

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ ДОНЕЦКОЙ НАРОДНОЙ РЕСПУБЛИКИ
ГОСУДАРСТВЕННАЯ ОБРАЗОВАТЕЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ВЫСШЕГО
ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ «ДОНЕЦКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМ. М. ГОРЬКОГО»

На правах рукописи

БАКУРОВА ЕЛЕНА МИХАЙЛОВНА

УДК 616-006.86-031+616.155:577.4

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

3.3.3 – патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
доктора медицинских наук

Донецк - 2022

Работа выполнена в Государственной образовательной организации высшего профессионального образования «Донецкий национальный медицинский университет имени М. Горького» (ГОО ВПО ДОННМУ им. М. ГОРЬКОГО), г. Донецк.

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

Официальные
оппоненты: **Котиева Инга Мовлиевна,** доктор медицинских наук,
доцент, ФГБОУ ВО «Ростовский государственный
медицинский университет» МЗ РФ, проректор по научной
работе, профессор кафедры патологической физиологии

Золотухин Сергей Евгеньевич, доктор медицинских
наук, профессор, Республиканский травматологический
центр МЗ ДНР, заведующий отделом координации
научных исследований и прогнозирования

Михайличенко Вячеслав Юрьевич, доктор медицинских
наук, профессор, Институт «Медицинская академия им.
С.И. Георгиевского» ФГАОУ ВО «Крымский федеральный
университет имени В.И. Вернадского», заведующий
кафедрой общей хирургии, анестезиологии-
реаниматологии и скорой медицинской помощи

Ведущая
организация: **Институт неотложной и восстановительной хирургии
имени В. К. Гусака Министерства здравоохранения
Донецкой Народной Республики**

Защита состоится «28» апреля 2023 года в 10:00 часов на заседании
диссертационного совета Д 01.022.05 при ГОО ВПО «Донецкий
национальный медицинский университет им. М. Горького» по адресу:
283003, г. Донецк, пр. Ильича, 16. Тел.: (062) 244-41-51, факс: (062) 344-
40-01, e-mail: spec-sovet-01-022-05@dnmu.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГОО ВПО
«Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького» по
адресу: 283003, г. Донецк, пр. Ильича, 16 и на сайте организации
www.dnmu.ru.

Автореферат разослан «___» _____ 2023 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета Д 01.022.05
д. мед. н., доцент

А. И. Кравченко

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В мировой практике в структуре опухолевой патологии доминируют эпителиальные опухоли (карциномы) различных локализаций (Bray F. et al., 2018). Среди причин онкологической смертности, как и прежде, первое место занимает рак легких, второе – рак желудка (Bray F. et al., 2018; Kaprin A. D. et al., 2020; Седаков И.Е. и соавт., 2022). Низкая эффективность комбинированного лечения может быть обусловлена формированием индивидуальных агрессивных свойств опухоли, ведущих к химио-, иммуно-, радиорезистентности (Кондратюк Р. Б. и соавт., 2021).

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 (Snezhkina A. V., 2019; Tatsuhiko F. et al., 2018, Camici M. et al., 2019). Ферменты их обмена, такие как супероксиддисмутаза, тимидинфосфорилаза, аденозиндезаминаза, ксантиноксидаза, играют важную роль в развитии агрессивных свойств опухоли (Che M. et al., 2016, Battelli M. G. et al., 2016). Поскольку они являются металлоферментами, то сами могут подвергаться модифицирующему воздействию АФК (Griess B. et al., 2017). Основными механизмами воздействия АФК считают взаимодействие с металлосодержащими белками или окисление их SH-групп (Орлов Д. С. и соавт., 2015). 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 (Zhao J. et al., 2017; Liu J. et al., 2019; Zeng J. et al., 2021). Именно за счет продукции H_2O_2 металлофермент супероксиддисмутазу (СОД) считают вовлеченной в развитие ЭМП (Li W. et al., 2015). Значительную роль в предотвращении стимулов пероксида водорода играют ферменты, разрушающие его, в частности, глутатионпероксидаза (ГПО) (Seema Kumari et al., 2018).

Формирование H_2O_2 может стимулировать 2-дезоксид-Д-рибоза (2-д-Д-Риб) (Vara D. et al., 2018). Интересно, что они могут активировать общие факторы транскрипции, отвечающие за устойчивость клетки к апоптозу, запускающие процессы ангиогенеза (Tatsuhiko F. et al., 2018). Повышение уровней H_2O_2 наблюдали в клетках, интенсивно экспрессирующих тимидинфосфорилазу (ТФ) (Sho T. et al., 2018). Этот продуцирующий фосфорилированную 2-д-Д-Риб фермент считают показателем опухолевой агрессии, плохого прогноза (Furukawa T. et al., 2018). ТФ также участвует в опухолевом метаболизме фторпиримидинов – препаратов, являющихся базовыми во многих схемах химиотерапии карцином различных локализаций (Доброва Н. В. и соавт., 2018).

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 исследования. 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-рибозо-1-фосфата (обозначим условно как катаболическая, ТФк). ТФ, являясь полифункциональным белком (Борзенко Б.Г. и соавт., 2021), 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 (McCartney A. et al., 2019). 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) (Barsukova M. et al., 2019).

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 (Dzobo K. et al., 2020), что опухолевