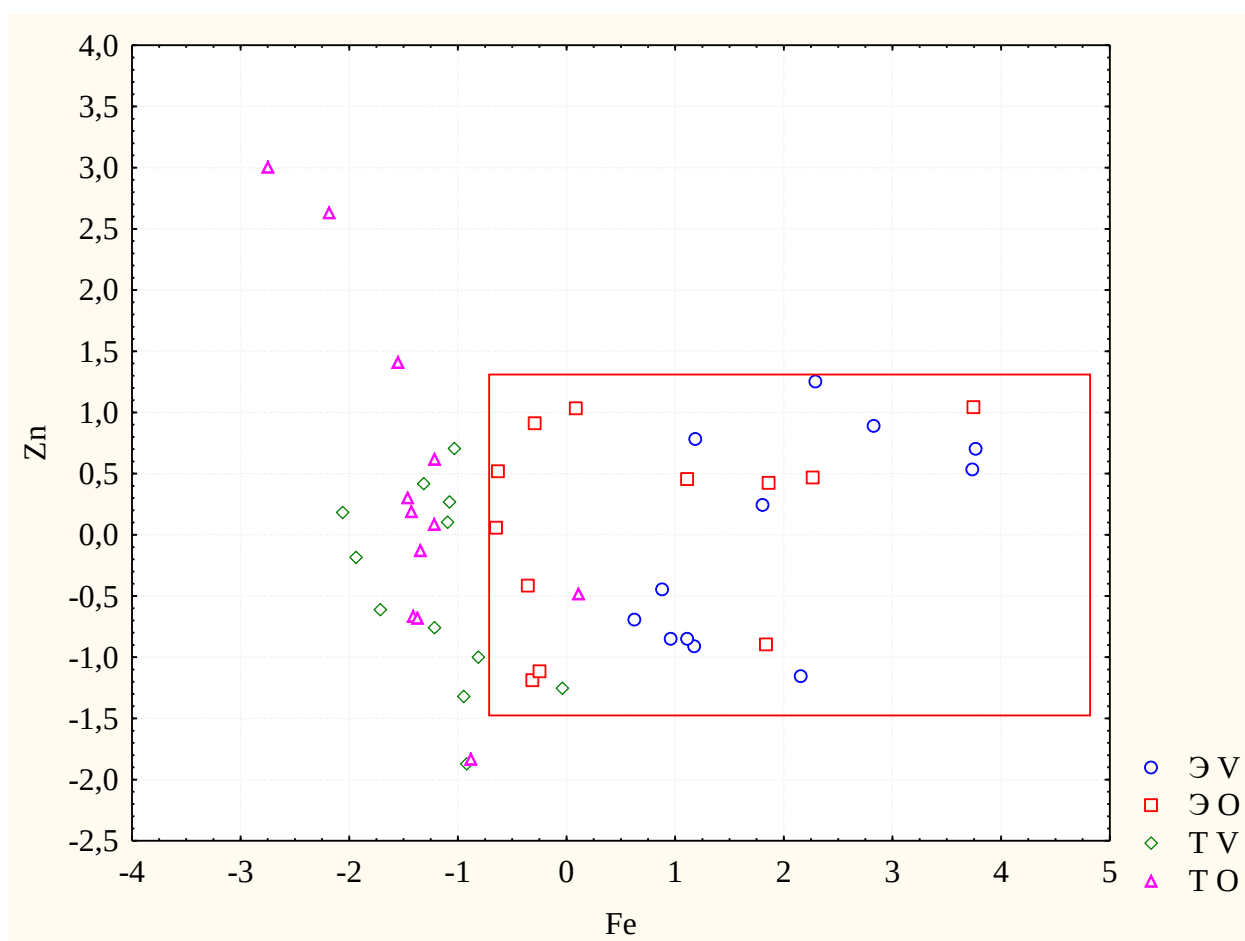


Рисунок 7.7 - Распределение эритроцитов и тромбоцитов при раке по группам в 2-мерном пространстве значений железа и цинка по результатам канонического анализа. Диаграмма рассеяния для канонических значений

Примечание – Э V– эритроциты системного кровотока; ЭО – эритроциты регионарного кровотока; TV – тромбоциты системного кровотока; ТО – тромбоциты регионарного кровотока

Согласно каноническому анализу показатели уровней железа и цинка связаны с определенным видом клеток крови. Как показано на рисунке 7.7, относительно оси X эритроциты рассеяны в правой зоне положительных значений оси (обведены рамкой). Тромбоциты распределились в 2-мерном пространстве левее.

Далее исследовали различия в уровнях металлов между тканями и тромбоцитами крови. При этом достоверности различий в содержании металлов переменной валентности для тканей и тромбоцитов не выявлено (проводились те же процедуры анализа: однофакторный с использованием апостериорных критериев сравнения Шеффе, Дункана, Дуннета, ранговый дисперсионный анализ Краскела-Уоллиса).

Проведенный дисперсионный анализ однородности значений показателей в выборках по уровням металлов в тканях и тромбоцитах подтвердил их однородность и отсутствие статистически значимых различий в этом материале (Таблица 7.8).

Таблица 7.8 – Определение однородности дисперсий показателей содержания металлов переменной валентности в тканях и тромбоцитах крови при карциномах ЖКТ согласно критерия Левена (F)

Показатель	MS	MS	F	p
Fe	1281,15	210,01	6,10	0,001
Cu	395,71	77,94	5,08	0,004
Co	5096,19	1002,82	5,08	0,004
Zn	21,09	4,31	4,90	0,005

Таким образом, не установлено различий в содержании исследуемых металлов между тканями и тромбоцитами крови.

Однако при этом надо отметить значительный разброс данных по содержанию цинка в тромбоцитах отекающей крови, а также небольшой объем выборки. Этим можно объяснить недостоверный характер сопоставленных отличий, хотя по абсолютным величинам (таблицы 7.1 и 7.3) представляется возможным повышение уровней цинка в тромбоцитах отекающей крови.

Также был проведен поиск наличия корреляций между значениями показателей содержания металлов в выборках с различным видом материала (ткани, эритроциты, тромбоциты) путем определения ранговых корреляций Спирмена (Таблица 7.9).

В отношении внутригрупповых связей следует отметить следующее:

- достоверные корреляции для железа малочисленные, описывают следующие взаимосвязи: в эритроцитах отекающей крови (Fe ЭО) они коррелируют со своими уровнями в системном кровотоке (прямая положительная сильная связь); также установлена отрицательная обратная связь средней силы для Fe ЭО и уровней железа в опухоли

- достоверные корреляции для железа малочисленные, описывают следующие взаимосвязи: в эритроцитах отекающей крови (Fe ЭО) они коррелируют со своими уровнями в системном кровотоке (прямая положительная сильная связь); также установлена отрицательная обратная связь средней силы для Fe ЭО и уровней железа в опухоли

- наиболее многочисленные корреляции характеризуют особенности содержания меди в биоматериале: уровни Cu О коррелировали не только с таковыми в контроле, но и в клетках крови всех уровней циркуляции; для клеток крови характерны как взаимные корреляции, так и с уровнями Cu в тканях, характер связей – прямые, положительные;

- прямая положительная сильная связь характерна для уровней кобальта в тромбоцитах центрального и регионарного кровотока, также между тканями контроля и в карциномах;

- содержание цинка в карциномах зависело от его уровней в контроле (прямая сильная связь, показатель ранговой корреляции Спирмена $\rho = 0,835$), также для уровней металла в эритроцитах регионарного кровотока и эритроцитах системного кровотока.

Таблица 7.9 – Ранговые корреляции Спирмена для показателей содержания металлов переменной валентности, регистрировавшихся у пациентов с карциномами желудка или кишечника в эритроцитах и тромбоцитах периферического и регионарного уровней циркуляции, в тканях карцином

Внутригрупповые связи для отдельных металлов						
	Fe k	Fe O	Fe ЭV	Fe ЭО	Fe TV	Fe ТО
Fe ЭО		-0,469	0,776			
	Cu k	Cu O	Cu TV	Cu ТО	Cu ЭV	Cu ЭО
Cu O	0,741		0,650	0,811	0,727	0,722
Cu ЭО	0,694	0,722	0,680		0,886	
Cu ТО	0,608	0,811	0,650		0,769	
	Co k	Co O	Co TV	Co ТО	Co ЭV	Co ЭО
Co O	0,788					
Co ТО			0,733			
	Zn k	Zn O	Zn TV	Zn ТО	Zn ЭV	Zn ЭО
Zn O	0,835					
Zn ЭО					0,692	

Примечания

- 1) в таблице указаны лишь статистически значимые связи на уровне $p < 0,05$;
- 2) индекс у символа металла обозначает: k – контроль, нетрансформированная ткань края резекции органа, O – опухоль, ЭV и ЭО –

эритроциты, а TV и TO – соответственно, тромбоциты центрального и регионарного уровней кровотока.

Не смотря на наличие внутригрупповых взаимосвязей для каждого отдельно взятого металла с видом биоматериала, для особенностей их содержания в одном виде материала межгрупповых корреляций не выявлено, поэтому эти расчетные данные не приводятся.

Также хотелось бы отметить, что наличие отрицательной обратной связи между уровнями железа в опухоли и в эритроцитах оттекающей крови, отсутствие при этом корреляций между тканями и тромбоцитами, указывают на вероятность оттока этого металла из эритроцитов в ткани.

Попытаемся определить вероятность данного предположения путём расчета уравнения материального балланса.

Для этого попытаемся рассчитать массу железа в опухолевой ткани и сопоставить с потерями железа эритроцитов в системе регионарного кровотока.

Распишем уравнение материального балланса:

Пусть Δm_{Fe} – масса железа, поглощаемая опухолью за единицу времени, характеризующая скорость поглощения железа.

T – время существования опухоли,

а массу железа в опухоли обозначим m_o^{Fe} – масса железа в опухоли.

Тогда $m_o^{Fe} = \Delta m_{Fe} \times T$, но при этом также $m_o^{Fe} = M_o \times C_o^{Fe}$,

где M_o – масса опухоли, а C_o^{Fe} – содержание железа в мкг/г опухоли, т.е. согласно полученным данным 64,65 мкг/г.

Пусть за некоторое время t через регионарный кровоток проходит m массовых единиц эритроцитов, приносящих в опухоль в этой массе эритроцитов определенную массу железа ($m \times C_{эв}^{Fe}$ мкг железа). На момент их оттока от органа, согласно результатам, $m \times C_{эо}^{Fe}$ мкг железа.

Если $C_{эв}^{Fe}$ и $C_{эо}^{Fe}$ – содержание железа в эритроцитах системного и регионарного кровотока, то значит, что за время t из крови в опухоль теоретически может выделяться $m \times (C_{эв}^{Fe} - C_{эо}^{Fe})$ мкг железа.

Тогда скорость поглощения железа опухолью за это время:

$$\Delta m_{Fe} = m \times (C_{эв}^{Fe} - C_{эо}^{Fe}) / t.$$

Если за время t через опухоль проходит V объёмных единиц крови (литров), то $V = \{Q_o \times t\}$, где Q_o - объёмная скорость потока крови через опухоль.

В таком объёме V содержится эритроцитов по массе $= V \times \text{НСТ} \times Pэ$, где НСТ – гематокрит, $Pэ$ – плотность эритроцитов.

Если $m = [V \times \text{НСТ} \times Pэ]$, тогда выразим Δm_{Fe} :

$$\begin{aligned} \text{т. е. } \Delta m_{Fe} &= m \times (C_{эв}^{Fe} - C_{эо}^{Fe}) / t = [V \times \text{НСТ} \times Pэ] \times (C_{эв}^{Fe} - C_{эо}^{Fe}) / t = \\ &= [\{Q_o \times t\} \times \text{НСТ} \times Pэ] \times (C_{эв}^{Fe} - C_{эо}^{Fe}) / t = Q_o \times \text{НСТ} \times Pэ \times (C_{эв}^{Fe} - C_{эо}^{Fe}) \end{aligned}$$

Поскольку масса железа в опухоли $m_o^{Fe} = \Delta m_{Fe} \times T$, тогда подставив значения множителей, получим:

$$m_o^{Fe} = \Delta m_{Fe} \times T = Q_o \times \text{НСТ} \times Pэ \times (C_{эв}^{Fe} - C_{эо}^{Fe}) \times T.$$

Поскольку также имеем, что $m_o^{Fe} = M_o \times C_o^{Fe}$, то должно быть

$$M_o \times C_o^{Fe} = Q_o \times \text{НСТ} \times Pэ \times (C_{эв}^{Fe} - C_{эо}^{Fe}) \times T$$

Это и есть уравнение материального баланса.

Оценим левую и правую части уравнения.

Условно примем M_o – масса опухоли = 10 г, имея $C_o^{Fe} = 64,65$ мкг/г, получим:
 $M_o \times C_o^{Fe} = 10 \text{ г} \times 64,65 \text{ мкг/г} = 646,5 \text{ мкг железа.}$

Для расчёта левой части уравнения примем для показателей следующие значения: $Q_o = 10$ мл/час = 0,01 л/ч; НСТ = 0,45; $Pэ = 1,09$ кг/л = 1090 г/л; пусть $T = 1$ час.

Согласно результатам $C_{эв}^{Fe} = 284,54$ мкг/г; $C_{эо}^{Fe} = 176,50$ мкг/г.

$$\begin{aligned} \text{Тогда, } m_o^{Fe} &= Q_o \times \text{НСТ} \times Pэ \times (C_{эв}^{Fe} - C_{эо}^{Fe}) \times T = \\ &= 0,01 \text{ л/ч} \times 0,45 \times 1090 \text{ г/л} \times (284,54 - 176,50) \times 1 \text{ ч} = 529,9 \text{ мкг.} \end{aligned}$$

Получили, что даже за час эффективной циркуляции в регионарном кровотоке может высвобождаться из эритроцитов количество железа

сопоставимое с его уровнями в опухоли массой 10 г. Если уточним, что время «существования» такой опухоли гораздо больше, возможно год, то цифра потерь железа эритроцитом в системе регионарного кровотока возрастет экспоненциально, так как в году 365 дней, следовательно множитель = 8760 часов.

Таким образом, учитывая существенный характер потерь эритроцитами железа, выявленный нами при определении его уровней в эритроцитах, циркулирующих в системем регионарного кровотока, делает его вероятным поставщиком железа для растущей опухоли. Учитывая незавершенный характер опухолевого ангиогенеза, проникновение липофильного гема, формирующегося при деградации мембраносвязанного гемоглобина, видится нам вероятным источником железа в тканях растущей карциномы.

Также на реальность гипотезы, выдвинутой нами на основании выявленных особенностей патогенеза «синдрома старения» эритроцитов у онкологических больных и вероятность участия в перераспределении железа в тканях, указывает и характер различий в содержании железа в эритроцитах «оттекающей крови» (в 1,6 раза по сравнению с циркулирующими клетками в системном кровотоке этих же пациентов). Поскольку практически во столько же – в 1,4 раза нарастают уровни железа в исследованных нами образцах карцином по сравнению с их индивидуальным контролем – тканями края резекции органа.

РАЗДЕЛ 8

АНАЛИЗ И ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) признан не только как физиологический механизм развития и ремоделирования тканей, но и как патологический механизм прогрессии рака, при котором клетки теряют свои поляризованные эпителиальные черты и приобретают мезенхимальные характеристики, такие как снижение уровня Е-кадгерина и повышение уровня N-кадгерина, десмина, виментина, α -гладкомышечного актина, которые, в свою очередь, формируют агрессивный фенотип [205, 295]. Важным негативным последствием ЭМП является развитие нечувствительности к методам комбинированного лечения рака.

По настоящее время верификация ЭМП в условиях стационара проводится как правило в рамках научных исследований, поскольку иммуногистохимическая верификация смены режимов экспрессии ряда показателей затратна, процедуры подготовки материала и его изучение продолжительны по времени, возлагают дополнительную квалификационную нагрузку на морфологов. Вместе с тем, персональная верификация ЭМП не вносит существенных изменений в протокол лечения.

В тоже время, согласно исследованиям донецкой школы морфологов, показано, что сама морфология ЭМП разнообразна, что затрудняет её верификацию. Поскольку, согласно исследованиям проф. Василенко И. В. в карциномах одной локализации и патоморфологии ЭМП может быть как очаговой, так и распространённой. По особенностям экспрессии ряда мезенхимальных маркеров может иметь как завершённый, так и незавершённый характер [63, 65]. Описана связь характера ЭМП с клеточным компонентом створомы – канцерассоциированными фибробластами типа D (cancer-associated, CAF II) и макрофагами (tumor associated, TAMs, CD68) [63].

В настоящее время известен ряд метаболитов, способных инициировать переход. Эти индукторы активируют различные пути передачи их сигналов,

включая многочисленные факторы транскрипции, хемокины, ферменты, активируя их взаимодействие. В результате разнообразных стимулов реализуются программы структурных и функциональных изменений злокачественных клеток. При этом метаболические особенности патогенеза ЭМП, как правило, исследуются в изолированных линиях опухолевых клеток, не смотря на значительный вклад в его развитие клеточного компонента опухолевой стромы.

Эти особенности патогенеза ЭМП обусловили проведение нами исследования на клиническом материале в получаемых интраоперационным путём биопрепаратах эпителиальных опухолей именно тех локализаций, чья распространённость и злокачественный характер роста ассоциированы с реализацией эпителиально-мезенхимального перехода.

Многочисленными исследованиями показано непосредственное стимулирующее влияние на развитие ЭМП активных форм кислорода (АФК) [284, 295, 276]. Они регулируют многочисленные сигнальные пути (например, пути MAPK и PI3K/Akt [332, 337] и транскрипционные активности (например, HIF и Snail) для усиления миграции и инвазии раковых клеток, и для ряда других свойств. Так, в частности, для ЭМП характерно усиление ангиогенеза, подавление апоптоза, угнетение пролиферативной активности.

Согласно Li W., свидетельствующем о значимости АФК в патогенезе ЭМП, управление вектором H_2O_2 /ERK/ NF- κ B может стать новой стратегией лечения злокачественной опухоли [294, 295]. Указывается на перспективность исследования ферментов – антиоксидантов, вовлеченных в метаболизм пероксида водорода и его инактивацию.

При разработке дизайна исследования учитывалось, что реализация сигналинга обеспечивается процессами окислительной модификации белков (ОМБ), их инактивации. Основными механизмами воздействия АФК считают взаимодействие с металлосодержащими белками или окисление их SH-групп [32]. В рамках работы в гомогенатах карцином немелкоклеточного рака легких (НМРЛ), аденокарцином желудка (РЖ) и колоректального рака (РК) проведен сравнительный анализ особенностей ферментативной активности

металлоферментов, вовлеченных в метаболизм H_2O_2 и других низкомолекулярных веществ, также обладающих свойствами регуляторных молекул, участвующих в формировании агрессивного фенотипа опухоли. Особенности их активности соотносили с морфо-биологическими показателями ЭМП, определявшимися наряду с биохимическим исследованием.

Несмотря на вклад ряда металлоферментов в развитие агрессивных свойств карцином, особенности их метаболизма при этом изучены мало, хотя исследование биохимических особенностей патогенеза ЭМП является актуальной проблемой.

В связи с этим, *целью* данного исследования явилось изучение активности металлоферментов в клетках крови и тканях карцином различной локализации, предпринята попытка выявить патогенетическую взаимосвязь между особенностями прооксидантных процессов, активностью ферментов обмена нуклеозидов и формированием индивидуальных агрессивных свойств карциномы.

Поскольку развитие анемии при раке также является показателем его агрессии, неблагоприятного прогноза, то наряду с исследованием особенностей обменных процессов в тканях опухолей изучали особенности обменных процессов в эритроцитах. А также и в тромбоцитах крови, учитывая их вовлечённость в канцерогенез, а также, что они как и эритроциты, также являются безъядерными клетками крови, но активно секретирующими ряд регуляторных белковых факторов [54].

Одним из таких факторов тромбоцитарного происхождения, стимулирующих рост эндотелия, является тимидинфосфорилаза [66, 81]. Это полифункциональный белок, чьи пролиферативные, ангиогенные, аптапоптозные эффекты связаны с ферментативной активностью [108, 317, 322]. Впервые наряду с фосфорилазной активностью (ТФк) на обширном клиническом материале исследована его альтернативная трансферазная активность (ТФан).

Согласно результатам дисперсионного однофакторного анализа ANOVA как ТФк, так и активность ТФан в раках различной локализации были достоверно выше контроля. Можем считать, что и трансферазная активность ТФ, как и

«классическая» фосфоорилазная может оказывать значимое влияние на клеточный метаболит. Следовательно, более корректным является их одновременное изучение. Между трансферазной и фосфоорилазной активностями фермента выявлена положительная связь средней силы (показатель ранговой корреляции Спирмена $\rho = 0,54$). Также активность ТФан значимо коррелировала с активностью АДА.

Причем, для повышения активности ключевого фермента катаболизма аденозина была характерна тенденция более выраженного её повышения в карциномах ЖКТ, обладающих большим пролиферативным потенциалом по сравнению с легочной тканью. Такая активность АДА ведет к повышению уровней дезоксиинозина в опухоли. Это может способствовать его дальнейшему потреблению в качестве косубстрата ТФан, так как известно о роли дезоксипуриновых нуклеозидов для трансферазной активности ТФ [66]. Косвенно об этом свидетельствует установленная корреляция активностей АДА и ТФан, более выраженная в опухолях по сравнению с контролем (показатель ранговой корреляции Спирмена $\rho = 0,704$; $p < 0,001$). Причем при исследовании в контролях взаимосвязей ферментативной активности всех изучавшихся ферментов лишь для ТФан и АДА установлена прямая связь (показатель ранговой корреляции Спирмена $\rho = 0,340$; $p < 0,024$) как в образцах слизистой желудка и кишечника, так и в нетрансформированной ткани легкого.

Следовательно, в генеральной, общей выборке показателей активности ферментов обмена нуклеозидов в качестве их центральных тенденций можем указать повышение всех видов активности ТФ и активности АДА в эпителиальных опухолях желудка, кишечника, немелкоклеточного рака легких по сравнению с контролем. О чём также свидетельствует прямая положительная сильная связь: для ТФк $\rho = 0,790$; для ТФан и АДА, соответственно, $\rho = 0,640$ и $\rho = 0,650$ (для всех ферментов уровень значимости $p < 0,050$). Это хорошо согласуется с результатами других авторов [303, 304].

Можно предположить, что выявленное нами повышение видов активности ТФ (фосфоорилазной и трансферазной) и АДА может быть универсальным

свойством карцином исследуемых локализаций. Следствием этих кооперативных изменений активности является возможность реализации эффектов 2-дезоксид-рибозы и одновременный ресинтез дезокситимидина в катализируемой ТФан реакции, необходимого для активации «запасного пути» синтеза тимидилата и репликации ДНК.

Также известно, что формируемая ТФк фосфорилированная форма 2-дезоксид-рибозы (2-д-Д-Риб), может способствовать продукции АФК [322]. Причем она и сама обладает рядом проангиогенных эффектов [66, 193]. Интересно, что H_2O_2 и 2-д-Д-Риб могут стимулировать одинаковые факторы транскрипции, например, ядерный фактор карпа В (nuclear factor kappa B, NFkB), отвечающие за устойчивость клетки к апоптозу, запускающие процессы ангиогенеза [320].

Таким образом, для исследуемых эпителиальных опухолей желудка, кишечника, немелкоклеточного рака легких характерно повышение активности металлоферментов обмена нуклеозидов, которые могут способствовать реализации определенных клеточных, тканевых программ, а именно, реализации ангиогенеза, определенных режимов пролиферации, развития резистентности к апоптозу[66].

Далее выполнен однофакторный анализ по определению однородности полученных выборок по значениям активности данных ферментов в биопрепаратах карцином исследуемых локализаций. Согласно однофакторному дисперсионному анализу ANOVA выборка опухолевой активности ТФ была неоднородной, но это не было связано с локализацией рака.

При сопоставлении особенностей двух видов ферментативной активности ТФ в опухолях легких и желудка с данными экспрессии CD34 и Ki-67, установили прямую сильную корреляционную связь между изменениями активности ТФк и показателем ангиогенеза CD34 (коэффициент парной корреляции Кендалла 0,760; $p < 0,05$).

В частности, активность ТФк в тканях НМРЛ с низким уровнем экспрессии CD34 составляла $35,16 \pm 8,62$ нмоль/мин·мг. При умеренной экспрессии CD34 -

77,17 $\pm$ 20,22 нмоль/мин·мг ; при высоких уровнях экспрессии CD34 - повышалась до 136,24 $\pm$ 25,43 нмоль/мин·мг.

Это хорошо согласуется с данными, что снижение уровня тимидина приводит к продвижению и пролиферации эндотелиоцитов, а 2-дезоксид-рибоза индуцирует их миграцию и формирование эндотелиальных тяжей в коллагеновом геле [66].

Также, согласно результатам корреляционного анализа между уровнями ядерной экспрессии Ki-67 и индивидуальными особенностями тканевой трансферазной активности ТФан также установлена прямая сильная связь - коэффициент парной корреляции Кендалла 0,790; $p < 0,05$. Действительно, высокие абсолютные значения активности ТФан в карциномах одной локализации сочетались с более высоким процентом её клеток, ядра которых экспрессировали Ki-67. Так, активность ТФан в тканях НМРЛ с низким уровнем экспрессии Ki-67 (5 – 15 %) составляла 78,25 $\pm$ 8,61 нмоль/мин·мг; при умеренной экспрессии Ki-67 (до 20 – 25%), соответственно, 113,6 $\pm$ 27,8 нмоль/мин·мг; при высоких уровнях Ki-67 ($\geq 40\%$) – до 221,6 $\pm$ 42,6 нмоль/мин·мг.

Установленная метаболическая неоднородность опухолей по видам активности ТФ и её корреляция с показателями ангиогенеза и пролиферации подтверждалась анализом формы распределения значений активности ТФк и ТФан. Согласно критерия χ^2 (хи-квадрат): $\chi^2=25,11$, число степеней свободы $k=4$. Распределения отличаются на уровне значимости $p<0,001$.

Итак, согласно результатам анализа особенностей опухолевой активности установлена неоднородность их выборок как при раке легкого, так при раке ЖКТ. Согласно характеру их распределения, как это было показано для опухолей легких, можно выделить 4 подгруппы как по активности ТФк (Хи-квадрат=25,11; число степеней свободы $k=4$; распределения отличаются на уровне значимости $p<0,001$), так и по активности ТФан (Хи-квадрат=32,20, число степеней свободы $k=4$; распределения отличаются на уровне значимости $p<0,001$). Это же характерно и для выборок активностей ТФк, ТФан опухолей ЖКТ. Общие тенденции особенностей видов активностей ТФ в этих подгруппах таковы: в двух

подгруппах из четырёх преобладал лишь один вид активности ТФ (или трансферазный, или фосфоорилазный; условно А и Б подгруппы). В третьей (В подгруппе) – при сопоставлении с индивидуальным контролем виды активности ТФ в опухоли выше, но достоверно не отличались от активности в контрольной выборке, Г – как ТФк, так и ТФан опухоли в 1,6 – 2 раза выше контрольных. Распределение количества случаев опухолей, соответствовавших описанным подгруппам по видам активности ТФ показало, что удельный вес случаев опухоли одной локализации в подгруппах с высокой активностью ТФан преобладал, составляя для всех случаев определенной локализации рака: НМРЛ 70%, РЖ 89%, КРР 76%. Это позволяет утверждать о существенном вкладе в опухолевый метаболит именно этого вида активности ТФ, а также рекомендовать при определении активности ТФ определять не только «классическую» фосфоорилазную активность, но и альтернативную трансферазную.

Важно отметить, что выявленные ранее корреляции активности ТФан и АДА, как в опухолях, так и в контрольных нетрансформированных тканях, также сохранялись и в подгруппах, выделенных при анализе однородности значений активности ТФк и ТФан согласно критерия χ^2 . Сохранялись кооперативные эффекты особенностей активности АДА и ТФан, о чем свидетельствуют выявленные как во всех подгруппах опухолей, так и в контроле, положительные сильные связи для ТФан и АДА, соответственно, показатель ранговой корреляции Спирмена $\rho = 0,720$ и $\rho = 0,710$ (в подгруппах А и Б в опухолевой ткани, уровень значимости $p < 0,050$).

Поскольку ЭМТ часто имеет очаговый характер, диагностическим гистологическим, иммуно-гистохимическим исследованиям в тонких тканевых срезах может помочь биохимический метод – определение метаболических белковых маркеров в гомогенатах опухоли, характеризующих большой объем материала. Вследствие установленных корреляций с уровнями ядерной экспрессии Ki-67 и CD34 – виды активности ТФ могут стать перспективным биохимическим маркером ЭМТ.

Поскольку мониторинг имеет чрезвычайное значение при решении целого ряда вопросов клинической онкологии, важно использование наиболее информативного материала. По времени процесс гомогенирования тканей продолжителен, поэтому в рамках работы также проводилось исследование особенностей ферментативной активности в плазме венозной крови, оттекающей непосредственно от пораженного органа (Пл_от), а также в оттекающей плазме, богатой тромбоцитами (ПлБТот). Забор материала производился во время оперативных вмешательств при РЖ, РК.

Также исследовали и плазму (Пл), и тромбоциты центрального кровотока (ПлБТ). в крови, получаемой традиционным способом путём её забора из локтевой вены.

При исследовании особенностей тромбоцитарной активности фермента и проведении дисперсионного анализа установили однонаправленность изменений активности АДА при патологии. Согласно результатам анализа ANOVA активность АДА в плазме богатой тромбоцитами ПлБТ. достоверно выше, чем в контроле соответствующей возрастной группы ($p = 0,11$).

Согласно полученным результатам, активность АДА в ПлБТот, оттекающей от пораженного органа имеет большую активность по сравнению с ее активностью в ПлБТ периферической крови. Так, если активность АДА в ПлБТ периферической крови по сравнению с контрольными значениями в соответствующих возрастных группах повышалась в 1,7 – 2,1 раза, то её повышение при этом в ПлБТот было значительнее, в 2,1 – 3,1 раза.

Возможно, это указывает на активацию тромбоцитов регионарного кровотока, поскольку известно об их пуринергической стимуляции. Это согласуется с данными об их секреторной активности не только по целому ряду белковых факторов, но и по 2-д-D-Риб, что в свою очередь стимулирует их агрегацию и ответ на тромбин, согласно [17, 54, 76].

Действительно, как карциномы, так и ПлБТот характеризовалась наиболее высокой активностью ТФ. Достоверные отличия между видами активности ТФ в этом материале и в опухоли отсутствуют.

Таким образом, установленные кооперативные сдвиги активности ферментов обмена нуклеозидов согласуются с мнением об аутокринной амплификации адгезии, следовательно и остальных функций тромбоцитов, в том числе и секреции ангиогенных и других факторов канцерогенеза в регионарном кровотоке, обусловленные активностью ТФк и описанной [81] последующей секрецией 2-д-D-Риб.

В то же время, плазма периферической крови, богатая тромбоцитами (ПлБТ) является более доступным материалом (кровь забиралась из локтевой вены традиционным способом). Как и для АДА, так и для видов активности ТФ в ПлБТ выявлены более высокие значения активности. Действительно, в норме активность ТФк в плазме богатой тромбоцитами была в среднем в 1,5 раза выше, чем в «чистой» безтромбоцитарной плазме ($p < 0,05$).

Исследованы корреляции особенностей видов активности ТФ в ПлБТ с опухолевой активностью. В частности, для индивидуальных особенностей опухолевой активности ТФан и её активности в ПлБТ коэффициент парной корреляции Кендалла 0,42; $p < 0,05$ (показатель ранговой корреляции Спирмена $\rho = 0,60$; $p < 0,05$). Соответствующие виды корреляционных связей для ТФк опухоли и её активности в ПлБТ периферической крови: коэффициент Кендалла 0,36 (Спирмена $\rho = 0,50$), $p < 0,05$. Установленные корреляции делают ПлБТ перспективным материалом для онкомониторинга.

Поскольку для активности ТФ в ПлБТ периферической крови были выявлены взаимосвязи с индивидуальными особенностями её опухолевой активности, то также изучили их взаимосвязи с уровнями опухолевой экспрессии CD34 и Ki-67. Для активности ТФк в ПлБТ выявлена слабая положительная связь с опухолевой экспрессией CD34 (коэффициент парной корреляции Кендалла = 0,36; ранговой корреляции Спирмена $\rho = 0,44$; $p < 0,05$). С уровнями ядерной экспрессии Ki-67 в опухоли коррелировала активность ТФан, определявшаяся у этих пациентов в плазме периферической крови, богатой тромбоцитами (ПлБТ) (коэффициент парной корреляции Кендалла = 0,37; ранговой корреляции Спирмена $\rho = 0,54$; $p < 0,05$). В то же время для видов активности ТФ, определявшейся классически в

«чистой» плазме периферической крови такие взаимосвязи не выявлены. Следовательно, для индивидуального мониторинга изменений тканевой пролиферации, например, для определения эффективности проводимого химиотерапевтического лечения в динамике, более информативным видится определение активности ТФ в плазме периферической крови, богатой тромбоцитами (ПлБТ), по сравнению с традиционным исследованием активности ТФ в плазме или сыворотке крови.

Особенности активности ферментов в плазме крови, оттекающей от органа (без тромбоцитов, чистой, Пл_{от}) также характеризовались большей чувствительностью по отношению к индивидуальным особенностям опухолевой активности, чем плазма периферической венозной крови.

В распределенных статистически по соотношению видов активности ТФ в тканях в подгруппах опухолей РК (согласно критерию χ^2 , были описаны выше) цифры видов активности ТФ опухолей сопоставили с особенностями её активности в оттекающей от опухоли плазме (Пл_{от}) и плазме периферической крови (Пл) на примере подгрупп А и Б, сформированных ранее на основе индивидуальных особенностей видов активности ТФ. В случае высокой активности ТФ_{ан} в опухоли по сравнению с нетрансформированными тканями края резекции органа ($199,46 \pm 13,03$ нмоль/мин мг в опухоли в 1,8 раза выше, чем $108,40 \pm 15,23$ нмоль/мин мг в контроле), её активность в плазме оттекающей крови превышала свою же активность в системном кровотоке ($67,55 \pm 11,07$ нмоль/мин мг в оттекающей от опухоли крови в 1,9 раза выше, чем $34,93 \pm 14,82$ нмоль/мин мг). В этой подгруппе ТФ_к оставалась низкой и в тканях ($71,67 \pm 17,55$ нмоль/мин мг в опухоли и $55,89 \pm 14,71$ нмоль/мин мг в контроле), и в плазме всех уровней циркуляции ($5,84 \pm 1,25$ нмоль/мин мг в оттекающей от опухоли и $6,86 \pm 1,66$ нмоль/мин мг в системном кровотоке).

Иная ситуация обнаруживалась в случае преобладания в тканях опухоли ТФ_к активности по сравнению с нетрансформированными тканями края резекции органа ($213,88 \pm 35,45$ нмоль/мин мг в опухоли в 3 раза выше, чем $68,67 \pm 13,68$ нмоль/мин мг в контроле). Тогда её активность в плазме оттекающей крови и в

плазме центрального кровотока в 3 раза превышала активность в соответствующем материале в предыдущей подгруппе, была соответственно $18,60 \pm 4,56$ нмоль/мин мг в оттекающей от опухоли крови и $11,03 \pm 2,49$ нмоль/мин мг в центральном кровотоке. В это же время ТФан была низкой в тканях ($78,25 \pm 8,61$ нмоль/мин мг в опухоли по сравнению с $100,13 \pm 13,38$ нмоль/мин мг в контроле), не отличалась в оттекающей крови от своей активности в центральном кровотоке ($40,40 \pm 10,69$ нмоль/мин мг и $27,53 \pm 8,28$ нмоль/мин мг в системном кровотоке).

Поскольку для активности ТФ в ПЛБТ периферической крови были выявлены взаимосвязи с индивидуальными особенностями её опухолевой активности, то также изучили их взаимосвязи с уровнями опухолевой экспрессии CD34 и Ki-67. Для активности ТФк в ПЛБТ выявлена слабая положительная связь с опухолевой экспрессией CD34 (коэффициент парной корреляции Кендалла = 0,36; ранговой корреляции Спирмена $\rho = 0,44$; $p < 0,05$). С уровнями ядерной экспрессии Ki-67 в опухоли коррелировала активность ТФан, определявшаяся у этих пациентов в плазме периферической крови, богатой тромбоцитами (ПЛБТ) (коэффициент парной корреляции Кендалла = 0,37; ранговой корреляции Спирмена $\rho = 0,54$; $p < 0,05$). В то же время для видов активности ТФ, определявшейся классически в «чистой» плазме периферической крови такие взаимосвязи не выявлены. Следовательно, для индивидуального мониторинга изменений тканевой пролиферации, например, для определения эффективности проводимого химиотерапевтического лечения в динамике, более информативным видится определение активности ТФ в плазме периферической крови, богатой тромбоцитами (ПЛБТ), по сравнению с традиционным исследованием активности ТФ в плазме или сыворотке крови.

Таким образом, эпителиальные опухоли желудка и кишечника, немелкоклеточный рак легкого характеризует высокая трансферазная активность ТФ, следовательно, она также может оказывать значимый эффект на клеточный метаболит. Ввиду этого более корректным является их одновременное изучение.

В эпителиальных опухолях желудка, кишечника, немелкоклеточном раке легких фосфорилазная и трансферазная активности тимидинфосфорилазы имеют свои особенности, связанные с индивидуальными характеристиками ангиогенеза и дедифференцировкой (CD34), а именно ТФк ($r = 0,79$); с интенсивностью ядерной экспрессии Ki-67 – ТФан ($r = 0,76$), что делает исследование видов активности ТФ перспективными биохимическими маркерами ангиогенеза и пролиферации.

Считаем, что наиболее информативным материалом, отражающим индивидуальные особенности опухолевой активности, являются тромбоциты крови, оттекающей от пораженного органа и её плазма. Возможно использование данного материала, получаемого интраоперационно при оперативном лечении пациентов, не получавших неoadъювантную химиотерапию, для индивидуализации адъювантной химиотерапии препаратами 5-фторурацила, в метаболизме которых участвует ТФ [314, 323].

Наряду с особенностями обмена нуклеозидов, также исследованы особенности активности ферментов, чья активность сопряжена с процессами свободно-радикального окисления. В гомогенатах биопрепаратов опухолей НМРЛ и карцином желудка и кишечника (КЖК) на фоне изучения особенностей активности ксантиноксидазы (КСО) и уровней малонового диацетальдегида (МДА), обладающих прооксидантными свойствами, определялись особенности ферментативной активности ферментов – антиоксидантов (глутатитонпероксидазы (ГПО) и супероксиддисмутазы (СОД)).

Согласно результатам, нами не установлено достоверных отличий в активности СОД между нетрансформированными тканями края резекции и карциномами НМРЛ или КЖК. При этом согласно W-критерий Вилкоксона как в НМРЛ, так и карциномах КЖК на фоне нарастания активности КСО и уровней МДА, активность глутатитонпероксидазы снижалась (для ГПО НМРЛ в 1,2 раза по сравнению с контролем $p = 0,006$; для КЖК в 1,4 раза, $p = 0,011$).

Данный дисбаланс усиления прооксидантных процессов и дисфункции ферментов антиоксидантной защиты подтверждает выявленная отрицательная

связь особенностей активности ГПО с патологией ($\rho = -0,621$; $p < 0,05$). Причем в КЖК активность ГПО была минимальной по сравнению с НМРЛ ($p = 0,002$). Согласно результатам рангового однофакторного анализа Краскела-Уоллиса и медианного теста (χ^2) выявили, что особенности активности ГПО и ТФк в опухолях специфичны и связаны с локализацией опухоли. 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 активности в карциномах не были связаны с локализацией.

Важно отметить, что повышение активности ТФк на фоне низкой активности ГПО, выявленное в карциномах, может способствовать повышению уровней как 2-д-D-Риб-1-Ф, так и H_2O_2 . К тому же известно, что 2-д-D-Риб-1-Ф стимулирует генерацию АФК [192, 317]. Это повышает вероятность активации клеточных программ, связанных с опухолевой прогрессией, запускаемых H_2O_2 и 2-д-D-Риб-1-Ф [66, 283].

При этом установлены корреляции между парами значений биохимических показателей в гомогенатах тканей согласно дискриминантному анализу: КСО и АДА $r = 0,697$, что согласуется с их участием в одном метаболическом процессе – распаде пуринов. Также для КСО и ГПО $r = -0,560$; КСО и МДА $r = 0,465$; МДА и ГПО $r = -0,509$, что указывает на выраженный дисбаланс антиоксидантного ферментативного звена на фоне нарастания прооксидантных процессов. При этом отметим отсутствие связей между активностью СОД и ГПО ($r = 0,043$), а также СОД и КСО ($r = 0,183$), хотя они связаны, поскольку КСО является главным поставщиком субстрата супероксиданиона для СОД, которая нарабатывает пероксид водорода для последующей его инактивации ГПО. На этом фоне подтверждались ранговые корреляции между значениями ТФан и АДА, описанные выше, для ТФан и АДА $r = 0,728$.

Важно отметить, что низкая активность ферментов – антиоксидантов носила органоспецифичный характер. Согласно с U критерием Манна-Уитни при анализе различий по рангам в группах НМРЛ и карциномах ЖКТ имелись достоверные

отличия между СОД ($p = 0,041$) и ГПО ($p = 0,002$) в зависимости от локализации карцином. Также в нетрансформированных слизистых края резекции, служивших контролем при КЖК, установлена более высокая активность КСО и уровней МДА по сравнению с легочной тканью и достоверно более низкая активность ГПО. Учитывая тот факт, что ГПО подвержена окислительной модификации (ОМБ), то подобные изменения с нетрансформированных тканей могут также трактоваться как выявленный дисбаланс про- и антиоксидантных процессов [79, 196].

Примечательно, что повышение активности КСО в слизистых желудка и кишечника по сравнению с нетрансформированными тканями легких ($14,66 \pm 3,88$ нмоль/мин·мг по сравнению с $8,46 \pm 2,45$ нмоль/мин·мг, $p < 0,05$) могло быть ключевым в комплексе описанных выше для КСО, МДА и ГПО отличий в нетрансформированных контрольных тканях ЖКТ и легких. Действительно, поскольку O_2^- , трансформирующийся затем в H_2O_2 – продукты её реакции, можем предположить эквивалентное нарастание их уровней на фоне повышения активности КСО именно в слизистых ЖКТ, что хорошо согласуется с более высоким содержанием МДА. Всё вместе это могло способствовать более выраженным явлениям ОМБ, в том числе ГПО [283, 285, 289].

Таким образом, в карциномах желудка и колоректального рака протекание процессов свободно-радикального окисления могло быть более интенсивным, чем при НМРЛ (согласно выраженным нарушениям активности СОД и ГПО на фоне усиления прооксидантных процессов (согласно возросшим уровням МДА и активности КСО)). Это ведет к повышению уровней пероксида водорода, усилению процессов свободно-радикального окисления.

Проведенный анализ однородности значений ферментативных показателей в самих выборках карцином одной локализации указал на отсутствие однородности дисперсий значений СОД, АДА, КСО в выборках при патологии. Методом кластерного анализа каждая группа опухолей в пределах одной локализации структурировалась в два кластера. Так, например, согласно особенностям активности СОД в каждой локализации был сформирован кластер, где её

активность в образцах опухолей одной локализации была выше, чем в другом кластере.

Поскольку размерность единиц активности СОД была минимальной, то анализ по остальным ферментам проводили следующим образом. Все данные по ферментам соответствовали конкретному образцу тканей карциномы, включенному по активности СОД в кластер 1 или 2. Данный подход позволил оценить всю совокупность исследовавшихся биохимических параметров в каждом определенном образце карциномы.

Для активности ГПО не выявлено межгрупповых отличий в образцах опухолей одной локализации, хотя выявлена тенденция к более низким значениям активности ГПО на фоне нарастания активности СОД. Согласно полученным нами результатам, во вторых подгруппах карцином разных локализаций, характеризовавшихся более высокой активностью СОД, повышения активности ГПО не установлено. Наоборот, во 2-й подгруппе карцином желудка и кишечника на фоне максимальной активности СОД ($U = 21,00$, $Z = - 2,59$, $p = 0,009$ по сравнению с остальными подгруппами), активность ГПО была минимальной ($U = 14,00$, $Z = - 3,05$, $p = 0,002$ по сравнению с 1-й подгруппой карцином КЖК и НМРЛ 1-й и 2-й подгрупп).

При этом для КСО и других ферментов обмена нуклеозидов наблюдали лишь тенденцию к повышению их активности наряду с активностью СОД во вторых кластерах (далее подгруппах) опухолей одной локализации.

Поскольку выявленные тенденции заслуживают внимания при помощи дополнительных инструментов статистического анализа исследовали особенности ферментативной активности между кластерами. Предварительно можем отметить, что для образцов карцином, выделенных во вторые подгруппы опухолей одной локализации дисбаланс активности СОД и ГПО был максимален, следовательно, в них более активно протекали процессы свободно-радикального окисления среди всех исследовавшихся биопрепаратов опухолей одной локализации и морфологической группы.

Согласно U критерия Манна-Уитни при анализе различий по рангам в подгруппах НМРЛ 1 гр и НМРЛ 2 гр есть достоверные отличия не только между СОД и ТФк в выделенных подгруппах (соответственно $p < 0,001$ и $p = 0,025$), но и для АДА они тоже достоверны ($p = 0,016$).

При анализе различий по рангам в подгруппах КЖК 1 гр и КЖК 2 гр согласно U критерию Манна-Уитни есть достоверные отличия не только между СОД, но и для ТФк в выделенных подгруппах ($p = 0,049$). В то время как остальные ферменты не отличались достоверно в подгруппах карцином ЖКТ.

Проанализировав однородность значений ферментативных показателей в выделенных подгруппах среди карцином одной локализации. Согласно анализу однородность дисперсий значений СОД в них была достигнута, а для КСО и ГПО утрачена. Считаем, что это ведёт к ещё большему нарастанию процессов свободно-радикального окисления во вторых кластерах (подгруппах) опухолей одной локализации. В подтверждение гипотезы о том, что вторые кластеры или подгруппы опухолей одной локализации характеризовались усилением прооксидантных процессов по сравнению со своими первыми подгруппами, как при НМРЛ, так и при КЖК, свидетельствует установленная прямая положительная корреляция для активности СОД и уровней МДА при делении выборок опухолей одной локализации и морфологии на кластеры. Значения коэффициента ранговой корреляции Спирмена для СОД и МДА выявлены соответственно $p = 0,60$.

По результатам дискриминантного анализа наиболее специфичными для выделенных кластеров опухолей одной локализации оказались особенности активности СОД, ТФк, ГПО. (Для СОД лямбда Уилкса 0,160, толерантность 0,94, $p < 0,001$. Для ТФк, соответственно, 0,122; 0,91, $p < 0,001$; ГПО – 0,160; 0,94, $p = 0,030$). Следовательно, в НМРЛ, раке желудка, раке кишечника выявлены подгруппы, характеризовавшиеся дисбалансом активности СОД и ГПО, повышением фосфоорилазной активности ТФ без нарастания ее трансферазной активности. Это могло привести к метаболическому стимулированию ангиогенеза, формированию инвазивных свойств опухоли, устойчивости к

апоптозу. Например, известно, что H_2O_2 инициирует ассоциацию α и β субъединиц фактора, индуцируемого гипоксией (hypoxia-inducible factor, HIF), запуская реализацию его проангиогенных и антиапоптозных эффектов [320]. ТФк, активируя катаболизм дезокситимидина, помимо собственного воздействия на ангиогенез стимулирует НАДФН₂-оксидазы, формирующие АФК [276, 317, 336]. По мнению Tabata S. и соавт., ТФ способствует активации сигнальных путей, запускаемых H_2O_2 [294]. Так, пероксид водорода активирует ряд чувствительных онкогенов, способствующих опухолевой прогрессии, реализации эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП), метастазированию [295]. Эти свойства H_2O_2 позволили Li W. и соавт. считать, что СОД, которая также его продуцирует, может участвовать в развитии ЭМП [295, 322]. При этом, опухоль приобретает агрессивные свойства, традиционные методы лечения становятся неэффективными [320].

Одними из чувствительных к АФК онкогенами, участвующими в программе эпителиально-мезенхимального перехода, являются *Snail*-гены. Кодированные *Snail* факторы транскрипции реализуют формирование инвазивных свойств опухоли [205]. Так, вследствие репрессии транскрипции Е-кадгерина, ламинина, интегринов мембран нарушаются межклеточные контакты, клеточно-матриксная адгезия [205]. Активация металлопротеиназ обеспечивает протеолиз внеклеточного матрикса, белковых компонентов базальных мембран [322]. Изменения клеточной полярности и формы сопровождаются экспрессией мезенхимальных маркеров – виментина, α -актина гладких мышц. Клетки приобретают подвижность, способность к инвазии, метастазированию [205]. Zeng J. и соавт. было экспериментально установлено, что H_2O_2 одновременно подавляет экспрессию Е-кадгерина и стимулирует экспрессию мезенхимальных маркеров (виментина и N-кадгерина) [102, 276]. Как АФК, так и ТФ стимулируют активность матриксных металлопротеиназ [183, 322].

Далее сопоставили описанные особенности метаболизма карцином с их морфо-биологическими показателями.

Эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) регистрировали по ряду признаков. В частности, наблюдали снижение (или отсутствие) мембранной экспрессии Е-кадгерина, появление её в цитоплазме опухолевых клеток. Также снижалась экспрессия цитокератина AE1/AE3 и цитокератина 18. Некоторые клетки обособливались, вытягивались, приобретали фибробластоподобную форму. При этом появлялась экспрессия мезенхимальных маркеров – десмина, виментина, иногда и α -актина гладких мышц.

Отметим, что в 1-й подгруппе НМРЛ ($n = 16$) в 7 случаях (44 %) были выявлены признаки ЭМП. Во 2-й подгруппе НМРЛ ($n = 9$) переход наблюдали во всех образцах (100 %). В 1-й подгруппе КЖК ($n = 11$) ЭМП зарегистрировали в 6 случаях (54 %), а в их 2-й подгруппе ($n = 10$) переход наблюдали в 8 образцах опухолей (80 %).

Интенсивность пролиферации варьировала. Среди случаев НМРЛ при наличии ЭМП пролиферативная активность чаще была низкой (экспрессия Ki-67 < 10 % клеток). В образцах без ЭМП она была умеренной (Ki-67 20 – 30 %) и высокой (30 – 40 %), достигая иногда 60 %. При раке желудка кишечного типа, в аденокарциномах кишечника, как правило, интенсивность пролиферации была высокой, экспрессия Ki-67 в среднем составляла 30 – 50 %, однако при ЭМП её интенсивность снижалась.

В подавляющем большинстве случаев при эпителиально-мезенхимальном переходе наблюдали выраженную экспрессию сосудистого маркера CD34 и активацию ангиогенеза как при НМРЛ (рисунок 5.2, Б), так и в группе КЖК.

Отметим, что ЭМП наблюдалась преимущественно в опухолях, распределённых по результатам кластерного анализа во вторые подгруппы (соответственно, 100 % образцов опухолей, составлявших 2-ю подгруппу НМРЛ, и 80 % из 2-й подгруппы КЖК). Выявленные в них особенности обмена нуклеозидов, а также СОД, ГПО могли способствовать продукции 2-д-D-Риб-1-Ф, H_2O_2 и развитию их эффектов.

В солидных опухолях различной локализации установлено, что опухоли одной локализации и патоморфологического типа метаболически неоднородны по

активности антиоксидантных ферментов (СОД, ГПО) и фосфорилазной активности ТФ. Нарастание опухолевой фосфорилазной активности ТФ в среднем в 2 раза на фоне повышения активности СОД и низкой активности ГПО могут формировать условия для стимулирования тканевыми метаболитами (H_2O_2 и 2-д-Д-Риб-1-Ф) опухолевой прогрессии. Предполагаем, что индивидуальные метаболические особенности могут непосредственно способствовать активации сигнальных путей, обеспечивающих формирование агрессивных свойств опухоли, т.ч. реализующих эпителиально-мезенхимальный переход.

Известно, что формированию индивидуальных агрессивных свойств опухоли способствуют тканевая гипоксия. Нарушения внутренних гомеостатических механизмов в эритроцитах могут приводить к развитию анемии [198, 250, 279] отягощающей течение основного заболевания. По некоторым данным анемия, ассоциированная с хроническими заболеваниями, присутствует у 40% больных с солидными [87]

Нарушения функций клеток крови сопряжены с изменениями их метаболизма [21, 147]. Следовательно, актуальным является поиск биохимических критериев, опосредующих дисфункцию клеток крови при раке.

У пациентов с распространенными формами опухолевого процесса исследуемых локализаций в эритроцитах определяли особенности ферментативной активности АДА, КСО, СОД, ГПО. Данные по особенностям их ферментативной активности сопоставляли с уровнями МДА, 2,3-ДФГ. Впервые в рамках исследования сравнивались особенности метаболизма красных клеток крови в зависимости от их уровней циркуляции. Так показатели метаболизма клеток, находившихся в периферическом кровотоке, (кровь получали традиционно из локтевой вены) были сопоставлены с особенностями обменных процессов в своих же эритроцитах, но находящихся в регионарном кровотоке.

При раке различных локализаций изменения активности АДА в эритроцитах были противоположны изменениям её активности в тромбоцитах. Согласно проведенному однофакторному дисперсионному анализу при опухолевой

патологии АДА в эритроцитах достоверно снижалась как при НМРЛ ($p = 0,002$), так при РЖ ($p = 0,002$) и РК ($p = 0,003$).

Ранее Мироновой К. А. в эритроцитах крови выявлена отрицательная обратная связь изменений активности АДА с показателями дезорганизации мембран и снижением их жизнеспособности, а также установлена ее корреляция со стадиями рака у больных со злокачественной патологией различной локализации [51]. Было предложено считать АДА универсальным ферментативным показателем низкой жизнеспособности и дисфункции клеток крови.

Нами не установлено связи изменений активности АДА с локализацией рака, поскольку между различий в активности между группами НМРЛ, РЖ и РК не выявлено. Однако, об ассоциации её изменений с опухолевой патологией свидетельствует связь изменений активности АДА и уровней циркуляции красных клеток крови. В частности, при карциномах желудка и колоректальном раке (КЖК) выявлено более выраженное угнетение активности АДА эритроцитов, циркулирующих в регионарном кровотоке (в 3,2 раза по сравнению с контролем до $4,28 \pm 2,13$ нмоль/мин·мг), чем у находящихся в системном кровотоке (АДА была в среднем в 1,6 раза ниже контроля до $8,80 \pm 2,47$) в эритроцитах у этих же пациентов. Различия между подгруппами в зависимости от уровня циркуляции эритроцитов пациентов с КЖК достоверны, согласно критерия Вилкоксона при попарном сопоставлении активности в двух образцах крови величина критерия $W = 5,16$ ($p < 0,001$). При этом между индивидуальной активностью фермента в системном (периферическом) кровотоке и в эритроцитах регионарного кровотока, т.н. «оттекающей крови» выявлена прямая сильная связь (коэффициент ранговой корреляции Спирмена 0,78). То есть, чем выраженнее снижение активности в эритроцитах системного кровотока, тем ниже она была в «оттекающей от опухоли» крови.

Для остальных показателей метаболизма эритроцитов при опухолевой патологии также регистрировали их изменения, связанные с основным заболеванием. Аналогично дисбалансу ферментов – антиоксидантов,

установленному в тканях, в эритроцитах выявляли снижение активности ГПО ($p = 0,004$) на фоне нарастания активности СОД (в среднем в 2 раза) ($p < 0,001$). Повышение активности СОД регистрировали на фоне повышения активности КСО, повышения уровней МДА.

Повышение активности КСО могло быть связано с усилением катаболизма пуринов, вероятно и аденилата. В то время снижение активности АДА могло быть обусловлено развитием мембранной дисфункции на фоне усиления ПОЛ, о чем свидетельствует нарастание МДА, выявленное нами в эритроцитах пациентов при НМРЛ, РЖ, РК. Согласно Мироновой К. А, в условиях эндогенной раковой интоксикации, сопровождавшейся повышением в крови катаболитов обмена — веществ низкой и средней молекулярной массы (ВНиСММ), возрастает нагрузка на мембраны эритроцитов, сорбирующие ВНиСММ из крови. Ею установлена связь нарастания сорбционной способности мембран и угнетения активности мембраносвязанных ферментов, в частности АДА и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ). Была выявлена связь изменений ферментативной активности с развитием анемии [51].

Эти результаты согласуются с установленным нами более выраженным снижением активности АДА в регионарном кровотоке, поскольку и уровни ВНиСММ там, безусловно, выше. Кроме того, снижение активности Г6ФДГ неизбежно ведет к дефициту НАДФН₂, что отрицательно скажется на редукции глутатиона, поэтому хорошо согласуется с выявленной нами низкой активностью ГПО.

Отметим, что как и для особенностей тканевых процессов свободно-радикального окисления при КЖК, для которых как в карциномах, так и в нетрансформированных контрольных тканях на основании выявленного дисбаланса про- и антиоксидантов установлена их большая интенсивность по сравнению с НМРЛ, так и в эритроцитах пациентов с КЖК эти процессы могли протекать более интенсивно, чем при НМРЛ.

Так, нами было установлено выраженное нарастание уровней 2,3-дифосфоглицерата (2,3-ДФГ), отвечающего за процессы газообмена кислородом

между эритроцитами и тканями ($p < 0,001$). Это свидетельствует о напряженности процессов газообмена, возможности развития гемической гипоксии. Действительно, в эритроцитах при НМРЛ повышение уровней 2,3-ДФГ было в 1,8 раза выше нормы. В то время как и при раке желудка, и при раке кишечника оно было в 2,5 раза выше нормы и выше, чем при НМРЛ ($p < 0,05$).

Причём важно отметить некую связь с описанным ранее более выраженным дисбалансом про- и антиоксидантных процессов, выявленным как в карциномах КЖК, так и в нетрансформированных слизистых ЖКТ. Значит наше предположение о большей интенсивности процессов свободно-радикального окисления при КЖК, основанное на результатах исследования изучаемых процессов в тканях, сочеталось с их большей интенсивностью в эритроцитах при раке ЖКТ. Кроме нарастания 2,3-ДФГ можем отметить, что именно при РЖ и РК уровни МДА в 1,7 – 2 раза превышали норму, в то время, как при НМРЛ оно было несколько меньше – в 1,5 раза. При этом в эритроцитах при РК наблюдалось значительное угнетение активности ГПО в 2 раза, а при НМРЛ в 1,4 раза.

Таким образом, при КЖК дисбаланс про- и антиоксидантов наиболее выражен, чем при НМРЛ.

О сопряженности нарушений газообмена и ПОЛ свидетельствует выявленная в результате дискриминантного анализа положительная корреляция МДА и 2,3-ДФГ ($r = 0,54$). Примечательно, что из всей совокупности биохимических показателей, исследуемых в эритроцитах, лишь для ещё одной пары показателей была также установлена корреляция – для гемоглобина и гематокрита, что, безусловно, закономерно. Однако также указывает на тесную взаимосвязь показателя ПОЛ – МДА и напряженности процессов оксигенации, согласно одновременного усиления эритроцитами продукции 2,3-ДФГ при нарастании уровней МДА.

О взаимосвязи нарушений обменных процессов в эритроците и патологии также свидетельствует тот факт, что выраженность нарушений обмена зависела от уровня циркуляции красных клеток крови. Как было описано выше на примере выявленных особенностей активности АДА, описываемые дисметаболические

процессы были максимально выражены в эритроцитах, циркулировавших в региональном кровотоке, в так называемых «оттекающих от опухоли» эритроцитах по сравнению с их системной циркуляцией, то есть в клетках, находившихся в периферическом кровотоке.

Согласно полученным данным, в эритроцитах регионарного кровотока достоверно снижалась активность КСО ($p = 0,001$) и ГПО ($p = 0,008$), то есть имелись те же тенденции, что и АДА, но менее выраженные, поскольку снижение их активности в «оттекавших от органа» эритроцитах было лишь в 1,3 раза ниже по сравнению с эритроцитами этих же пациентов, но полученных из системного кровотока, $p = 0,001$ и $p = 0,008$, соответственно.

На этом фоне регистрировали нарастание уровней 2,3-ДФГ в 1,7 раза по сравнению с его уровнями в эритроцитах этих же пациентов, циркулирующих в системном кровотоке ($p = 0,003$). На фоне выявленных изменений ферментативной активности наблюдали тенденцию к дальнейшему повышению уровней МДА ($p = 0,001$). Между парами этих показателей в зависимости от их циркуляции «периферический – регионарный» уровни кровотока выявлены сильные прямые связи. Так, для активностей КСО, ГПО и уровней МДА, а также 2,3-ДФГ между своими показателями относительно уровня циркуляции, их ранговые корреляции Спирмена при условии $p < 0,05$ составили 0,77; 0,90; 0,91 и 0,72.

Далее среди показателей метаболизма эритроцитов определили, что для эритроцитов регионарного кровотока к специфичным, связанным с наличием опухолевого процесса свойствам относятся следующие: снижение активности АДА и ГПО (показатель ранговой корреляции Спирмена $\rho = -0,78$ и $-0,63$). Это хорошо согласуется с сильной прямой связью для уровней 2,3-ДФГ, нараставших в эритроцитах регионарного кровотока, что свидетельствовало об ухудшении газообмена в эритроцитах при дисбалансе их метаболизма.

В свою очередь это хорошо согласуется со снижением активности АДА, что ведёт к повышению уровней аденозина, который, как известно инициирует формирование интермедиата гликолиза - 2,3-ДФГ [228, 261]. Также о

чувствительности установленных корреляций свидетельствует наличие прямых средней силы связей, выявленных для КСО и АДА ($\rho = -0,78$; $p < 0,05$), поскольку это ферменты одного общего процесса - катаболизма аденилата. А так как в виду особенностей своей активности КСО – она поставщик АФК, то положительная связь между КСО и ГПО активностями ($\rho = 0,49$; $p < 0,05$) хорошо согласуется с антиоксидантной функцией ГПО [8].

Проведенный анализ однородности значений показателей в выборках при патологии помимо её отсутствия для значений гемоглобина и гематокрита (Hb и НСТ), ассоциированных с развитием анемии, также при этом определил неоднородность значений 2,3-ДФГ. Очевидно, что данный показатель может быть также неспецифически связан с развитием анемии, так как это согласуется с «синдромом старения» эритроцитов у онкологических больных и развитием дисфункции [247].

По результатам дисперсионного анализа при развитии анемии для всех показателей тенденции, сопровождавшие дисметаболические нарушения в эритроцитах, развившиеся на фоне опухолевого процесса сохранялись.

Для некоторых показателей установлено более выраженное их изменение не только по сравнению с контролем, но и по сравнению с нарушениями, имевшими место при развитии опухолевого процесса, но ещё не сопровождавшимися развитием анемии. Прежде всего, это дисбаланс активности ферментов-антиоксидантов. Так как активность ГПО, наоборот, в подгруппах со снижением Hb и НСТ была более низкой, снижаясь при НМРЛ с сопутствовавшей анемией в 2 раза по сравнению с эритроцитами при НМРЛ без анемического синдрома. При КЖК в сочетании с анемией снижение ГПО было наиболее резким, активность фермента в 3,2 раза была ниже по сравнению с эритроцитами при КЖК без анемического синдрома.

Согласно особенностям детоксикации АФК эритроцитами [5, 14, 32], даже при повышении активности СОД, но дисфункции ГПО реализуется несколько механизмов токсичности АФК. Так, ГПО в норме помимо нейтрализации пероксида водорода также должна протектировать клетку от развития ОМБ [21].

Этот эффект обеспечивает её способность восстанавливать окисленные SH-группы белков [89]. Следовательно, снижение активности ГПО сопряжено с активацией процессов ОМБ. Также уникальна роль фермента в детоксикации гидроперекисей полиеновых жирных кислот, что в норме необходимо для сдерживания процессов ПОЛ. Причём известно, что резервы клетки по предотвращению ПОЛ больше, чем по ОМБ [24, 25]. Ввиду этого, значение определения МДА – активного карбонильного производного ПОЛ свидетельствует сразу о трёх событиях в жизнедеятельности клетки: об интенсификации процессов ПОЛ, а значит и ОМБ, а также о протекании карбонильного стресса наряду с усилением свободно-радикального окисления [67, 72].

Закономерным при этом было повышение уровней МДА в подгруппах эритроцитов при развитии анемии. Так, при НМРЛ с сопутствующим анемическим синдромом в этих эритроцитах регистрировали повышение уровней МДА в 3,7 раза по сравнению с контролем. В то время как на до анемическом этапе было выявлено повышение МДА в группе НМРЛ в 1,8 раза по отношению к контролю.

Корреляции наибольшей силы, выявленные методом дискриминантного анализа. Характеризовали взаимосвязи между уровнями Нб и НТС ($r = 0,95$); ГПО и Нб ($r = 0,76$); ГПО и НТС ($r = 0,73$).

Также отметим сильную связь между уровнями МДА и 2,3-ДФГ ($r = 0,67$).

О возможной взаимосвязи процессов транспорта кислорода и функционального состояния гемоглобина также косвенно свидетельствует наличие связи между активностями АДА и ГПО ($r = 0,63$). Поскольку АДА снижает уровни аденозина, стимулирующего продукцию 2,3-ДФГ, то видится закономерным при повышении уровней последнего наблюдается при снижении активности АДА ($r = - 0,64$). Помимо этого можем понимать, что снижение активности мембраносвязанного фермента – показатель дисархитектоники мембран, который на фоне выраженного угнетения активности ГПО свидетельствует о декомпенсации процессов ПОЛ и свободно-радикального

окисления. Понимая, что при этом реализуются процессы ОМБ, поскольку проявления ПОЛ развиваются вслед за ними, можем думать о формировании порочного круга вследствие подверженности ГПО ОМБ [67, 89]. Косвенно в пользу данного предположения свидетельствует выявленная нами корреляция между нарастанием МДА и 2,3-ДФГ, указанная выше.

Наряду с особенностями активности металлоферментов исследовали содержание железа в образцах КЖК. В тканях аденокарцином желудка и кишечника медианные значения уровней железа составили 65,5 ((Q₁; Q₃), соответственно: 49,0; 152,0) мкг/г. В то же время, в индивидуальном контроле его содержание было 43,5 (26,0; 97,5) мкг/г. При сравнении образцов тканей в каждом отдельном случае со своим индивидуальным контролем (опухоль/нетрансформированная ткань края резекции) уровни железа в тканях опухоли были выше, чем в контрольных тканях в 1,3-1,6 раза ($p = 0,03$). Для других металлов 4 ряда (меди, кобальта, цинка) достоверные различия в тканях отсутствовали, либо отмечалась лишь незначительная тенденция у меди к её повышению. Лишь использование специфического критерия Вилкоксона для сравнения пар взаимосвязанных показателей позволило выявить повышение уровней меди в карциномах ЖКТ (критерий Вилкоксона $W = 2,20$; $p = 0,028$) по сравнению с нетрансформированными тканями края резекции органа.

Для металлов переменной валентности, прежде всего железа и меди, характерно неферментативное взаимодействие с H_2O_2 [2, 334]. Это ведет к формированию самой токсичной АФК – гидроксильного радикала и развитию его эффектов на микроокружение опухоли [2, 5, 75, 77, 83]. Можно предположить, что молекулярными особенностями патогенеза ЭМП опухолей может быть одновременное повышение уровней H_2O_2 и железа, кумуляция их прооксидантных эффектов. Однако в живой клетке железо находится в хелатированном, связанном с белками состоянии. Оставался неясен вопрос о дополнительном источнике железа в опухоли. В настоящее время описан эффект пероксида водорода на гемпротеины, в частности цитохромы дыхательных цепей митохондрий, инициирующий выход из их состава иона железа [85, 87]. В ходе

данного исследования, наряду с изучением содержания металлов в тканях, было проведено сравнительное определение их содержания в эритроцитах периферической крови и в крови, оттекающей от пораженного органа. Лишь для уровней железа эритроцитов выявлены особенности его перераспределения. В эритроцитах периферической крови уровни железа составляли 184,45 (127,20;348,20) мкг/г. В оттекающей от опухоли крови этих же пациентов регистрировали содержание железа на уровне 132,75 (58,10; 239,0), что было достоверно ниже, чем эритроцитах периферического кровотока ($p = 0,005$).

Установлена обратная связь между повышением содержания железа в опухоли и снижением его содержания в эритроцитах крови, оттекающей от пораженного органа ($p = - 0,66$ т.е. отрицательная связь).

Важно отметить, что в тромбоцитах крови содержание металлов переменной валентности не зависело от уровня их циркуляции, не отличалось от его количества в тканях. Следовательно, это также указывает на специфичность потерь железа именно для эритроцитов регионарного кровотока. Свидетельствует о развитии метаболических нарушений, описанных нами выше. Позволяет считать эти нарушения метаболизма специфическими как для патогенеза «синдрома старения» эритроцитов, так и для канцерассоциированной анемии.

Согласно проведенным исследованиям, при распространенном раке в эритроцитах наблюдается усиление прооксидантных процессов. Это ведет к нарастанию уровней метгемоглобина. Известно, что при его деградации возможен выход через эритроцитарную мембрану липофильного гема, также обладающего прооксидантными свойствами. В связи с этим и выявленными особенностями в перераспределении уровней железа, можем предположить, что гем гемоглобина эритроцитов также мог быть дополнительным источником нарастания уровней железа в тканях опухолей.

Таким образом, существенный характер потерь эритроцитами железа, выявленный нами при определении его уровней в эритроцитах, циркулирующих в системе регионарного кровотока, делает его вероятным поставщиком этого металла для растущей опухоли. Учитывая незавершенный характер опухолевого

ангиогенеза, проникновение липофильного гема, формирующегося при деградации мембранносвязанного гемоглобина, он видится нам вероятным источником повышения уровней железа в тканях растущей карциномы.

Также на реальность гипотезы, выдвинутой нами на основании выявленных особенностей патогенеза «синдрома старения» эритроцитов у онкологических больных и вероятность участия в перераспределении железа в тканях, указывает и характер различий в содержании железа в эритроцитах «оттекающей крови» (в 1,6 раза по сравнению с циркулирующими клетками в системном кровотоке этих же пациентов). Поскольку практически во столько же – в 1,4 раза нарастают уровни железа в исследованных нами образцах карцином по сравнению с их индивидуальным контролем – тканями края резекции органа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В диссертационном исследовании проведено сравнительное изучение особенностей активности ферментов метаболизма нуклеозидов и ферментов антиоксидантной системы в опухолях эпителиального гистогенеза различной локализации, реализующих эпителиально-мезенхимальный переход.

В карциномах немелкоклеточного рака легких (НМРЛ), в солидных опухолях желудка и кишечника (КЖК) установлено повышение активности ТФк в среднем в 1,8 раза ($p = 0,002$) и АДА (для НМРЛ в 1,7 раза, для КЖК в 1,9 раза; $p = 0,001$). Помимо повышения «классической» фосфорилазной активности ТФ в тканях опухолей регистрировали повышение и её дезоксирибозилтрансферазной активности (т.н. ТФан) более, чем в 1,5 раза (соответственно, для НМРЛ $p = 0,002$; для КЖК $p = 0,001$). Для активностей АДА и ТФан выявлены корреляционные связи, более выраженная в опухолях по сравнению с контролем ($p = 0,74$ и $p = 0,34$; $p < 0,05$). Следовательно, альтернативный ресинтез нуклеозида дезокситимидина, являющегося субстратом для тимидинкиназы – маркера пролиферации, создает предпосылки для описанной в опухолях активации «запасного пути» синтеза дТМФ. Также были установлены корреляции активности ТФ с уровнями опухолевой экспрессии CD34 (показатель ангиогенеза) (для ТФк коэффициент парной корреляции Кендалла $r = 0,76$; $p < 0,05$). Для уровней ядерной экспрессии Ki-67 и индивидуальных особенностей опухолевой трансферазной активности ТФан также установлена прямая сильная связь ($r = 0,79$; $p < 0,05$). Вследствие установленных корреляций с уровнями ядерной экспрессии Ki-67 и CD34 виды активности ТФ могут стать их перспективным биохимическими показателями. Установлено, что альтернативным тканевым гомогенатам материалом может быть плазма крови, оттекающей от опухоли, богатая тромбоцитами. Для исследований активности, проводимых в периферической крови наиболее информативна плазма, богатая тромбоцитами (ПлБТ), нежели плазма или сыворотка. По сравнению с ними лишь ПлБТ демонстрировала слабые корреляционные связи с тканевыми показателями. Для

ТФк и CD34 коэффициент парной корреляции r Кендалла = 0,36; ранговой корреляции Спирмена ρ = 0,44 ($p < 0,05$). Для ТФан ПлБТ и уровней ядерной экспрессии Ki-67 в опухоли r Кендалла = 0,37; ρ Спирмена = 0,54 ($p < 0,05$).

Опухоли одной локализации и морфологии метаболически неоднородны. По результатам дискриминантного анализа наиболее специфичными отличиями для выделенных кластеров опухолей одной локализации оказались особенности активности СОД, ТФк, ГПО. (Для СОД лямбда Уилкса 0,160, толерантность 0,94, $p < 0,001$. Для ТФк, соответственно, 0,122; 0,91, $p < 0,001$; для ГПО – 0,160; 0,94, $p = 0,030$). Среди опухолей одной локализации, распределённых по результатам кластерного анализа во вторые подгруппы (кластеры), было характерным нарастание опухолевой фосфорилзной активности ТФ в среднем в 2 раза на фоне повышения активности СОД и низкой активности ГПО. Эти метаболические особенности способствовали одновременному повышению продукции как 2-д-D-Риб-1-Ф, так и H_2O_2 , следовательно, кумулированию их эффектов. Установили, что дисбаланс активности ферментов АОС у пациентов данных подгрупп носил, как правило, распространенный характер. Снижение активности ГПО наблюдалось и в нетрансформированных тканях легких, образцах слизистой желудка, кишечника. Также оно было выраженным и в эритроцитах их периферической крови. Важно отметить, что именно в этих подгруппах чаще выявляли морфологические признаки опухолевой агрессии (снижение или утрату экспрессии маркера клеточно-клеточной адгезии, экспрессию мезенхимальных маркеров, активный ангиогенез). Эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) регистрировали преимущественно в опухолях данных подгрупп (кластеров) (соответственно, 100 % образцов опухолей, составлявших 2-ю подгруппу НМРЛ, и 80 % из 2-й подгруппы КЖК). Таким образом, установили патогенетическую взаимосвязь между особенностями прооксидантных процессов, продукцией 2-дезоксид-рибозо-1-фосфата и формированием агрессивных индивидуальных свойств среди опухолей одной морфологии и локализации. Можем считать, что была установлена возможность метаболического стимулирования ЭМП путем одновременного повышения опухолевой продукции 2-д-D-Риб-1-Ф и H_2O_2 ,

способных активировать сигнальные пути, обеспечивающие формирование агрессивных свойств опухоли.

Согласно данным литературы, они способны запускать сигнальные пути, активирующие ангиогенез, меняющие интенсивность пролиферации, стимулирующие миграционную активность клеток, т.ч. за счет экспрессии мезенхимальных маркеров (α -гладкомышечного актина, виментина) (рисунок 1.).

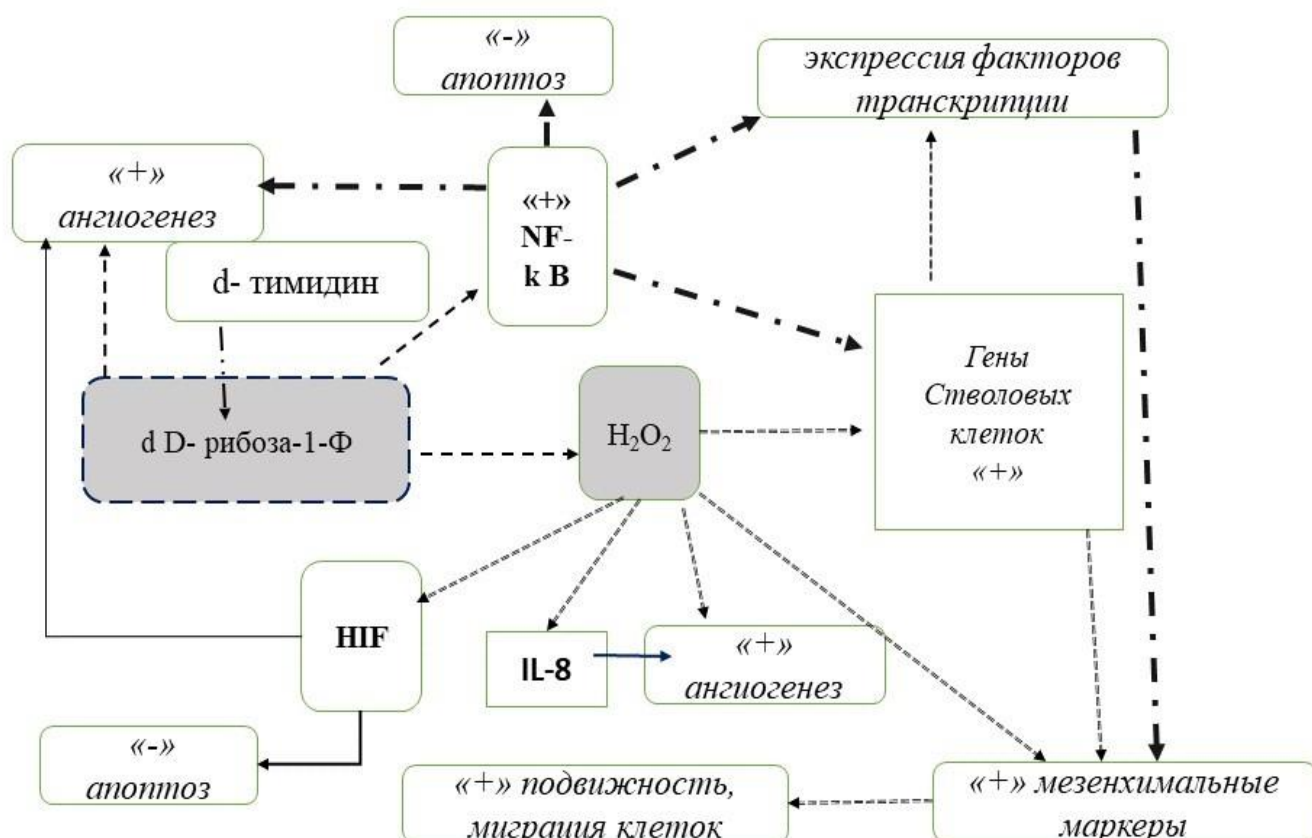


Рисунок 1 – Пероксид водорода и 2-дезоксид-Д-рибозо-1-фосфат как пусковые факторы патогенеза эпителиально-мезенхимального перехода, реализуемого карциномой (частная схема патогенеза)

Примечание: HIF- фактор, индуцируемый гипоксией;

NF-kB – ядерный каппа В фактор.

Сопоставив описанные в литературе свойства, формируемых в опухоли H_2O_2 и 2-д-D-Риб-1-Ф с результатами собственного исследования, составили частную схему патогенеза ЭМП, где постарались учесть возможные взаимосвязи между её компонентами и вероятность, по сути, метаболического стимулирования ЭМП (рисунок 1).

Так, например, оба метаболита активируют ангиогенез, а также стимулируют другие проангиогенные факторы: интерлейкин IL-8, фактор гипоксии, а также мощный активатор ангиогенеза – ядерный фактор NF-kB. В результате сигнал многократно усиливается.

Также, ввиду способности 2-д-D-Риб-1-Ф одновременно активировать формирование пероксида водорода и подавлять синтез глутатиона, необходимого ГПО, создаются условия для формирования порочного круга, избыточной продукции H_2O_2 .

Таким образом, в результате исследования уточнена и расширена концепция патогенеза эпителиально-мезенхимального перехода, путем определения возможности его метаболического стимулирования в опухолях в результате повышения активности металлоферментов обмена нуклеозидов и дисбаланса антиоксидантных ферментов, способствующих одновременному формированию 2-д-D-Риб-1-Ф и H_2O_2 .

Предполагаем, что индивидуальные метаболические особенности карциномы могут непосредственно способствовать активации её сигнальных путей, обеспечивающих формирование агрессивных свойств, в частности, реализации эпителиально-мезенхимального перехода.

Также была установлена связь формирования агрессивного фенотипа рака с развитием дисметаболических процессов в эритроцитах крови. Выявлены нарушения обменных процессов в эритроцитах, способствующие нарушению их газотранспортной функции. Выраженное снижение активности АДА эритроцитов на фоне дисбаланса активности антиоксидантных ферментов сопровождалось повышением уровней МДА и 2,3-дифосфоглицерата, между которыми

установлена положительная связь ($r = 0,67$). Дальнейшее усугубление установленных дисметаболических процессов сопровождалось развитием анемии.

Проведенные исследования указывают на взаимосвязь агрессивного характера протекания опухолевого процесса и нарушения обменных процессов в эритроцитах. Видится возможным дальнейшее исследование метаболических особенностей, являющихся факторами патогенеза анемического синдрома, поиска патогенетически обоснованных способов его профилактики.

ВЫВОДЫ

В диссертационной работе путем экспериментального и теоретического исследования достигнуто новое решение научной проблемы по установлению патогенетической значимости для формирования агрессивных свойств опухоли изменений активности металлоферментов обмена нуклеозидов и ферментов антиоксидантной системы в карциномах различной локализации. Проблема решена путем определения указанных метаболических особенностей при эпителиально-мезенхимальном переходе (ЭМП) карцином. Данный подход помог установить и описать патогенетическую взаимосвязь между особенностями прооксидантных процессов, продукцией 2-дезоксид-рибозо-1-фосфата и формированием индивидуальных агрессивных свойств среди опухолей одной морфологии и локализации.

1. В карциномах немелкоклеточного рака легких (НМРЛ), в солидных опухолях желудка и кишечника (РЖ, РК) выявлено повышение активности металлоферментов обмена нуклеозидов по сравнению с их активностью в нетрансформированных тканях (согласно непараметрическому Т-критерию Вилкоксона; $p < 0,05$). Повышение видов активности ТФ и АДА – универсальное свойство карцином исследованных локализаций.

2. В опухолях выявлена прямая корреляционная связь между фосфорилазной активностью ТФ (ТФк) и индивидуальными уровнями экспрессии CD34 (показателя ангиогенеза) (коэффициент парной корреляции Кендалла $r = 0,76$; $p < 0,05$). Установлена прямая сильная связь уровней ядерной экспрессии Ki-67 и трансферазной активности ТФан ($r = 0,79$; $p < 0,05$), способствующей пролиферации.

3. Выявлена прямая связь видов активности ТФ в опухоли с их активностью в плазме крови, оттекающей от пораженного органа (Пл_{от}) и её тромбоцитах (ПлБТот), а также в богатой тромбоцитами плазме периферической крови (ПлБТ). Для активности ТФан в опухоли и в ПлБТ коэффициент парной корреляции Кендалла $r = 0,42$; $p < 0,05$ (показатель ранговой корреляции Спирмена $\rho = 0,60$; p

$<0,05$). Для ТФк опухоли и её активности в ПЛБТ соответственно: r Кендалла = 0,36 (r Спирмена = 0,50), $p < 0,05$. Наряду с изучением активности ТФ в гомогенатах опухоли, ПЛ_от, ПЛБТот и ПЛБТ также могут служить материалом для исследований.

4. Активность ГПО в опухолях снижалась в среднем в 1,3 раза ($p < 0,03$). В образцах тканей РЖ и РК она была минимальной по сравнению с НМРЛ ($p = 0,002$). Методом кластерного анализа в каждой локализации выявлен кластер, в котором активность СОД в опухолях была выше, чем в контроле. При этом повышения активности ГПО в них не установлено. В кластере карцином желудка и кишечника (КЖК) на фоне максимальной активности СОД (U критерий Манна-Уитни = 21,00, $Z = -2,59$, $p = 0,01$), активность ГПО была минимальной ($U = 14,00$, $Z = -3,05$, $p = 0,002$). Выявлен дисбаланс активности СОД и ГПО для карцином различной локализации.

5. В эритроцитах крови (как и в тканях опухолей) выявлены кластеры, в которых дисбаланс активности ферментов антиоксидантной системы (АОС) был наиболее выражен. Причем эритроциты, выделенные во второй кластер при КЖК, отличались минимальной активностью ГПО, ниже контроля в 4,2 раза, но и в 1,7 раза ниже её активности во втором кластере при НМРЛ ($p = 0,03$). Дисбаланс активности антиоксидантных ферментов может иметь распространенный характер в организме онкологических больных. Для этих кластеров характерно резкое снижение активности АДА, сопряженное со снижением жизнеспособности эритроцитов.

6. Выявленная метаболическая неоднородность опухолей одной локализации и морфологии подтверждена результатами дискриминантного анализа, указавшего на специфичность изменений активности как СОД, ГПО, так и ТФк. (Для СОД λ Уилкса 0,160, толерантность 0,94, $p < 0,001$. Для ТФк, соответственно, 0,122; 0,91, $p < 0,001$; для ГПО – 0,160; 0,94, $p = 0,030$). Этим изменениям метаболизма сопутствовали усиление ангиогенеза, снижение экспрессии эпителиальных и появление экспрессии мезенхимальных маркеров, способствовавшие эпителиально-мезенхимальному переходу. Его регистрировали

преимущественно в опухолях, распределённых во вторые кластеры (подгруппы) (соответственно, 100 % образцов опухолей, составлявших 2-ю подгруппу НМРЛ, и 80 % из 2-й подгруппы КЖК). Их отличало преимущественное нарастание лишь одного вида активности ТФ - фосфорилазной активности (ТФк) (продукция 2-д-D-Риб-1-Ф) и описанный дисбаланс ферментов АОС (повышение H_2O_2), что способствовало кумулированию регуляторных эффектов данных метаболитов.

7. На фоне нарастания фосфорилазной активности ТФ и СОД (формирующих 2-д-D-Риб-1-Ф и пероксид водорода) и низкой активности ГПО в эпителиальных опухолях также обнаружено повышение содержания железа. Его вероятным источником в опухоли может быть гемоглобин эритроцитов, т.к. выявлена отрицательная обратная связь между повышением уровней этого металла в опухоли и его снижением в эритроцитах крови, оттекающей от пораженного органа (r Спирмена = -0,66; $p < 0,05$). Установленное повышение уровней железа в опухоли ведет к неферментативной трансформации H_2O_2 в наиболее токсичный для окружающих тканей гидроксильный радикал.

Выявленные индивидуальные метаболические особенности могут непосредственно способствовать активации сигнальных путей, обеспечивающих формирование агрессивных свойств опухоли и её эпителиально-мезенхимальный переход.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Изучение трансферазной (пропролиферативной) активности ТФан, помимо определяемой традиционно фосфорилазной активности ТФк, оптимизирует клинико-лабораторные исследования ферментативной функции тимидинфосфорилазы у онкологических больных.

2. Для определения активности ТФ при индивидуализации адъювантной химиотерапии препаратами группы 5-фторурацила в качестве материала показано использование ПЛБТот, что позволит сократить время исследования, избежав трудоёмкой процедуры гомогенирования тканей опухоли.

3. Для скрининга рецидива опухоли путем исследования в динамике видов активности ТФ, коррелирующей с показателями пролиферации и ангиогенеза, необходимо использовать богатую тромбоцитами плазму периферической крови.

4. Сочетанное снижение активности ГПО (в 2,5 раза и более) и АДА (в 3 раза и более) в эритроцитах крови сопряжено со снижением их жизнеспособности, может использоваться для определения риска развития анемии у онкологических больных. Эти показатели также целесообразно исследовать для выявления дисбаланса про- и антиоксидантных процессов в организме.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

A ₁ , A _{2A} , A _{2B} , A ₃	Аденозиновые рецепторы А-субтипов
АДА	аденозиндезаминаза
АМФ	аденоизинмонофосфат, пуриновый нуклеотид
АОС	антиоксидантна система
АФК	активные формы кислорода
ГПО	глутатионпероксидаза
КСО	ксантиноксидаза
МДА	малоновый диальдегид
МКО	металлкатализируемое окисление
НАДФН ₂	восстановленная форма никотинамидадениндинуклеотид фосфата – кофермента витамина РР
НМРЛ	немелкоклеточный рак легких
ОМБ	окислительная модификация белков
ПлБТ	богатая тромбоцитами плазма крови
ПлБТот	богатая тромбоцитами плазма крови, оттекающей от опухоли (регионарный кровоток)
ПОЛ	перекисное окисление липидов
РЖ	рак желудка
РК	рак кишечника (колоректальный рак)
РЛ	рак легких
СОД	супероксиддисмутаза
ТФан	трансферазная активность тимидинфосфорилазы
ТФк	фосфорилазная активность тимидинфосфорилазы
ЭМП	эпителиально-мезенхимальный переход
2,3-ДФГ	2,3-дифосфоглицерат
2-д-Д-Риб	2-дезоксид-Д-рибоза

2-д-D-Риб-1-Ф	2-дезоксид-D-рибозо-1-фосфат
AGEs	advanced glycation end-products / конечные продукты неферментативного гликирования
CAFs	tumor associated fibroblasts / фибробласты – клетки стромы
CD ₃₄	маркер эндотелиоцитов
Co ²⁺	катион кобальта
Cu ²⁺	катион меди
CXCL	chemokine (C-X-C motif) ligand / лиганд хемокина (мотив CXC)
dTMP	дезокситимидинмонофосфат, нуклеотид
E	enzyme / фермент
ERK	extracellular signal-regulated kinase / внеклеточной, регулируемая сигналом киназа, чувствительна к H ₂ O ₂
Fe ²⁺	катион железа
H ₂ O ₂	пероксид водорода
HIF-1 α	hypoxia inducible factor 1-alpha / гипоксия индуцируемый фактор 1-альфа
Jak	Janus kinase / Янус киназа – фермент-рецептор
Ki-67	показатель пролиферативной активности
MAPK	mitogen activated protein kinase / митоген активная протеинкиназа
MMP	матриксная металлопротеиназа
NF- κ B	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells / ядерный фактор «каппа-би»
O ₂ ^{•-}	анион супероксида кислорода
OH-	гидроксид-анион
PD-ECGF	platelet-derived endothelial cell growth factor / тромбоцитарный белковый фактор роста эндотелиоцитов

	(тимидинфосфорилаза)
PI3K	phosphoinositide 3-kinase / фосфатидилинозитол-3- киназа
PTEN	протеинфосфатаза – гомолог тензина
PTP1B	протеин-тирозинфосфатаза 1B
PP2	протеинфосфатаза 2
RCS	reactive carbonyl species / реакционноспособные карбонильные соединения
STAT	Signal transducers and activators of transcription / белковый фактор транскрипции
TAMs	tumor associated macrophages / макрофаги, инфильтрирующие опухоль
VEGF	endotelial cells growth factor / васкулоэндотелиальный фактор роста
Zn ²⁺	катион цинка

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Айтбаев, К. А. Молекулярные механизмы старения: роль окислительного стресса и эпигенетических модификаций [Текст] / К. А. Айтбаев, И. Т. Муркамилов, В. В. Фомин // Успехи геронтологии. – 2019. – Т. 32, № 1–2. – С. 20–28.
2. Активные формы кислорода — внутриклеточные сигнальные молекулы [Текст] / Л. Н. Маслов [и др.] // Рос. Физиологический журнал им. И. М. Сеченова. – 2017. – Т. 103, № 10. – С. 1089–1105.
3. Активность и каталитические свойства глутатионпероксидазы при токсическом поражении печени [Текст] / К. К. Шульгин [и др.] // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2020. — Т. 20, № 1. – С. 100–108.
4. Андриевская, И. А. Роль линолевой кислоты в окислительном повреждении гемоглобина при цитомегаловирусной инфекции в период беременности [Текст] / И. А. Андриевская, Н. А. Ишутина // Бюллетень сибирской медицины. – 2019. – Т. 18, № 3. – С. 15–20. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-3-15-20>
5. Аутофагия как механизм защиты при окислительном стрессе / Н. К. Зенков [и др.] // Бюллетень сибирской медицины. – 2019. – Т. 18, № 2. – С. 195–214. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-195-214>
6. Бакурова, Е. М. Нарушения метаболизма предшественников ДНК в слизистой оболочке желудка как показатель вероятного озлокачествления язвы этого органа [Текст] / Е. М. Бакурова, Б. Г. Борзенко // Вопросы онкологии. – 2008. – Т. 54, № 2. – С. 184–187
7. Барсукова, М. А. Исследование модулирующих эффектов микроокружения опухоли на активность ключевых ферментов метаболизма аденозина при аденокарциноме молочной железы [Текст] / М. А. Барсукова, Е. В. Бутенко, Е. В. Хомутов // Архив клинической и экспериментальной медицины. – 2019. – Т. 28, № 3. – С. 261–266.

8. Бельская, Л. В. Система перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты слюны при раке легкого [Текст] / Л. В. Бельская, В. К. Косенок, Ж. Массард // Клиническая лабораторная диагностика. – 2018. – Т. 63, № 9. – С. 530–537. DOI:<http://dx.doi.org/10.18821.0869-2084-2018-63-9-530-537>
9. Варламова, Е. Г. Уникальность природы микроэлемента селена и его ключевые функции [Текст] / Е. Г. Варламова, В. Н. Мальцева // Биофизика. – 2019. – Т. 64, № 4. – С. 646–660.
10. Взаимодействие различных нитрозильных комплексов гемоглобина с активными формами кислорода и азота [Текст] / Д. И. Грачёв [и др.] // Russian Journal of Biological Physics and Chemistry. – 2021. – Vol. 6, N 3. – P. 477–481.
11. Взаимодействие супероксидных радикалов с активными дикарбонильными соединениями [Текст] / К. Б. Шумаев [и др.] // Биофизика. – 2017. – Т. 62, вып. 2. – С. 237–242.
12. Визуальная оценка органного распределения коллоидных микрочастиц железа 12-18 мкм при магнитно-резонансной-томографии у мышей с перевитыми опухолями Льюиса (экспериментальное исследование) [Текст] / С. С. Власов [и др.] // Вестник новых медицинских технологий. – 2019. – Т. 26, № 3. – С. 85–89.
13. Влияние дикарбониллов на кинетические характеристики глутатионпероксидазы [Текст] / В. З. Ланкин [и др.] // Доклады Академии Наук. – 2017. – Т. 475, № 6. – С. 706–709.
14. Влияние комплексов железа с оксидом азота на реакционную способность цистеинов гемоглобина [Текст] / О. В. Космачевская [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. – 2020. – Т. 56, № 5. – С. 436–445.
15. Влияние нанодисперсной меди на характеристики роста опухолей белых нелинейных крыс [Текст] / П. С. Качесова [и др.] // Исследования и практика в медицине. – 2022. – Т. 9, № 3. – С. 67–79.
16. Влияние новых водорастворимых фенольных антиоксидантов на активность nrf2-подконтрольных ферментов, систему глутатиона и транслокацию

nr2 в ядро [Текст] / Е. Б. Меньщикова [и др.] // Сибирский научный медицинский журнал. – 2020. – Т. 40, № 6. – С. 58–69.

17. Влияние супероксид-аниона на тромбоциты и эритроциты периферической крови [Текст] / О. А. Трубачева [и др.] // Тенденции развития науки и образования. – 2020. – № 67-1. – С. 118–121.

18. Волкова, Л. В. Морфологическая характеристика диспластических процессов в слизистой оболочке, прилежащей к опухоли, при раке желудка кишечного типа / Л. В. Волкова, М. С. Шушвал // Клиническая и экспериментальная морфология. – 2021. – Т. 10, № 3. – С. 47–54. DOI: 10.31088/CEM2021.10.3.47-54

19. Глутатион-зависимая система в крови больных раком желудка с разным гистотипом опухоли и распространенностью заболевания [Текст] / И. А. Горошинская [и др.] // Исследования и практика в медицине. – 2021. – Т. 8, № 4. – С. 12–22.

20. Диалог между аутофагией и железом при прогрессии меланомы [Текст] / А. А. Вартанян [и др.] // Российский биотерапевтический журнал. – 2018. – Т. 17, № 3. — С. 29–35.

21. Динамика показателей селена, глутатиона и антиоксидантной защиты крови у больных анемической кардиомиопатией на фоне лечения препаратами железа и селена [Текст] / Е. В. Гончарова [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика. – 2015. – № 2. – С. 23–26.

22. Динитрозильные комплексы железа как ингибиторы перекисного окисления липидов [Текст] / Д. И. Грачев [и др.] // Актуальные вопросы биологической физики и химии. – 2022. – Т. 7, № 4. – С. 600–603.

23. Желябина, О. В. Некоторые потенциальные возможности применения ингибиторов ксантинооксидазы [Текст] / О. В. Желябина, М. С. Елисеев // Современная ревматология. – 2019. – Т. 13, № 1. – С. 114–120.

24. Жерегеля, С. Н. Изменения показателей системы глутатиона в эритроцитах человека при введении рентгеноконтрастных препаратов в диагностических дозах [Текст] / С. Н. Жерегеля, С. И. Глушков, А. И.

Карпищенко // Children's Medicine of the North-West. – 2021. – Т. 9, № 1. – С. 146–147.

25. Защитное влияние пероксиредоксина б на бета-клетки поджелудочной железы RIN-m5F при токсических воздействиях глюкозы и цитокинов [Текст] / Е. Г. Новоселова [и др.] // Биохимия. – 2019. – Т. 84, вып. 6. – С. 819–826.

26. Зуйков, С. А. Влияние цитрата железа на активность ферментов пуринового обмена [Текст] / С. А. Зуйков, Т. С. Одарченко, Е. В. Хомутов // Университетская клиника. – 2022. – № 1 (42). – С. 24–30.

27. Зуйков, С. А. Изменение метаболизма пуринов - как один из факторов риска рака желудка [Текст] / С. А. Зуйков // Новообразование. – 2019. – Т. 11, № 2 (25). – С. 83–87.

28. Зуйков, С. А. Интенсификация пуринового обмена как один из факторов патогенеза рака прямой кишки [Текст] / С. А. Зуйков, Г. Е. Полунин, А. А. Хачатрян // Новообразование. – 2021. – Т. 13, № 4 (35). – С. 173–176.

29. Зуйков, С. А. Исследование возрастных изменений свободнорадикального окисления у больных раком толстой кишки [Текст] / С. А. Зуйков, Г. Е. Полунин // Новообразование. – 2020. – Т. 12, № 4 (31). – С. 174–178.

30. Зуйков, С. А. Особенности метаболизма углеводного и антиоксидантного обменов в опухолевой ткани и сыворотке крови при раке толстой кишки [Текст] / С. А. Зуйков, О. П. Шатова, Г. Е. Полунин // Новообразование. – 2021. – Т. 13, № 1 (32). – С. 18–22.

31. Изменение активности глутатионпероксидазы в плазме и сыворотке крови крыс при постнатальном развитии и старении [Текст] / А. В. Разыграев [и др.] // Успехи геронтологии. – 2019. – Т. 32, № 1–2. – С. 38–44.

32. Изменение системы глутатиона в клетках опухолевой линии P19 при гипоксии [Текст] / Д. С. Орлов [и др.] // Бюллетень сибирской медицины. – 2015. – Т. 14, № 4. – С. 41–45.

33. Изменение уровня ферментов антиоксидантного действия и продуктов липопероксидации у пациентов с механической желтухой в

зависимости от уровня билирубина в крови [Текст] / М. А. Даренская [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика. – 2021. – Т. 66, № 12. – С. 722–727.

34. Изменения метаболизма пуринов при костно-суставной форме рака легкого [Текст] / О. В. Синяченко [и др.] // Травма. – 2019. – Т. 20, № 5. – С. 46–52.

35. Изменения пуринового метаболизма при раке желудка [Текст] / О. В. Синяченко [и др.] // Гастроэнтерология. – 2019. – Т. 53, № 4. – С. 223–229.

36. Инжеваткин, Е. В. Пространственная метаболическая неоднородность солидной карциномы Эрлиха [Текст] / Е. В. Инжеваткин, А. А. Савченко // Доклады Академии Наук. – 2019. – Т. 486, № 5. – С. 626–630.

37. Интенсификация окисления полиеновых липидов и шестиатомных углеводов как ключевой фактор запуска молекулярных механизмов атерогенеза и дисфункции сосудистого эндотелия [Текст] / В. З. Ланкин [и др.] // Кардиологический вестник. – 2022. – Спецвыпуск. – С. 48–49.

38. Использование нефиксированных срезов опухолевых тканей в качестве релевантной модели *ex vivo* для оценки воздействия метформина на метаболизм аденозина [Текст] / М. А. Барсукова [и др.] // Новообразование. – 2022. – Т. 14, № 3 (38). – С. 135–140.

39. Исследование методом молекулярной динамики тимидинфосфорилазы из *E. Coli* В апо-ферменте и в комплексах с субстратами [Текст] / Д. Д. Сидоров-Бирюков [и др.] // Кристаллография. – 2019. – Т. 64, № 1. – С. 99–105.

40. Исследование особенностей строения центральных и периферических отделов карцином желудка [Электронный ресурс] / М. С. Шушвал [и др.] // Вестник новых медицинских технологий. Электронное периодическое издание. – 2020. – № 4. – Публ. 1-2. – Режим доступа: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2020-4/1-2.pdf> DOI: 10.24411/2075-4094-2020-16660

41. Капустин, Р. В. Оксидативный стресс у беременных с сахарным диабетом [Текст] / Р. В. Капустин, О. Н. Аржанова, А. В. Тиселько // Сахарный диабет. — 2017. — Т. 20. — №6. — С. 461-471. doi: 10.14341/DM8669

42. Ковганко, Н. Н. Ингибиторы ксантиноксидазы на основе замещенных 2-изоксазолинов [Текст] / Н. Н. Ковганко, В. Н. Ковганко, Т. Ю. Принькова // Актуальные проблемы биохимии : сборник материалов научно-практической конференции с международным участием / отв. ред.: В. В. Лелевич [и др.]. — Гродно, 2021. — С. 136–138.

43. Коррекция нарушений окислительного стресса у больных колоректальным раком с метастатическим поражением печени в раннем послеоперационном периоде [Текст] / М. М. Добровольская [и др.] // Материалы Первого Международного Форума онкологии и радиологии, Москва, 23–27 сентября 2019 г. — Москва, 2019. — С. 106.

44. Космачевская, О. В. Альтернативные и дополнительные функции эритроцитарного гемоглобина [Текст] / О. В. Космачевская, А. Ф. Топунов // Биохимия. — 2019. — Т. 84, вып. 1. — С. 3–23.

45. Крылова, К. Д. Анализ совместной биологической активности селеноорганического соединения 1,5-ди-(п-хлорфенил)-3-селенапентандион-1,5 и наночастиц железа [Текст] / К. Д. Крылова // Бюллетень медицинских интернет-конференций. — 2021. — Т. 11, № 7. — С. 161.

46. Ксантиноксидоредуктаза [Текст] / С. А. Бедина [и др.] // Актуальные проблемы современной ревматологии. — Москва, 2018. — С. 62–68.

47. Курамшина, Г. Р. Система глутатиона в костной ткани при действии компонентов медно-цинковой руды и введении антиоксидантов [Текст] / Г. Р. Курамшина, Ф. Х. Камилов // Казанский медицинский журнал. — 2021. — Т. 102, № 2. — С. 199–205.

48. Ланкин, В. З. Гипоосмотический гемолиз эритроцитов активными формами карбониллов [Текст] / В. З. Ланкин, Е. М. Белова, А. К. Тихазе // Биофизика. — 2017. — Т. 62, вып. 2. — С. 325–329.

49. Меньщикова, Е. Б. Активация аутофагии и Nrf2-зависимого сигнального пути в клетках аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 новыми монофенольными антиоксидантами [Текст] / Е. Б. Меньщикова // Цитология. - 2018. - Т. 60, № 12. - С. 1008–1015.
50. Метилглиоксаль как ловушка супероксидного анион-радикала [Текст] / К. Б. Шумаев [и др.] // Доклады Академии Наук. - 2016. - Т. 469, № 5. - С. 638–641.
51. Миронова, К. А. Особенности активности ферментов обмена глюкозы и аденозина в клетках крови у больных раком легких, желудка и кишечника : Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 14.03.03 / К. А. Миронова. - Д., 2021. - с. 27.
52. Митохондрии как источники супероксидного анион-радикала в тромбоцитах [Текст] / А. А. Джатдоева [и др.] // Биологические мембраны. - 2017. - Т. 34, № 6. - С. 116–123.
53. Молекулярные и клеточные основы метаболизма железа у человека [Текст] / И. В. Мильто [и др.] // Биохимия. - 2016. - Т. 81, № 6. - С. 725–742.
54. Наумова, Л. А. Анализ среднего объема тромбоцитов при неопухолевого патологии и раке шейки матки, ассоциированных с системной дисплазией соединительной ткани [Текст] / Л. А. Наумова // Вестник СурГУ. Медицина. - 2021. - № 4 (50). - С. 88–93.
55. Наумова, Л. А. Кистогенез. Клеточно-молекулярные механизмы патологии и морфогенеза [Текст] / Л. А. Наумова // Вестник СурГУ. Медицина. - 2020. - № 1 (43). - С. 59–65.
56. Наумова, Л. А. Современный взгляд на концепцию полевой канцеризации [Текст] / Л. А. Наумова // Вестник СурГУ. Медицина. - 2021. - № 2 (48). - С. 61–70.
57. Оксоферрильные формы миоглобина и гемоглобина в присутствии фенолсодержащих соединений катализируют окислительную трансформацию тиамина и его производных [Текст] / С. А. Лабор [и др.] // Вес. Нац. акад. Навук Беларусі. Сер. біял. навук. - 2017. - № 2. - С. 55–65.

58. Окислительный стресс в патогенезе сахарного диабета 1 типа: роль ксантиноксидазы адипоцитов [Текст] / В. В. Иванов [и др.] // Бюллетень сибирской медицины. – 2017. – Т. 16, № 4. – С. 134–143.
59. Орешко, Л. С. Состояние тиолдисульфидной системы как критерий эффективности патогенетической терапии у больных целиакией [Текст] / Л. С. Орешко, Е. А. Семенова, А. А. Карпов // Фарматека. – 2018. – Вып. 13. – С. 63–69. DOI: <https://dx.doi.org/10.18565/pharmateca.2018.13.63-69>
60. Особенности влияния облученных костномозговых мезенхимных стромальных клеток на продукцию макрофагами цитокинов и активных форм кислорода [Текст] / Е. В. Агаева [и др.] // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2019. – Т. 59, № 4. – С. 377–387.
61. Особенности процессов липопероксидации и активности ферментов системы антиоксидантной защиты в скрининговой диагностике раннего рака желудка патологии [Текст] / О. В. Смирнова [и др.] // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. – 2020. – Т. 19, № 4. – С. 87–92.
62. Особенности редокс-статуса периферического звена эритрона при различных локализациях неоплазмы органов женской репродуктивной сферы [Текст] / Т. П. Генинг [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика. – 2017. – Т. 62, № 8. – С. 468–472. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-8-468-472>
63. Опухолевое микроокружение в основных гистологических типах рака желудка [Текст] / И. В. Василенко [и др.] // Клиническая и экспериментальная морфология. – 2015. – № 4 (16). – С. 9–14.
64. Оценка окислительного стресса при коронарном шунтировании у лиц с различной степенью интраоперационного гемолиза [Текст] / Е. Н. Максимович [и др.] // Кардиология Беларуси. – 2019. – Т. 11, № 3. – С. 418–429.
65. Особенности фибробластов стромы и их связь с инвазивностью и эпителиально-мезенхимальной трансформацией основных гистологических типов рака [Текст] / И. В. Василенко [и др.] // Профилактическая и клиническая медицина. – 2015. – № 4 (57). – С. 57–61. Т. 59, № 8. – С. 47–53.

66. Особенности активности ферментов обмена нуклеозидов и антиоксидантной системы в солидных опухолях [Текст] / Е. М. Бакурова [и др.] // Рос. Биотерапевтич. журн. – 2022. – Т. 21, № 2. – С. 73–81.
67. Пат. 2020102750 Российская Федерация, МПК G01N 33/49. Способ оценки эффективности лекарственной терапии ишемической болезни сердца по показателям карбонил-зависимой модификации эритроцитарной супероксиддисмутаза [Текст] / Тихазе А. К., Косач В. Я., Ланкин В. З., Коновалова Г. Г., Панферова А. А, Смирнова М. Д.; заявитель и патентообладатель Национальный Медицинский исследовательский центр кардиологии МЗ РФ. – № 2728784; заявл. 23.01.2020; опубл. 31.07.2020, Бюл. № 22.
68. Перспективы использования элементного статуса крови для оценки молекулярно-генетического профиля глиом [Текст] / Л. М. Обухова [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика. – 2022. – Т. 67, № 9. – С. 497–503.
69. Повышение активности ферментов катаболизма пуринов как один из факторов патогенеза злокачественных новообразований [Текст] / С. А. Зуйков [и др.] // Новообразование. – 2021. – Т. 13, № 2 (33). – С. 86–90.
70. Показатели окислительного метаболизма в крови больных с разным гистотипом опухолей поджелудочной железы [Текст] / И. А. Горошинская [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2020. – № 2. – С. 89.
71. Преимущество применения комплексной терапии диабетической полиневропатии у пациентов с сахарным диабетом типа 2 [Текст] / А. С. Аметов [и др.] // Эндокринология: новости, мнения, обучение. – 2019. – Т. 8, № 3. – С. 8–21. doi: 10.24411/2304-9529-2019-13001
72. Природные дикарбонилы ингибируют пероксидазную активность пероксиредоксинов [Текст] / В. З. Ланкин [и др.] // Доклады Академии Наук. – 2019. – Т. 485, № 3. – С. 377–380.
73. Процедуры гипоксического кондиционирования не приводят к чрезмерной активации оксидативного стресса у практически здоровых

обследуемых [Текст] / С. Ю. Крыжановская [и др.] // Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова. – 2019. – Т. 105, № 1. – С. 89–99.

74. Реакция эритрона как прогностический критерий агрессивного фенотипа опухоли у больных раком легкого [Текст] / О. С. Измestьева [и др.] // Материалы Первого Международного Форума онкологии и радиологии, Москва, 23–27 сентября 2019 г. – Москва, 2019. – С. 127.

75. Реперфузионное повреждение сердца. Основные звенья патогенеза [Текст] / Л. Н. Маслов [и др.] // Рос. физиологический журнал им. И. М. Сеченов. – 2018. – Т. 104, № 8. – С. 881–903.

76. Роль активных форм кислорода в дегрануляции тучных клеток [Текст] / М.А. Челомбитко [и др.] // Биохимия. – 2017. – Т. 82, вып. 1. – С. 19–34.

77. Роль активных форм кислорода в механизме развития повреждения сердца и желудка при стрессе [Текст] / Е. С. Прокудина [и др.] // Рос. физиологический журнал им. И. М. Сеченов. – 2018. – Т. 104, № 1. – С. 3–17.

78. Роль глутатионпероксидаз и пероксиредоксинов при свободнорадикальных патологиях [Текст] / М. Г. Шарапов [и др.] // Биохимия. – 2021. – Т. 86. № 11. С. 1635-1653.

79. Роль редокс-статуса и окислительной модификации белков в реализации апоптоза лимфоцитов крови человека в норме и при экспериментальном окислительном стрессе [Текст] / О. Л. Носарева [и др.] // Рос. физиологический журнал им. И. М. Сеченова. – 2019. – Т. 105, № 3. – С. 327–338. DOI: 10.1134/S0869813919030063

80. Румянцев, Е. К. Связь глутатион пероксидазы с раком легкого в азиатских популяциях [Текст] / Е. К. Румянцев, В. М. Николаев, Е. Д. Охлопкова // Естественные и технические науки. – 2021. – № 11 (162). – С. 123–126.

81. Свойства и функции белка TP/PD-ECGF – фермента и фактора ангиогенеза в норме и при неопластической патологии [Текст] / Б. Г. Борзенко [и др.] // Вопросы онкологии. – 2021. – Т. 67, № 6. – С. 746–754.

82. Смертность от злокачественных новообразований работающих, занятых в комплексной переработке отходов металлургии меди [Текст] / В. И. Адриановский [и др.] // Гигиена и санитария. – 2020. – Т. 99, № 1. – С. 32–36.
83. Содержание железа и пролиферация клеток в тимусе и селезенке мышей при росте гепатомы 22А [Текст] / Е. А. Зеленский [и др.] // Цитология. – 2021. – Т. 63, № 2. – С. 116–126.
84. Состояние антиоксидантной системы в митохондриях клеток кожи при росте экспериментальной меланомы v16/f10 на фоне хронической нейрогенной боли [Текст] / Е. М. Франциянц [и др.] // Бюллетень сибирской медицины. – 2020. – Т. 19, № 2. – С. 96–103.
85. Состояние окислительного метаболизма в крови больных раком желудка с разным гистотипом опухоли [Текст] / И. А. Горошинская [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2019. – № 1. – С. 3.
86. Структурные изменения в регрессирующей опухоли лимфосаркомы плисса после экспериментального воздействия наночастицами меди [Текст] / П. С. Качесова [и др.] // Вопросы онкологии. – 2022. – Т. 68, № S3. – С. 70–71.
87. Стуклов, Н. И. Анемия и дефицит железа. глобальные проблемы и алгоритмы решений [Текст] / Н. И. Стуклов, А. А. Митченкова // Терапия. – 2018. – № 6 (24). – С. 147–156. Doi: <https://dx.doi.org/10.18565/>
88. Участие редокс-белков в блокировании пролиферации клеток эпителия молочной железы в условиях окислительного стресса [Текст] / Е. В. Шахристова [и др.] // Вестник РАМН. – 2018. – Т. 73, № 5. – С. 289–293. doi: 10.15690/vramn1030
89. Участие SH-групп в регуляции Ca^{2+} -зависимой калиевой проницаемости мембраны эритроцитов при сердечно-сосудистой патологии [Текст] / И. В. Петрова [и др.] // Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова. – 2018. – Т. 104, № 7. – С. 827–834.
90. Физико-химические и биологические свойства ассоциатов наночастиц меди [Текст] / В. Б. Бородулин [и др.] // Российские нанотехнологии. – 2019. – Т. 14, № 1-2. – С. 76–84.

91. Характеристика процессов липопероксидации и факторов системы антиоксидантной защиты при хроническом атрофическом гастрите и раке желудка [Текст] / О. В. Смирнова [и др.] // Бюллетень сибирской медицины. – 2021. – Т. 20, № 4. – С. 63-70.
92. Цитотоксичность малонового диальдегида и цитопротекторные эффекты таурина влияют на уровень окислительного стресса и сигнальный путь PCG-1 α в клетках C2C121 [Текст] / J.-G. Cai [и др.] // Молекулярная биология. – 2018. – Т. 52, № 4. – С. 616–627.
93. Цымбал, С. А. Супрессор опухолей p53 и метаболизм меди: малоизвестная, но важная связь [Текст] / С. А. Цымбал, А. Г. Рефельд, О. А. Кучур // Молекулярная биология. – 2022. – Т. 56, № 6. – С. 1057–1071.
94. Шарапов, М. Г. Каталитическая и сигнально-регуляторная роль пероксиредоксинов в канцерогенезе [Текст] / М. Г. Шарапов, В. И. Новоселов // Биохимия. – 2019. – Т. 84, вып. 2. – С. 147–171.
95. Шарыгин, В. Л. ЭПР-спектроскопия при системном анализе радиочувствительности/радиорезистентности организма. Опыт и тенденции [Текст] / В. Л. Шарыгин // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2018. – Т. 58, № 5. – С. 463–476.
96. 8-Chloro-Adenosine Inhibits Proliferation of MDA-MB-231 and SK-BR-3Breast Cancer Cells by Regulating ADAR1/p53 Signaling Pathway [Electronic resource] / H. Y. Ding [et al.] // Cell Transplant. – 2020. – Vol. 29. – P. 963689720958656. doi: 10.1177/0963689720958656
97. A novel strategy for treatment of cancer cachexia targeting xanthine oxidase in the brain [Text] / M. Uzu [et al.] // J. Pharmacol. Sci. – 2019. – Vol. 140, N 1. – P. 109–112. doi: 10.1016/j.jphs.2019.04.005
98. A novel strategy for treatment of cancer cachexia targeting xanthine oxidase in the brain [Text] / M. Uzu [et al.] // J. Pharmacol. Sci. – 2019. – Vol. 140, N 1. – P. 109–112. doi: 10.1016/j.jphs.2019.04.005.

99. A pilot assessment of xanthine oxidase activity in plasma from patients with hematological malignancies using a highly sensitive assay [Text] / N. Hokama [et al.] // *Hematol Oncol.* – 2019. – Vol. 37, N 4. – P. 527–530. doi: 10.1002/hon.2659
100. A small molecule G6PD inhibitor reveals immune dependence on pentose phosphate pathway [Text] / J.M. Ghergurovich [et.al.] // *Nat Chem Biol.* – 2020. – Vol. 16, N 7. – P. - 731-739. doi:10.1038/s41589-020-0533-x
101. A trade off between catalytic activity and protein stability determines the clinical manifestations of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency [Text] / U. Boonyuen [et.al.] // *Int J Biol Macromol.* – 2017. - Vol. 104 (Pt A). - P. 145 -156. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.06.002
102. Aberrant ROS mediate cell cycle and motility in colorectal cancer cells through an oncogenic CXCL14 signaling pathway [Electronic resource] / J. Zeng [et al.] // *Front. in Pharmacol.* – 2021. – Vol.12. – P. 764015. Doi: 10.3389/fphar.2021.764015
103. ADA activity is decreased in lymphocytes from patients with advanced stage of lung cancer [Electronic resource]/ D. Zanini [et.al.] // *Medical Oncology.* – 2019. – Vol. 36, N 9. – P. 78 - 85. doi: 10.1007/s12032-019-1301-1
104. ADAR1 is a new target of METTL3 and plays a pro-oncogenic role in glioblastoma by an editing-independent mechanism [Electronic resource] / V. Tassinari [et al.] // *Genome Biol.* – 2021. – Vol. 22, N 1. – P. 51. doi: 10.1186/s13059-021-02271-9
105. ADAR1 masks the cancer immunotherapeutic promise of ZBP1-driven necroptosis [Text] / T. Zhang [et al.] // *Nature.* – 2022. – Vol. 606, N 7914. – P. 594–602. doi: 10.1038/s41586-022-04753-7
106. ADAR1 restricts ZBP1-mediated immune response and PANoptosis to promote tumorigenesis [Electronic resource] / R. Karki [et al.] // *Cell Rep.* – 2021. – Vol. 37, N 3. – P. 109858. doi: 10.1016/j.celrep.2021.109858
107. ADAR1 RNA editing enzyme regulates R-loop formation and genome stability at telomeres in cancer cells [Text] / Y. Shiromoto [et al.] // *Nat. Commun.* – 2021. – Vol. 12, N 1. – P. 1654 - 1667. doi:10.1038/s41467-021-21921-x

108. Activity of thymidilate "salvage pathway" enzymes in human gastric cancer and blood serum: correlation with treatment modalities [Text] / B. G. Borzenko [et al.] // *Experimental Oncology* – 2013. – Vol. 35, №1. – P. 37–40.

109. ADAR1 suppresses interferon signaling in gastric cancer cells by MicroRNA-302a-Mediated IRF9/STAT1 regulation [Electronic resource]/ L. Jiang [et.al.] // *Int J Mol Sci.* – 2020. – Vol. 21, N17. – P.6195. doi:10.3390/ijms21176195

110. ADAR1-Mediated RNA Editing and Its Role in Cancer [Electronic resource]/ J. Liu [et al.] // *Front Cell Dev Biol.* – 2022. –N 10. – P. 956649. doi:10.3389/fcell.2022.956649

111. ADAR1-mediated RNA editing links ganglioside catabolism to glioblastoma stem cell maintenance [Electronic resource] / L. Jiang [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2022. – Vol. 132, N 6. – e143397. doi: 10.1172/JCI143397

112. Adenosine Deaminase 1 Overexpression Enhances the Antitumor Efficacy of Chimeric Antigen Receptor-Engineered T Cells [Text] / Y. Qu [et al.] // *Hum. Gene Ther.* – 2022. – Vol. 33, N 5-6. – P. 223–236. doi: 10.1089/hum.2021.050

113. Adenosine deaminase 2 activity negatively correlates with age during childhood [Electronic resource] / S. M. Bowers [et al] // *Pediatric Rheumatology.* – 2020. – Vol. 54. – N 18. <https://doi.org/10.1186/s12969-020-00446-5>.

114. Adenosine deaminase 2 activity negatively correlates with age during childhood [Text] / S. M. Bowers [et.al.] // *Pediatr Rheumatol Online J.* – 2020. - Vol. 18 N 1.– P. 54 - 67. doi:10.1186/s12969-020- 00446-5

115. Adenosine deaminase activity in pig saliva: analytical validation of two spectrophotometric assays [Text] / F. Tecles [et.al.] // *J. Vet. Diagn. Invest.* – 2018. – Vol. 30, N 1. – P. 175 - 179. doi:10.1177/1040638717742947

116. Adenosine Deaminase as a Biomarker of Tenofovir Mediated Inflammation in Naïve HIV Patients [Text] / F. M. Conesa-Buendía [et.al.] // *Int J Mol Sci.* – 2020. – Vol. 21, N 10. – P. 3590 - 3600. doi:10.3390/ijms21103590

117. Adenosine Deaminase in Pleural Effusion and Its Relationship with Clinical Parameters in Patients with Malignant Pleural Mesothelioma [Text] / Y. Nakajima [et

al.] // *Cancer Invest.* – 2020. – Vol. 38, N 6. – P. 356–364. doi:10.1080/07357907.2020.1776313

118. Adenosine deaminase inhibition suppresses progression of 4T1 murine breast cancer by adenosine receptor dependent mechanisms. [Text] / B. Kutryb-Zajac [et al] // *Journal Cell Mol Med.* – 2018. – N 22. – P. 5939 – 5954. doi: 10.1111/jcmm.13864.

119. Adenosine deaminase activity in erythrocytes and leukocytes is normal even in cases of neoplastic pathology [Text] / E. M. Bakurova [et al] // *Acta Biochimika Polonica.* – 2011. – Vol. 58, Suppl. 1 (Abstracts VIII Parnas Conference, 27-31 August 2011, Warsaw, Poland). – P. 66.

120. Adenosine deaminase-1 enhances germinal center formation and functional antibody responses to HIV-1 Envelope DNA and protein vaccines [Text] / E. Gary [et.al.] // *Vaccine.* – 2020. – Vol. 8; 38, N 22. – P. 3821-3831. doi: 10.1016/j.vaccine.2020.03.047.

121. Adenosine deaminase-2–induced hyperpermeability in human retinal vascular endothelial cells is suppressed by microRNA-146b-3p. [Text] / Y. A. Samra [et al] // *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* – 2017. – Vol. 58. - N 2. – P. 933 – 943.

122. Adenosine Metabolism in COPD: A Study on Adenosine Levels, 5'-Nucleotidase, Adenosine Deaminase and Its Isoenzymes Activity in Serum, Lymphocytes and Erythrocytes [Text] / B. Singh Patidar [et.al.] // *COPD.* – 2018. – Vol. 15, N 6. – P. 559-571. doi: 10.1080/15412555.2018.1537365.

123. Adenosine metabolism in the cerebral cortex from several mice models during aging [Text] / A. Sánchez-Melgar [et.al.] // *Int J Mol Sci.* – 2020. – Vol. 21, N 19. – P. 7290- 7300. doi:10.3390/ijms21197300

124. Adenosine signaling and adenosine deaminase regulation of immune responses: impact on the immunopathogenesis of HIV infection [Text] / D. F. Passos [et.al.] // *Purinergic Signal.* – 2018. – Vol. 14, N 4.– P. 309-320. doi:10.1007/s11302-018-9619-2

125. Adenosine Signaling in the Tumor Microenvironment [Text] / L. Antonioli [et al.] // Adv. Exp. Med. Biol. – 2021. – Vol. 1270 – P. 145–167. doi: 10.1007/978-3-030-47189-7_9
126. Adenosine: The common target between cancer immunotherapy and glaucoma in the eye [Electronic resource]/ S. Hallaj [et.al.] // Life Sci. – 2021. – Vol. 1; N 282. – P. 119796. doi: 10.1016/j.lfs.2021.119796.
127. Adenosine-Deaminase-Acting-on-RNA-1 Facilitates T-cell Migration toward HumanMelanoma Cells [Text] / N. Margolis [et al.] // Cancer Immunol. Res. – 2022. –Vol. 10, N 9. – P. 1127–1140. doi:10.1158/2326-6066.CIR-21-0643
128. Adenosine-Metabolizing Enzymes, Adenosine Kinase and Adenosine Deaminase, in Cancer [Text] / G. Zhulai [et al.] // Biomolecules. – 2022. – Vol. 12, N 3. – P. 418 - 425. doi: 10.3390/biom12030418
129. Advanced glycation end products promote triple negative breast cancer cells via ERK and NF- κ B pathway [Text] / Lee K. J [et al.] // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2017. – Vol. 495, N 3. – P. 2195 – 2201. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.11.182
130. AGER promotes proliferation and migration in cervical cancer [Electronic resource] / Zhu X [et al.] // Biosci. Rep. – 2018. - pii: BSR20171329. doi: 10.1042/BSR20171329. [Epub ahead of print]
131. Ahmad S. Mercury chloride toxicity in human erythrocytes: enhanced generation of ROS and RNS, hemoglobin oxidation, impaired antioxidant power, and inhibition of plasma membrane redox system [Text] / S. Ahmad, R. Mahmood // Environ Sci Pollut Res Int. – 2019. Vol. 26, N 6.- P. 5645 - 5657. doi: 10.1007/s11356-018- 04062-5.
132. An ADAR1-dependent RNA editing event in the cyclin-dependent kinase CDK13promotes thyroid cancer hallmarks [Text] / J. Ramírez-Moya [et al.] // Mol. Cancer. – 2021. – Vol. 20, N 1. – P. 115 - 125.doi:10.1186/s12943-021-01401-y
133. An Overview on Antioxidants. [Text] / V. V. Nimbalkar [et al.] // IJARST. – 2022. – Vol. 2, N 1. – P. 1022 – 1029.

134. Anderson, R.G. Mitochondria in cancer metabolism, an organelle whose time has come? [Текст] / R. G Anderson, L. P Ghiraldella, T. S Pardee // *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. – 2018. - Vol. 1870, N 1. – P. 96 – 102. doi:10.1016/j.bbcan.2018.05.005.
135. Anticancer Properties of Pyrazole Derivatives Acting through Xanthine Oxidase Inhibition [Electronic resource] / A. Alsayari [et al.] // *J. Oncol.* – 2021. – Vol. 5, N 2021. – P. 5691982. doi: 10.1155/2021/5691982
136. Anti-inflammatory and anti-platelet properties of lipid bioactives from apple cider by-products [Text] / A. Tsoupras [et.al.] // *Molecules*. – 2021.– Vol. 26, N 10. – P. 28 - 69. doi: 10.3390/molecules26102869.
137. Antitumor effect of copper nanoparticles on human breast and colon malignancies [Text] / M. Al-Zharani [et al.] // *Environ SciPollut Res Int*. – 2021. – Vol. 28, N 2. – P. 1587–1595. DOI: 10.1007/s11356-020-09843-5
138. Antitumor effect of copper nanoparticles on human breast and colon malignancies [Text] / M. Al-Zharani [et al.] // *Environ Sci Pollut Res Int*. – 2021. – Vol. 28, N 2. – P. 1587–1595.
139. Association of Reactive Oxygen Species Levels and Radioresistance in Cancer Stem Cells [Text] / Diehn M. [et al.] // *Nature*. - 2009. - Vol. 7239, N 458. – P. 780 – 783. doi:10.1038/nature07733.
140. Astragalus polysaccharide inhibits autophagy and regulates expression of autophagy-related proteins in lung cancer A549 cells induced by xanthine oxidase [Text] / X. Wang [et al.] // *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*. – 2019. – Vol. 35, N 7. – P. 619–624.
141. Asymmetric dimerization of adenosine deaminase acting on RNA facilitates substrate recognition [Text] / A. S. Thuy-Boun [et.al.] // *Nucleic Acids Res*. – 2020. – Vol. 48, N 14. – P.- 7958-7972. doi:10.1093/nar/gkaa532
142. Author Correction: Identification of ADAR1 adenosinedeaminase dependency in a subset of cancer cells [Electronic resource] / H. S. Gannon [et al.] // *Nat. Commun*. – 2022. – Vol. 13, N 1. – P. 1894 - 1902. doi: 10.1038/s41467-022-29467-2

143. Aziz, N. Biochemistry, Xanthine Oxidase. 2022 Jul 26 [Electronic resource]] / N. Aziz, R. T. Jamil // StatPearls. – Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2022. PMID: 31424829
144. Bajaj, S. Synthesis, thymidine phosphorylase inhibitory and computational study of novel 1,3,4-oxadiazole-2-thione derivatives as potential anticancer agents [Text] / S. Bajaj, P. P. Roy, J. Singh // Comput. Biol. Chem. – 2018. – Vol. 76. – P. 151–160. doi: 10.1016/j.compbiolchem.2018.05.013
145. Baker, A. R. ADAR1 and its implications in cancer development and Treatment [Text] / A. R. Baker, F. J. Slack // Trends Genet. – 2022. – Vol. 38, N 8. – P. 821–830. doi: 10.1016/j.tig.2022.03.013
146. Bakurova, E. M. Disorders of purines and pyrimidines metabolism in human gastrointestinal tract cancer [Текст] / E. M. Bakurova, K. A. Mironova, B. G. Borzenko // Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences – 2013. – Vol. 26, № 4. – P. 369 – 371. DOI: 10.12923/j.2084-980X/26.4/a.02
147. Bax, B. E. Erythrocytes as carriers of therapeutic enzymes [Text] / B. E. Bax // Pharmaceutics. – 2020. – Vol. 12, N 5. – P. 422 – 435. doi:10.3390/pharmaceutics12050435
148. Bermejo, R. P. The Importance of NADPH Oxidases and Redox Signaling in Angiogenesis [Electronic resource] / R. P. Bermejo, A. H. Hernández // Antioxidants – 2017. – Vol. 32, N 6. doi:10.3390/antiox6020032.
149. Bijnsdorp, I. V. Protective autophagy by thymidine causes resistance to rapamycin in colorectal cancer cells in vitro [Text] / I. V. Bijnsdorp, G. J. Peters // Cancer Drug Resist. – 2021. – Vol. 4, N 3. – P. 719–727. doi: 10.20517/cdr.2021.21
150. Biochemical characterization of adenosine deaminase (CD26; EC 3.5.4.4) activity in human lymphocyte-rich peripheral blood mononuclear cells [Electronic resource] / L. R. Costa [et al.] // Brazilian Journal of Medical and Biological Research. – 2021. – Vol. 54, N 8. e10850. <https://doi.org/10.1590/1414-431X2020e10850>.
151. Blockade of 6-phosphogluconate dehydrogenase generates CD8⁺ effector T cells with enhanced anti-tumor function [Electronic resource] / S. Daneshmandi [et al.] // Cell Rep. – 2021. – V. 9;34(10). – P. 108831. doi: 10.1016/j.celrep.2021.108831.

152. Blockhuys, S. Single-cell tracking demonstrates copper chaperone Atox1 to be required for breast cancer cell migration [Text] / S. Blockhuys, X. Zhanga, P. Wittung-Stafshede // PNAS. – 2020. - Vol. 117, N 4. – P. 2014 – 2019.
153. Blocking antibodies targeting the CD39/CD73 immunosuppressive pathway unleash immune responses in combination cancer therapies [Text] / I. Perrot [et.al.] // Cell Rep. – 2019. – Vol. 27, N 8.– P. 2411- 2425.e9. doi: 10.1016/j.celrep.2019.04.091.
154. Blood Copper Levels and the Occurrence of Colorectal Cancer in Poland [Electronic resource] / P. Baszuk [et al.] // Biomedicines. – 2021. - N 9. – P. 1628. [https:// doi.org/10.3390/ biomedicines9111628](https://doi.org/10.3390/biomedicines9111628).
155. Blood pressure and risk of cancer in the European Prospective Investigation into cancer and nutrition [Text] / S. Christakoudi [et.al.] // Int J Cancer. – 2020. – Vol. 146, N 10. – P. 2680 - 2693. doi:10.1002/ijc.32576
156. Borzenko B. G. Age-Specific Features of the Enzymatic Proliferation Markers upon the Cancer of Different Localisations [Electronic resource]/ B. G. Borzenko [et al.] //Highlights on Medicine and Medical Research – 2021. – Vol. 10 – P. 61 - 71. doi: 10.9734/bpi/hmmr/v10/7417D.
157. Borzenko, B. G. A Double-Function of PD-ECGF/TP Protein that Predict Response to Target Chemotherapy [Electronic resource] /B. G. Borzenko, E. M. Bakurova, K. A. Mironova // Metabolomics. –2015.- Vol. 5, № 2: e136. doi: 10.4172/2153-0769.1000e136
158. Bakurova, E. M. An increase of tissues iron levels as a possible factor of tumor progression [Text] / E. M. Bakurova // VII Lviv-Lublin conference of Experimental and Clinical Biochemistry : abstract book, May 23-24, 2013. – Lviv, Ukraine, 2013. – P. 6.
159. Borzenko, B. G. Role of Thymidine kinase and Thymidine Phosphorylase as Enzymatic Test for Efficacy of Oncological Patients Treatment [Electronic resource]/ B. G. Borzenko [et al.] //Metabolomics. – 2013. - Vol. 3:123. doi:10.4172/2153-0769.1000123
160. Bray, F. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries/ F. Bray // CA Cancer JClin. –

2018. - V68, N. 6. – P 394–424.

161. Cachexia as evidence of the mechanisms of resistance and tolerance during the evolution of cancer disease [Text] / A. Maccio [et.al.] // *Int J Mol Sci.* – 2021. – Vol. 22, N 6. – P. 28 - 42. doi:10.3390/ijms22062890

162. Campos-contreras A. D. R. Purinergic signaling in the hallmarks of cancer [Electronic resource]/ A. D. R. Campos-Contreras, M. Díaz-M Muñoz, F. G. Vázquez-Cuevas // *Cells.* – 2020. – Vol. 9, N 7. – P. 1612. doi:10.3390/cells9071612

163. CD44 regulates epigenetic plasticity by mediating iron endocytosis [Electronic resource] / Sebastian Müller [et al.] // *BioRxiv.* – 2019. doi: <https://doi.org/10.1101/693424>.

164. CD73 facilitates EMT progression and promotes lung metastases in triple-negative breast cancer [Electronic resource]/ N. Petruk [et.al.] // *Sci Rep.* – 2021. – Vol. 11, N 1. – P. 6035. doi: 10.1038/s41598-021-85379-z.

165. CD73 or CD39 deletion reveals different mechanisms of formation for spontaneous and mechanically stimulated adenosine and sex specific compensations in ATP degradation [Text] / Y. Wang [et.al.] // *ACS Chem Neurosci.* –2020. – Vol. 11, N 6. – P. 919 - 928.

166. Changes in the blood antioxidant defense of advanced age people [Text] / M. Kozakiewicz [et.al.] // *Clin Interv Aging.* – 2019. – Vol. 1, N 14. – P.763-771. doi: 10.2147/CIA.S201250.

167. Characterization of the N⁶-etheno-bridge method to assess extracellular metabolism of adenine nucleotides: detection of a possible role for purine nucleoside phosphorylase in adenosine metabolism [Text] / E. K. Jackson [et.al.] // *Purinergic Signal.* – 2020. – Vol. 16, N 2. – P. 187 - 211. doi:10.1007/s11302-020-09699-x

168. Characterization of total adenosine deaminase activity (ADA) and its isoenzymes in saliva and serum in health and inflammatory conditions in four different species: an analytical and clinical validation pilot study [Electronic resource] / M. D. Contreras-Aguilar [et al] // *BMC Veterinary Research.* – 2020. – Vol. 384, N 16. <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02574-2>.

169. Characterization of total adenosine deaminase activity (ADA) and its

isoenzymes in saliva and serum in health and inflammatory conditions in four different species: an analytical and clinical validation pilot study [Electronic resource]/ M. D. Contreras-Aguilar [et.al.] // BMC Vet Res. – 2020. – Vol. 16, N 1. – P. 384. doi:10.1186/s12917-020-02574-2

170. Chemoprotective effect of atorvastatin against benzo(a)pyrene-induced lung cancer via the inhibition of oxidative stress and inflammatory parameters [Text] / X. Du [et.al.] // Ann Transl Med. – 2021. – Vol. 9, N 4. – P. 355 - 368. doi:10.21037/atm-20-7770

171. Chen, W. R. Phthalides serve as potent modulators to boost fetal hemoglobin induction therapy for β -hemoglobinopathies [Text] / W. R. Chen, C. C. Chou, C. C. Wang // Blood Adv. – 2019. – Vol. 14; 3 N9. - P.1493 - 1498.

172. Choice of Capecitabine or S1 in Combination with Oxaliplatin based on Thymidine Phosphorylase and Dihydropyrimidine Dehydrogenase Expression Status in Patients with Advanced Gastric Cancer [Text] / R. Xu [et al.] // J Gastric Cancer. – 2019. – Vol. 19, N 4. – P. 408–416. doi: 10.5230/jgc.2019.19.e40

173. Chung, S. S. Aging, hematopoiesis, and the myelodysplastic syndromes [Text] / S. S. Chung, C. Y. Park // Hematology Am Soc Hematol Educ Program. – 2017. – Vol. 8, N 1. – P. 73 - 78. doi: 10.1182/asheducation-2017.1.73.

174. CircABCB10 silencing inhibits the cell ferroptosis and apoptosis by regulating the miR-326/CCL5 axis in rectal cancer [Text] / Z. Y. Xian [et al.] // Neoplasma – 2020. – Vol. 67, N 5. – P. 1063 – 1073. doi:10.4149/neo_2020_191024N1084 7

175. Clustering of adenosine A_{2B} receptors with ectonucleotidases in caveolin- rich lipid rafts underlies immunomodulation by Leishmania amazonensis [Electronic resource]/ A. B. Figueiredo [et.al.] // FASEB J. – 2021. – Vol.35, N 5. – P. e21509. doi: 10.1096/fj.202002396RR.

176. Colchicine alleviates cholesterol crystal-induced endothelial cell pyroptosis through activating AMPK/SIRT1 pathway [Electronic resource] / M. Yang [et.al.] // Oxid Med Cell Longev. – 2020. – Vol. 2020. – P.9173530. doi: 10.1155/2020/9173530.

177. Comparison of pleural effusion features and biomarkers between

talaromycosis and tuberculosis in non-human immunodeficiency virus-infected patients. [Text] / Y. Qiu [et.al.] // BMC Infect Dis. – 2019. – Vol. 19, N 1. – P.745- 758. doi:10.1186/s12879-019-4376-6

178. Compartmentalization of adenosine metabolism in cancer cells and its modulation during acute hypoxia [Electronic resource] / K. Losenkova [et al.] // J. Cell Sci. – 2020. – Vol. 133, N 10. – jcs241463. doi: 10.1242/jcs.241463

179. Compendium of genetic modifiers of mitochondrial dysfunction reveals intra-organelle buffering [Electronic resource] / A. M. Cuadros [et.al.] // Cell. – 2019. – Vol. 179, N 5. – P. 1222 - 1238. doi: 10.1016/j.cell.2019.10.032

180. Copper accumulation in senescent cells: Interplay between copper transporters and impaired autophagy [Electronic resource] / S. Masaldana [et al.] // Redox Biology. – 2018. – N 56. – P. 322 – 331. <http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/>.

181. Copper metabolism as a unique vulnerability in cancer [Electronic resource] / V. C. Shanbhag [et al.] // Biochim Biophys Acta Mol Cell Res. – 2021. – Vol. 1868, N 2: 118893. doi:10.1016/J.bbamcr.2020.118893.

182. Copper oxide nanoparticles inhibit pancreatic tumor growth primarily by targeting tumor initiating cells [Electronic resource] / M. Benguigui [et al.] // Sci Rep. – 2019. – Vol. 9, N 1. – P. 12613.

183. Correlation between Oxidative Stress, Nutrition, and Cancer Initiation [Electronic resource] / Subbroto K. Saha [et al.] // Int. J. Mol. Sci. – 2017. - Vol. 1544, N 18. doi:10.3390/ijms18071544.

184. Crosstalk between xanthine oxidase (XO) inhibiting and cancer chemotherapeutic properties of comestible flavonoids- a comprehensive update [Electronic resource] / M. S. Rahaman [et al.] // J. Nutr. Biochem. – 2022. – Vol. 110. – P. 109147. doi: 10.1016/j.jnutbio.2022.109147

185. Cu(I) Controls Conformational States in Human Atox1 Metallochaperone: An EPR and Multiscale Simulation Study [Text] / O. Percal // The Journal of Physical Chemistry. – 2020. – N 124. – P - 4399 – 4411.

186. Correlation of nucleotides and carbohydrates metabolism with prooxidant and antioxidant systems of erythrocytes depending on age in patients with colorectal cancer [Text] / S. A. Zuikov [et al.] // *Experimental Oncology* – 2014. – Vol. 36, № 2. – P. 117–120.
187. Design, synthesis, biological evaluation of 3,5-diaryl-4,5-dihydro-1H-pyrazole carbaldehydes as non-purine xanthine oxidase inhibitors: Tracing the anticancer mechanism via xanthine oxidase inhibition [Electronic resource] / G. Joshi [et al.] // *Bioorg. Chem.* – 2021. – Vol. 107. – P. 104620. doi: 10.1016/j.bioorg.2020.104620
188. Determination of thymidine phosphorylase expression level facilitates recurrence risk stratification in stage II/III colorectal cancer following adjuvant chemotherapy with oral fluoropyrimidines [Text] / N. Kugimiya [et al.] // *Oncol. Lett.* – 2019. – Vol. 17, N 6. – P. 5267–5274. doi: 10.3892/ol.2019.10181
189. Development of a simple assay method for adenosine deaminase via enzymatic formation of an inosine-Tb³⁺ complex [Text] / S. Lee [et al.] // *Sensors*. – 2019. – Vol. 2728, N 19. doi:10.3390/s19122728.
190. Development of adenosine deaminase-specific IgY antibodies: diagnostic and inhibitory application [Text] / A. Łupicka-Słowik [et.al.] // *Appl Biochem Biotechnol.* – 2018. – Vol. 184 N 4. – P. 1358 - 1374. doi: 10.1007/s12010-017-2626-x.
191. Diagnostic value of adenosinedeaminase in bronchoalveolar lavage fluid for patients with lung cancer [Electronic resource] / İ. Hocanlı [et al.] // *Int. J. Clin Pract.* – 2021. – Vol. 75, N 12. – e14918. doi: 10.1111/ijcp.14918
192. Direct Activation of NADPH Oxidase 2 by 2-Deoxyribose-1-Phosphate Triggers Nuclear Factor Kappa B-Dependent Angiogenesis [Electronic resource] / Di. Vara [et al.] // *ANTIOXIDANTS REDOX SIGNALING*. – 2018. - Vol. 28, N 2. doi: 10.1089/ars.2016.6869.
193. Disign of Novel Inhibitors of Human Thymidine Phosphorylase: Synthesis, Enzyme Inhibition, in Vitro Toxicity, and Impact on Human Glioblastoma Cancer [Text] / N. D. de Moura Sperotto [et al.] // *J. Med. Chem.* – 2019. – Vol. 62, N 3. – P. 1231–1245. doi: 10.1021/acs.jmedchem.8b01305

194. Distinct contributions of partial and full EMT to breast cancer malignancy [Text] / F. Luond [et al.] // *Developmental Cell*. – 2021. - N 56. – P. 3203 – 3221, December 6. Published by Elsevier Inc <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2021.11.006>.
195. Distinct Roles of Adenosine Deaminase Isoenzymes ADA1 and ADA2: A Pan-Cancer Analysis [Electronic resource] / Z. W. Gao [et al.] // *Front Immunol*. – 2022. – Vol. 13. – P. 903461. doi: 10.3389/fimmu.2022.903461
196. Do all roads lead to the Rome? The glycation perspective! [Electronic resource] / Ahmad S [et al.] // *Semin. Cancer Biol*. – 2017. – pii: S1044-579X (17)30089-5. doi: 10.1016/j.semcancer.2017.10.012. [Epub ahead of print]
197. Dolly, A. Cancer cachexia and skeletal muscle atrophy in clinical studies: what do we really know? [Text] / A. Dolly, J. F. Dumas, S. J. Servais // *Cachexia Sarcopenia Muscle*. – 2020. – Vol. 11, N 6. – P. 1413-1428. doi:10.1002/jcsm.12633
198. Donor glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency decreases blood quality for transfusion [Text] / R. O. Francis [et.al.] // *J Clin Invest*. – 2020. – Vol. 130, N 5. – P. 2270-2285.
199. Double-stranded RNA-specific adenosine deaminase-knockdown inhibits the proliferation and induces apoptosis of DU145 and PC3 cells by promoting the phosphorylation of H2A.X variant histone [Text] / X. Li [et al.] // *Oncol. Lett*. – 2021. – Vol. 22, N 5. – P. 764 - 778. doi: 10.3892/ol.2021.13025
200. Dwyer K. M. Conversion of extracellular ATP into adenosine: a master switch in renal health and disease [Text] / K. M. Dwyer, B. K. Kishore, S. C. Robson // *Nat Rev Nephrol*. – 2020. – Vol. 16, N 9. – P. 509 - 524. doi: 10.1038/s41581-020-0304-7.
201. Effect of Thymidine Phosphorylase Gene Demethylation on Sensitivity to 5-Fluorouracil in Colorectal Cancer Cells [Text] / M. Koyama [et al.] // *Anticancer Res*. – 2022. – Vol. 42, N 2. – P. 837–844. doi: 10.21873/anticancer.15541
202. Emerging landscapes of tumor immunity and metabolism [Electronic resource] / F. Wu [et.al.] // *Front Oncol*. – 2020. – Vol. 7; 10. – P. 575037. doi:10.3389/fonc.2020.575037.
203. Endothelial Cells as Tools to Model Tissue Microenvironment in Hypoxia-

Dependent Pathologies [Text] / A. Majewska [et al.] // Int J Mol Sci. – 2021. – Vol. 22, N 2. – P. 520 - 529. doi:10.3390/ijms22020520

204. Enzymatic and thermodynamic profiles of a heterotetramer lactate dehydrogenase isozyme in swine [Text] / T. Goto [et al.] // Biochem Biophys Res Commun. – 2016. – Vol. 28, N 479 (4). – P. 860 - 867. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.09.118.

205. Epithelial-mesenchymal transition in main types of gastric carcinoma [Text] / I. V. Vasilenko [et al.] // Clin. exp. Morphology – 2021. – Vol. 10, N 2. – P. 13 – 20. Doi: 10.31088/ CEM2021.10.2.13–20.

206. Erythrocyte Metabolic Reprogramming by Sphingosine 1-Phosphate in Chronic Kidney Disease and Therapies [Text] / T. Xie [et al.] // Circ Res. – 2020. – Vol. 127, N 3. – P. 360 - 375.

207. Evaluating the therapeutic potential of ADAR1 inhibition for triple-negative breast cancer [Text] / C. P. Kung [et al.] // Oncogene. – 2021. – Vol. 40, N 1. – P. 189–202. doi: 10.1038/s41388-020-01515-5

208. Excess Iron Enhances Purine Catabolism Through Activation of Xanthine Oxidase and Impairs Myelination in the Hippocampus of Nursing Piglets [Text] / Peng Ji [et al.] // J Nutr. – 2019. – Vol. 149, N 11. – P. 1911–1919. doi: 10.1093/jn/nxz166

209. Expression of Adenosine A_{2B} Receptor and Adenosine Deaminase in Rabbit Gastric Mucosa ECL Cells [Text] / Arin RM, Vallejo AI, Rueda Y, et.al. // Molecules. - 2017. -Vol. 22, N(4). - P. 625 - 632. doi:10.3390/molecules22040625

210. Extracellular ATP and P2 purinergic signalling in the tumour microenvironment [Text] / F. Di Virgilio [et al.] // Nature Reviews Cancer. – 2018. – Vol. 18, N 10. – P. 601-618. DOI: 10.1038/s41568-018-0037-0

211. Ferroportin downregulation promotes cell proliferation by modulating the Nrf2–miR-17-5p axis in multiple myeloma [Electronic resource] / Y. Kong [et al.] // Cell Death and Disease. - 2019. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1854-0>.

212. Ferroptosis: molecular mechanisms and health implications. [Text] / D. Tang [et al.] // Cell Research. – 2021. – N 31. – P. 107 – 125. <https://doi.org/10.1038/s41422-020-00441-1>.

213. First Occurrence of Plasmablastic Lymphoma in Adenosine Deaminase-

Deficient Severe Combined Immunodeficiency Disease Patient and Review of the Literature [Text] / M. Migliavacca [et al.] // Front Immunol. – 2018. – Vol. 9. – P. 113. - 127. doi:10.3389/fimmu.2018.00113

214. Flinn, A. M. Adenosine deaminase deficiency: a review [Electronic resource] / A. M. Flinn, A. R. Gennery // Orphanet Journal of Rare Diseases. – 2018. – Vol. 65, N 13. <https://doi.org/10.1186/s13023-018-0807-5>.

215. FOXM1 modulates 5-FU resistance in colorectal cancer through regulating TYMS expression [Text] / V. Varghese [et al.] // Sci Rep. – 2019. – Vol. 9, N 1. – P. 1505 - 1515. doi: 10.1038/s41598-018-38017-0

216. Gastric cancer - clinical and epidemiological aspects [Text]/M. Venerito [et al.] // Helicobacter. – 2016. – Vol. 21. – Suppl. 1. – P. 39 - 44. doi: 10.1111/hel.12339. PMID: 27531538.

217. Generation of a RetargetedOncolytic <i>Herpes</i> Virus Encoding Adenosine Deaminase for Tumor AdenosineClearance [Electronic resource] / C. Gentile [et al.] // Int. J. Mol. Sci. – 2021. – Vol. 22, N 24. – P. 13521. doi: 10.3390/ijms222413521

218. Generation of erythroid cells from polyploid giant cancer cells: re-thinking about tumor blood supply [Text] / Z. Yang [et al.] // J. Cancer Res. Clin. Oncol. - 2018. – Vol. 144, N 4. – P. 617- 627. doi: 10.1007/s00432-018-2598-4.

219. Glucose as a Major Antioxidant: When, What for and Why It Fails? [Text] / A. Cherkas [et al.] // Antioxidants (Basel). – 2020. – Vol. 5, N 9(2). – P. 140 - 149. doi: 10.3390/antiox9020140.

220. Glutathione peroxidase, glutathione-S-transferase, catalase, xanthine oxidase, Cu-Zn superoxide dismutase activities, total glutathione, nitric oxide, and malondialdehyde levels in erythrocytes of patients with small cell and non-small cell lung cancer [Text] /H. Kaynar [et al.] // Cancer Lett. – 2005. – Vol. 28, N 227(2). – P. 133-139.

221. Ha, A. C. Screening medicinal plant extracts for xanthine oxidase inhibitory activity [Text] / A. C. Ha, Ch. D. P. Nguyen, T. M. Le // Fine Chemical Technologies. – 2022. – Vol. 17, № 2. – P. 131–139.

222. Hematopoietic Cell Transplantation Cures Adenosine Deaminase 2 Deficiency: Report on 30 Patients [H. Hashem [et al.] // J. Clin. Immunol. – 2021. – Vol. 41, N 7. – P. 1633–1647. doi: 10.1007/s10875-021-01098-0
223. Hypertension and Prohypertensive Antineoplastic Therapies in Cancer Patients [Text] / Van Dorst [et al.] // Circ Res. – 2021. – Vol. 128, N 7. – P. 1040-1061. doi:10.1161/CIRCRESAHA.121.318051
224. Ibtissam, Marchiq. Hypoxia, cancer metabolism and the therapeutic benefit of targeting lactate (H⁺-symporters) [Text] / Ibtissam Marchiq, Jacques Pouysségur // J Mol Med. – 2016. – Vol. 94. – P. 155–171. doi: 10.1007/s00109-015-1307-x
225. Immune cell concentrations among the primary tumor microenvironment in colorectal cancer patients predicted by clinicopathologic characteristics and blood indexes [Text] /G. Guo [et al.] // J Immunother Cancer. – 2019. – Vol. 12, N 7 (1). – P. 179 - 186. doi: 10.1186/s40425-019-0656-3.
226. Immunosuppression in Gliomas via PD-1/PD-L1 Axis and Adenosine Pathway [Electronic resource] /T. VOL. Scheffel [et al.] // Front Oncol. – 2021. – Vol.10. – P. 617385. doi: 10.3389/fonc.2020.617385.
227. Impact of thymidine phosphorylase and CD163 expression on prognosis in stage II colorectal cancer [Text] / D. Kaidi [et al.] // Clin. Transl. Oncol. – 2022. – Vol. 24, N 9. – P. 1818–1827. doi: 10.1007/s12094-022-02839-2
228. Impaired antioxidant capacity causes a disruption of metabolic homeostasis in sickle erythrocytes [Text] / N. A. Chaves [et al.] // Free Radic Biol Med. – 2019. – Vol. 141. – P. 34 - 46. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2019.05.034.
229. Increased Cytokeratin 19 Fragment Levels Are Positively Correlated with Adenosine Deaminase Activity in Malignant Pleural Effusions from Adenocarcinomas [Electronic resource] / J. L. Barillo [et al.] // Dis Markers. – 2018. - Vol. 2018. P. 2609767. Published 2018 May 8. doi:10.1155/2018/2609767
230. Individual osmotic fragility distribution: a new parameter for determination of the osmotic properties of human red blood cells [Electronic resource] /T. Walski [et al.] // BioMed research international. – 2014. – Vol. 2014. – P. 162102. doi:10.1155/2014/162102

231. Inflammatory Bowel Diseases: It's Time for the Adenosine System [Electronic resource] / L. Antonioli [et al.] // Front Immunol. – 2020. - Vol. 11. – P. 1310. doi:10.3389/fimmu.2020.01310

232. Inhibiting Adenosine Receptor Signaling Promotes Accumulation of Effector CD4⁺ T Cells in the Lung Parenchyma During Severe Tuberculosis [Electronic resource] E. P. Amaral [et al.] // J Infect Dis. – 2019. - Vol. 23219, N 6. - P. 964 - 974. doi: 10.1093/infdis/jiy586. PMID: 30307561.

233. Inhibition of adenosine deaminase activity reverses resistance to the cytotoxic effect of high adenosine levels in cervical cancer cells [Electronic resource] / A. Monroy-Mora [et al.] // Cytokine. – 2022. – Vol. 158. – P. 155977. doi: 10.1016/j.cyto.2022.155977

234. Inhibition of G6PD activity attenuates right ventricle pressure and hypertrophy elicited by VEGFR inhibitor + hypoxia [Electronic resource] / A. Kitagawa A [et al.] // J Pharmacol Exp Ther. – 2021. – Vol. 23: JPET-AR-2020-000166. doi: 10.1124/jpet.120.000166.

235. Inhibition of thymidine phosphorylase expression by Hsp90 inhibitor potentiates the cytotoxic effect of salinomycin in human non-small-cell lung cancer cells [Text] / J. C. Ko [et al.] // Toxicology. – 2019. – Vol. 417. – P. 54–63. doi: 10.1016/j.tox.2019.02.009.

236. Iron-responsive element-binding protein 2 plays an essential role in regulating prostate cancer cell growth [Text] / Z. Deng [et al.] // Oncotarget - 2017. - Vol. 8, N 47. – P. 82231 – 82243.

237. Kasprzak, A. The Role of Tumor Microenvironment Cells in Colorectal Cancer (CRC) Cachexia [Electronic resource] / A. Kasprzak // Int J Mol Sci. – 2021. – Vol. 22, N 4. – P. 1565. Published 2021 Feb 4. doi:10.3390/ijms22041565

238. Klaunig, J.E. Oxidative stress in carcinogenesis [Text] / J.E. Klaunig, Z. Wang // Curr Opin Toxicol. - 2018. – Vol. 7 – P. 116–121. doi: 10.1016/j.cotox.2017.11.014

239. Ko, J. Sustained adenosine exposure causes endothelial mitochondrial dysfunction via equilibrative nucleoside transporters [Electronic resource] / J. Ko, S.

Rounds, Q. Lu // *Pulm Circ.* – 2020. – Vol. 10, N 2. – P. 20458940. doi:10.1177/2045894020924994

240. Kuhn, V. Red Blood Cell Function and Dysfunction: Redox Regulation, Nitric Oxide Metabolism, Anemia [Text] / V. Kuhn // *Antioxidants & Redox Signaling.* – 2017. – Vol. 26. – P. 718 - 742.

241. Laukkanen, M. O. Extracellular superoxide dismutase: growth promoter or tumor suppressor? [Electronic resource] / M. O. Laukkanen // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* – 2016. – Vol. 2016. Article ID 3612589, 9 pages. [Laukkanen, 2016 = 261 Снежкина]14

242. Lowry, O.H. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O.H. Lowry, N. J. Rosenbrouch., A. L. Parr // *J. Biol. Chem.* – 1951. – Vol.193, №1. – P. 265-267.

243. Macrophage-Derived Adenosine Deaminase 2 Correlates with M2 Macrophage Phenotype in Triple Negative Breast Cancer [Text] / B. Kutryb-Zajac [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2021. – Vol. 22, N 7. – P. 3764 - 3774. doi: 10.3390/ijms22073764

244. Macrophage-derived adenosine deaminase 2 correlates with M2 macrophage phenotype in triple negative breast cancer [Electronic resource] / B. Kutryb-Zajac [et al] // *International Journal Molecular Sciences.* – 2021. – Vol. 3764, N 22. <https://doi.org/10.3390/ijms22073764>.

245. Mac Klaunig, J. E Oxidative stress in carcinogenesis [Text] / J.E. Mac Klaunig, Z. Wang // *Curr Opin Toxicol.* – 2018. - Vol. 7. – P. 116 – 121.

246. Magni, G. Adenosine Signaling in Autoimmune Disorders [Text]/ G. Magni, S. Ceruti // *Pharmaceuticals (Basel).* – 2020. – Vol. 13, N 9. – P. 260 – 270. doi:10.3390/ph13090260

247. Management of cancer-associated anemia with erythropoiesis-stimulating agents: ASCO/ASH clinical practice guideline update [Text] / J. Bohlius [et.al.] // *Blood Adv.* – 2019. – Vol. 3, N 8. – P. - 1197–1210.

248. Martinez, M. CAR T Cells for Solid Tumors: New Strategies for Finding, Infiltrating, and Surviving in the Tumor Microenvironment [Text] /M. Martinez, E. K.

Moon // Front Immunol. – 2019. - Vol. 5, N10. – P. 128 - 138. doi: 10.3389/fimmu.2019.00128.

249. Mary, Risinger. Red cell membrane disorders: structure meets function Affiliations expand [Text] / Mary Risinger, Theodosia A Kalfa. // Blood. – 2020. – Vol. 10, N 136 (11). – P. 1250-1261. doi: 10.1182/blood.2019000946.

250. Massaccesi, L. Erythrocytes as markers of oxidative stress related pathologies [Text] / L. Massaccesi, E. Galliera, M. M. Corsi Romanelli// Mech Ageing DeVol. – 2020. – Vol. 191. – P. 111-333. doi: 10.1016/j.mad.2020.111333.

251. Metabolic Flexibility as an Adaptation to Energy Resources and Requirements in Health and Disease [Text] /R. Smith [et al.] // Endocrine reviews. – 2018. – Vol. 39, N 4. – P. 489-517. doi:10.1210/er.2017-00211

252. Metabolic Remodeling, Inflammasome Activation, and Pyroptosis in Macrophages Stimulated by Porphyromonas gingivalis and Its Outer Membrane Vesicles [Text] /A. J. Fleetwood [et al.] // Front Cell Infect Microbiol. -2017. –Vol. 4, N 7. – P. 351 - 359. doi: 10.3389/fcimb.2017.00351.

253. Metastatic Testicular Choriocarcinoma: An Unusual Cause of Upper Gastrointestinal Bleed [Electronic resource] /A. Chaar [et al.] // Cureus. – 2019. – Vol. 26, N 11(7). – P. 5243. doi: 10.7759/cureus.5243.

254. MicroRNA roles in the Nuclear factor kappa B signaling pathway in cancer. [Electronic resource] / J. Wu [et al.] // Frontiers in Immunology. – 2018. – Vol. 9, N 546. doi: 10.3389/fimmu.2018.00546.

255. Mikashinovich, Z.I. Biochemical Changes in Erythrocytes as a Molecular Marker of Cell Damage during Long-Term Simvastatin Treatment [Text] / Z.I. Mikashinovich, E.S. Belousova // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2016. – Vol. 161, N 4. - P. 600–603.

256. Modulating Chemosensitivity of Tumors to Platinum-Based Antitumor Drugs by Transcriptional Regulation of Copper Homeostasis [Electronic resource] / Y. H. Lai [et al.] // Int. J. Mol. Sci. – 2018. - Vol. 1486, N 19. doi:10.3390/ijms19051486.

257. Moloney, J. N. ROS signalling in the biology of cancer [Electronic resource] / J. N. Moloney, T. G. Cotter // Sem. in Cell and Develop. Biology. <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.05.023>.
258. MoS sub2/sub-based nanocomposites for cancer diagnosis and therapy [Text] / J. Wang [et al.] // Bioact. Mater. – 2021. – Vol. 6, N 11. – P. 4209–4242. doi: 10.1016/j.bioactmat.2021.04.021
259. NADPH homeostasis in cancer: functions, mechanisms and therapeutic implications [Text] / H. Q. Ju [et.al.] // Signal transduction and targeted therapy. – 2020. – Vol. 5, N1. – P. 220 - 231. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00326-0>
260. NADPH levels affect cellular epigenetic state by inhibiting HDAC3-Ncor complex [Text]/ W. Li [et al.] // Nat Metab. – 2021. – Vol. 3, N 1. – P. 75-89. doi: 10.1038/s42255-020-00330-2.
261. New role for an old molecule: The 2,3-diphosphoglycerate case [Text] /E. Tellone [et al.] // Biochim Biophys Acta Gen. Subj. – 2019. – Vol. 1863, N 10. – P. 1602-1607. doi: 10.1016/j.bbagen.2019.07.002.
262. Normal Tumor Markers and Increased Adenosine Deaminase in Pericardial Effusion Misdiagnosed as Tuberculous Pericarditis Ultimately Proven as Lung Adenocarcinoma with Pericardial Metastasis: a Case Report and Literature Review [Electronic resource] / Y. L. Ge [et al.] // Clin Lab. – 2019. – Vol. 1, N 65(5). doi: 10.7754/Clin.Lab.2018.181036
263. Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress [Text] / I. Bellezza [et al.] // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Res. – 2018. - Vol. 1865, N 5. – P. 721 - 733.
264. Nuclear translocation of Atox1 potentiates activin A-induced cell migration and colony formation in colon cancer [Electronic resource] / A. Jana [et al.] // PLOS ONE - 2020. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227916> .
265. Nucleotide ecto-enzyme metabolic pattern and spatial distribution in calcific aortic valve disease; its relation to pathological changes and clinical presentation. [Text] / B. Kutryb-Zajac [et al.] // Clinical Research in Cardiology. – 2020. – N 109. – P. 137 – 160. <https://doi.org/10.1007/s00392-019-01495-x>.

266. O₂ •– and H₂O₂-Mediated Disruption of Fe Metabolism Causes the Differential Susceptibility of NSCLC and GBM Cancer Cells to Pharmacological Ascorbate [Text] / J. D. Schoenfeld [et al.] // *Cancer Cell*. – 2017. – Vol. 31, N 4. – P. 487 – 500. doi:10.1016/j.ccell.2017.02.018.

267. Opposing effects of adenosine and inosine in human subcutaneous fibroblasts may be regulated by third party ADA cell providers [Electronic resource] / C. Herman-de-Sousa [et al.] // *Cells*. – 2020. – Vol. 651, N 9. doi:10.3390/cells9030651.

268. Oral supplementation with liposomal glutathione elevates body stores of glutathione and markers of immune function [Text] / R. Sinha [et al.] // *Eur J Clin Nutr*. – 2018. – Vol. 72, N 1. – P. 105-111. doi: 10.1038/ejcn.2017.132.

269. Oxygen in the tumor microenvironment: effects on dendritic cell function [Text] / L. M. Paardekooper [et al.] // *Oncotarget* – 2019. – Vol. 10, N 8. – P. 883 – 896.

270. Pathogenesis and Treatment Options of Cancer Related Anemia: Perspective for a Targeted Mechanism-Based [Electronic resource] / C. Madeddu [et al.] // *Approach Front. Physiol*. – 2018. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01294>

271. Peng, Y. Vesicular IFN- γ as a cooperative attacker to enhance anti-cancer effect of 5-fluorouracil via thymidine phosphorylase upregulation and tumor microenvironment normalization [Electronic resource] / Y. Peng, Y. Hu, L. Qiu // *Nanomedicine*. – 2022. – Vol. 40. – P. 102501. doi: 10.1016/j.nano.2021.102501

272. Present and future of cancer immunotherapy: a tumor microenvironmental perspective. [Text] / Y. Yu [et al.] // *Oncology Letters* – 2018. – Vol. 16, N 4. – P. 4105 – 4113

273. Prognostic Significance of the C-Reactive Protein-to-Albumin Ratio in Patients With Metastatic Colorectal Cancer Treated With Trifluridine/Thymidine Phosphorylase Inhibitor as Later-line Chemotherapy [Text] / M. Shibutani [et al.] // *Anticancer Res*. – 2019. – Vol. 39, N 2. – P. 1051–1057. doi: 10.21873/anticancer.13212

274. Proliferating tumor cells mimic glucose metabolism of mature human erythrocytes [Text] / M. Ghashghaeinia [et al.] // *Cell Cycle*. – 2019. – Vol. 18, N 12. – P. 1316-1334. doi: 10.1080/15384101.2019.1618125.

275. Purinergic Signaling in Pancreas-From Physiology to Therapeutic Strategies in Pancreatic Cancer [Text] / I. Novak [et al.] // Int J Mol Sci. –2020. – Vol. 21, N 22. – P. 8781. doi: 10.3390/ijms21228781.

276. Reactive oxygen species: a key constituent in cancer survival [Electronic resource] / S. Kumari [et al.] // Biomark. Insights - 2018. – Vol. 13. – P. 1 – 9. Doi: 10.1177/1177271918755391

277. Role of Thymidine Phosphorylase/Platelet-Derived Endothelial Cell Growth Factor in Health and Cancer Growth [Text] / B. G. Borzenko [et al.] // JJEE. – 2015. – Vol. 1, N 2. – P. 009

278. Recent advances in the synthetic thymidine phosphorylase inhibitors for cancer therapy [Electronic resource] / Q. Feng [et al.] // Eur. J. Pharmacol. – 2022. – Vol. 934. – P. 175319. doi: 10.1016/j.ejphar.2022.175319

279. Redox regulation of nitrosyl-hemoglobin in human erythrocytes [Electronic resource] / F. Dei Zotti [et al.] // Redox Biol. – 2020. – Vol. 34. – P. 101399. doi: 10.1016/j.redox.2019.101399.

280. Regulation of Ferroptotic Cancer Cell Death by GPX4. [Text] / W. S. Yang [et al.] // Cell. - 2014. – Vol. – 156, N 16. – P – 317 – 331. doi:10.1016/j.cell.2013.12.010.

281. Remarkable protective effects of Nrf2-mediated antioxidant enzymes and tissue specificity in different skeletal muscles of daurian ground squirrels over the torpor-arousal cycle [Electronic resource] / Y. Wei [et al.] // Frontiers in Physiology. – 2019. – Vol.10, N 1449. Doi:10.3389/fphys.2019.01449.

282. Role of glycosylation in TGF- β signaling and epithelial-to-mesenchymal transition in cancer [Text] / J. Zhang [et al.] // Cell. – 2021. – Vol. 12, N 2. – P. 89 – 106. <https://doi.org/10.1007/s13238-020-00741-7>.

283. ROS generation and antioxidant defense systems in normal and malignant cells. [Electronic resource] / A. V. Snezhkina [et al.] // Oxidative Medicine and Cellular Longevity.- 2019. Article ID 6175804, 17 pages <https://doi.org/10.1155/2019/6175804> 9

284. ROS homeostasis and metabolism: a critical liaison for cancer therapy

[Electronic resource] / K. Jongdoo [et al.] // Experimental & molecular medicine. – 2016. - Vol. 48, N 11. – P. e269. 4 NoVol. 2016, doi:10.1038/emm.2016.119

285. Sadaf, A. L-glutamine for sickle cell disease: Knight or pawn? [Text] /A. Sadaf, C. T. Quinn// Exp Biol Med (Maywood). – 2020. – Vol. 245(2). – P. 146-154. doi:10.1177/1535370219900637.

286. Serum adenosine deaminase, catalase and carbonic anhydrase activities in patients with bladder cancer. [Text] / N. Pirinc [et al.] // Clinics. – 2012. – Vol.67, N 12. – P. 1443 – 1446. doi:10.6061/clinics/2012(12)15.

287. Serum level of Xanthine oxidase, Uric Acid, and NADPH oxidase1 in Stage I of Multiple Myeloma [Text] / M. Kohsari [et al.] // Asian Pac. J. Cancer Prev. – 2020. – Vol. 21, N 8. – P. 2237–2242. doi: 10.31557/APJCP.2020.21.8.2237

288. SOD1 regulates ribosome biogenesis in KRAS mutant non-small cell lung cancer. [Electronic resource] / X. Wang [et al.] // Nature Communications. – 2021. – Vol. 2259, N 12. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22480-x>.

289. STIM-Orai channels and reactive oxygen species in the tumor microenvironment. [Text] / J. Frisch, [et al.] // Cancers – 2019. Vol. 11, N 4. – P - 457 – 467

290. Stockwell, B. R. Emerging mechanisms and disease relevance of ferroptosis. [Text] / B.R. Stockwell, X. Jiang, W.Gu // Trends Cell Biol. – 2020. – Vol. 30, N 6. – P. 478–490. doi:10.1016/j.tcb.2020.02.009.

291. Suicidal death of erythrocytes in cancer and its chemotherapy: A potential target in the treatment of tumor-associated anemia [Electronic resource] / E. Lang [et al.] // Int J Cancer. – 2017. – Vol. 15, N 141(8). – P. 1522-1528. doi: 10.1002/ijc.30800.

292. Sulaiman, G. M. Biogenic synthesis of copper oxide nanoparticles using olea europaea leaf extract and evaluation of their toxicity activities: An in vivo and in vitro study [Text] / G. M. Sulaiman, A. T. Tawfeeq, M. D. Jaaffer // Biotechnol Prog. – 2018. – Vol. 34, N 1. – P. 218–230.

293. Sullivan, L. B. Mitochondrial reactive oxygen species and cancer. [Electronic resource] / L. B. Sullivan, N. S. Chandel // Cancer & Metabolism. – 2014. – Vol. 17, N 2. <http://www.cancerandmetabolism.com/content/2/1/17>.

294. Sun Q, Lu NN, Feng L. Apigetrin inhibits gastric cancer progression through inducing apoptosis and regulating ROS-modulated STAT3/JAK2 pathway [Text] / Q. Sun [et al.] // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2018. – Vol. 498, N 1. – P. 64 – 70
295. Superoxide dismutase promotes the epithelial-mesenchymal transition of pancreatic cancer cells via activation of the H₂O₂/ERK/NF- κ B axis. [Text] / W. Li [et al.] // *Int. J. Oncol* – 2015. – Vol. 46, N 6. – P. 2613 – 2620. Doi: 10.3892/ijo.2015.2938.
296. Synthesis of New Pyrazole Hybrids as Potential Anticancer Agents with Xanthine Oxidase Inhibitory Activity [Text] / A. Alsayari [et al.] // *Anticancer Agents Med Chem.* – 2022. – Vol. 22, N 12. – P. 2303–2309. doi: 10.2174/1871520622666220110162651
297. Synthesis, biological evaluation and molecular docking studies of bis-chalcone derivatives as xanthine oxidase inhibitors and anticancer agents [Electronic resource] / S. Burmaoglu [et al.] // *Bioorg. Chem.* – 2019. – Vol. 91. – P. 103149. doi: 10.1016/j.bioorg.2019.103149
298. Synthesis, evaluation of thymidine phosphorylase and angiogenic inhibitory potential of ciprofloxacin analogues: Repositioning of ciprofloxacin from antibiotic to future anticancer drugs [Electronic resource] / S. A. Shahzad [et al.] // *Bioorg. Chem.* – 2020. – Vol. 100. – P. 103876. doi: 10.1016/j.bioorg.2020.103876
299. Systematic Identification of Regulators of Oxidative Stress Reveals Non-canonical Roles for Peroxisomal Import and the Pentose Phosphate Pathway [Electronic resource] / M. M. Dubreuil [et al.]// *Cell Rep.* – 2020. – Vol. 4, V. 30(5). - P. 1417-1433.e7. doi: 10.1016/j.celrep.2020.01.013.
300. Systematic Review of Interventions to Reduce Operating Time in Lung Cancer Surgery [Electronic resource] /P.S.Hoefsmit [et al.]// *Clin. Med. Insights Oncol.* – 2021. – Vol. 15. - P. 1179554920987105. doi: 10.1177/1179554920987105.
301. Tarar, A. Mesenchymal stem cells anchored with thymidine phosphorylase for doxifluridine-mediated cancer therapy [Text] / A. Tarar, E. M. Alyami, C. A. Peng // *RSC Adv.* – 2021. – Vol. 11, N 3. – P 1394–1403. doi: 10.1039/d0ra10263f

302. Targeted knock-in mice expressing the oxidase-fixed form of xanthine oxidoreductase favor tumor growth [Text] / T. Kusano [et al.] // Nat. Commun. – 2019. – Vol. 10, N 1. – P. 4904- 4916. doi: 10.1038/s41467-019-12565-z
303. Targeting Adenosine with Adenosine Deaminase 2 to Inhibit Growth of Solid Tumors [Text] / L. Wang [et al.] // Cancer Res. – 2021. – Vol. 81, N 12. – P. 3319–3332. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-21-0340
304. Targeting purine metabolism in ovarian cancer [Electronic resource] / J. Liu [et al.] // J. Ovarian. Res. – 2022. – Vol. 15, N 1. – P. 93. doi:10.1186/s13048-022-01022-z
305. Targeting thymidine phosphorylase alleviates resistance to dendritic cell immunotherapy in colorectal cancer and promotes antitumor immunity [Electronic resource] / A. Paladhi [et al.] // Front Immunol. – 2022. – Vol. 13. – P. 988071. doi: 10.3389/fimmu.2022.988071
306. Targeting thymidine phosphorylase inhibition in human colorectal cancer xenografts [Electronic resource] / N. D. M. Sperotto [et al.] // Biomed. Pharmacother. – 2021. – Vol. 139. – P. 111672. doi: 10.1016/j.biopha.2021.111672
307. Teoh, P. J. ADARs, RNA editing and more in hematological Malignancies [Text] / P. J. Teoh, M. Y. Koh, W. J. Chng // Leukemia. – 2021. – Vol. 35, N 2. – P. 346–359. doi: 10.1038/s41375-020-01076-2
308. The Adenosine System at the Crossroads of Intestinal Inflammation and Neoplasia [Electronic resource] / VOL. D'Antongiovanni [et al.] // Int J Mol Sci. – 2020. – Vol. 21, N 14. – P. 5089. doi:10.3390/ijms21145089
309. The effects of RNA editing in cancer tissue at different stages in carcinogenesis [Text] / M. Kurkowiak [et al.] // RNA Biol. – 2021. – Vol. 18, N 11. – P. 1524–1539. doi: 10.1080/15476286.2021.1877024
310. The emerging role of xanthine oxidase inhibition for suppression of breast cancer cell migration and metastasis associated with hypercholesterolemia [Text] / S. H. Oh [et al.] // FASEB J. – 2019. – Vol. 33, N 6. – P. 7301– 7314.
311. The Glycocalyx and Its Role in Vascular Physiology and Vascular Related Diseases [Text] / S. Weinbaum [et al.] // Cardiovasc Eng. Technol. – 2021. – Vol. 12(1).

– P. 37-71. doi:10.1007/s13239-020-00485-9

312. The influence of Thymidine Phosphorylase genetic variation on clinical outcomes and safety of colorectal cancer patients received adjuvant chemotherapy after R0 resection [Text] / Y. B. Du [et al.] // *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* – 2018. – Vol. 98, N 32. – P. 2569–2573. doi: 10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2018.32.007

313. The inhibition of thymidine phosphorylase can reverse acquired 5FU-resistance in gastric cancer cells [Text] / R. Mori [et al.] // *Gastric. Cancer.* – 2019. – Vol. 22, N 3. – P. 497–505. doi: 10.1007/s10120-018-0881-3

314. The mechanism underlying resistance to 5-fluorouracil and its reversal by the inhibition of thymidine phosphorylase in breast cancer cells [Text] / R. Mori [et al.] // *Oncol. Lett.* – 2022. – Vol. 24, N 3. – P. 311 - 322. doi: 10.3892/ol.2022.13431

315. The Multifaceted Roles of Copper in Cancer: A Trace Metal Element with Dysregulated Metabolism, but Also a Target or a Bullet for Therapy [Text] / P. Lelièvre [et al.] // *Cancers (Basel).* – 2020. – Vol. 12, N 12. – P. 3594 - 3601.

316. The Multifaceted Roles of Copper in Cancer: A Trace Metal Element with Dysregulated Metabolism, but Also a Target or a Bullet for Therapy [Text] / P. Lelièvre [et al.] // *Cancers.* – 2018. - Vol. 3594, N 12. – P. 222 – 230. doi:10.3390/cancers12123594.

317. Thymidine catabolism promotes NADPH oxidase-derived reactive oxygen species (ROS) signalling in KB and yumoto cells. [Text] / S. Tabata [et al.] // *Scientific Reports.* – 2018. Vol. – 6760, N 8. DOI:10.1038/s41598-018-25189-y.

318. Thymidine phosphorylase and prostrate cancer cell proliferation inhibitory activities of synthetic 4-hydroxybenzohydrazides: In vitro, kinetic, and in silico studies [Electronic resource] / S. Javaid [et al.] // *PLoS One.* – 2020. – Vol. 15, N 1. – e0227549. doi: 10.1371/journal.pone.0227549

319. Thymidine Phosphorylase Expression and Microvascular Density Correlation Analysis in Canine Mammary Tumor: Possible Prognostic Factor in Breast Cancer [Text] / N. Zizzo [et al.] // *Front Vet. Sci.* – 2019. – N 6. – P. 368 - 375. doi: 10.3389/fvets.2019.00368

320. Thymidine phosphorylase in cancer aggressiveness and chemoresistance [Text] / T. Furukawa [et al.] // Pharmacol. Res. – 2018. – Vol. 132. – P. 15–20.
321. Thymidine phosphorylase in cancer aggressiveness and chem. resistance. [Text] / T. Furukawa [et al.] // Pharmacol. Res. – 2018. – Vol. 132. – P. 15-20. Doi: 10.1016/j.phrs.2018.03.019. PMID: 29604437
322. Thymidine Phosphorylase Induces Carcinoma Cell Oxidative Stress and promotes secretion of angiogenic factors [Text] / Nicholas S. Brown [et al.] // Cancer Res. – 2000. – Vol. 60. – P. 6298–6302.
323. Thymidine phosphorylase induction by ionizing radiation antagonizes 5-fluorouracil resistance in human ductal pancreatic adenocarcinoma [Text] / L. D. Lee [et al.] // Radiat Environ Biophys. – 2022. – Vol. 61, N 2. – P. 255–262. doi: 10.1007/s00411-022-00962-w
324. Thymidine phosphorylase promotes angiogenesis and tumour growth in intrahepatic cholangiocarcinoma [Text] / S. Li [et al.] // Cell Biochem. Funct. – 2020. – Vol. 38, N 6. – P. 743–752. doi: 10.1002/cbf.3541
325. Thymidine phosphorylase promotes malignant progression in hepatocellular carcinoma through pentose Warburg effect [Text] / Q. Zhang [et al.] // Cell Death Dis. – 2019. – Vol. 10, N 2. – P. 43 - 51. doi: 10.1038/s41419-018-1282-6
326. Thymidine phosphorylase: the unforeseen driver in colorectal cancer treatment? [Text] / M. Tampellini [et al.] // Future Oncol. – 2018. – Vol. 14, N 12. – P. 1223–1231. doi: 10.2217/fon-2017-0627
327. Topoisomerase inhibitors promote cancer cell motility via ROS-mediated activation of JAK2-STAT1-CXCL1 pathway. [Text] / J. Liu [et al.] // J. Exp. Clin. Cancer Res. – 2019. – Vol. 38, N 1. – P. 370. doi:10.1186/s13046-019-1353-2
328. Torti, S. V. Iron and cancer: more ore to be mined. [Text] / S. V. Torti, F. M. Torti // Nat Rev Cancer. – 2013. – Vol. 13, N 5. – P. 342 – 355. doi:10.1038/nrc3495.
329. Torti, S. V. Iron: The cancer connection. [Electronic resource] / S. V. Torti, F. M. Torti // Molecular Aspects of Medicine. – 2020. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2020.100860>.

330. Tritsch, G.L. Validity of the continuous spectrophotometric assay of Kalckar for adenosine deaminase activity [Text]/G. L. Tritsch // Ann. Biochem. – 1983. – Vol. 29. – P. 207- 209.
331. Tumor-derived CXCL5 promotes human colorectal cancer metastasis through activation of the ERK/Elk-1/Snail and AKT/GSK3 β / β -catenin pathways. [Text] / J. Zhao [et al.] // Mol. Cancer - 2017. – Vol. 16, N 1. – P. 70 – 77. doi:10.1186/s12943-017-0629-4
332. TXNDC12 promotes EMT and metastasis of hepatocellular carcinoma cells via activation of β -catenin. [Text] / K. Yuan [et al.] // Cell Death Differ – 2020. – Vol. 27, N 4. – P. 1355 – 1368. doi:10.1038/s41418-019-0421-7
333. Ursini, F. Lipid peroxidation and ferroptosis: The role of GSH and GPx4 [Text]/ F. Ursini, M. Maiorino // Free Radical Biology and Medicine. – 2020. - Vol. 152. - P. 175-185.
334. Vartanian, A. A. Iron metabolism, ferroptosis and cancer [Текст] // Russian journal of biotherapy - 2017. - Vol. 16, N 3. – P.14 - 20.
335. Wang, Q. Oxidative Stress and Thrombosis during Aging: The Roles of Oxidative Stress in RBCs in Venous Thrombosis [Text]// Wang Q, Zennadi R. // Int J Mol Sci. - 2020. – Vol. 21, N.12. – P. 42-59. doi: 10.3390/ijms21124259.
336. Warfield, B. M. Multifunctional role of thymidine phosphorylase in cancer [Text] / B. M. Warfield, P. Reigan // Trends Cancer. – 2022. – Vol. 8, N 6. – P. 482–493. doi: 10.1016/j.trecan.2022.01.018
337. Whole blood viscosity and red blood cell adhesion: Potential biomarkers for targeted and curative therapies in sickle cell disease [Electronic resource] // E. Kucukal [et al.] // Am J Hematol. – 2020. – Vol. 95, N 11. – P. 1246-1256. doi:10.1002/ajh.25933
338. Wu, S. Nrf2 in cancers: A double-edged sword. [Text] / S. Wu, H. Lu, Y. Bai // Cancer Medicine. - 2019. – N 8. – P. 2252 – 2267. DOI: 10.1002/cam4.2101.
339. Wynn, T.A. Macrophages in tissue repair, regeneration, and fibrosis [Text] / T.A. Wynn, K.M. Vannella //Immunity. – 2016. – Vol. 44, №. 3. – P. 450-462.

340. Xanthine Oxidase/Dehydrogenase Activity as a Source of Oxidative Stress in Prostate Cancer Tissue [Text] / A. Veljković [et al.] // *Diagnostics (Basel)*. – 2020. – Vol. 10, N 9. – P. 668-675. doi: 10.3390/diagnostics10090668
341. Xanthine oxidase-mediated oxidative stress promotes cancer cell-specific apoptosis [Text] / H. Xu [et al.] // *Free Radic Biol Med*. – 2019. – Vol. 139. – P. 70–79. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.05.019
342. Zhang, M. Association between serum copper levels and cervical cancer risk: a meta-analysis [Electronic resource] / M. Zhang, M. Shi, Y. Zhao // *Bioscience Reports*/ - 2018. - N 38. BSR20180161 <https://doi.org/10.1042/BSR20180161>.
343. Zhang, X. Association between serum copper levels and lung cancer risk: A meta-analysis [Electronic resource] / X. Zhang, Q. Yang // *Journal of International Medical Research*. – 2018. – Vol. 46, N 12. – P. 4863 – 4873. doi: 10.1177/0300060518798507.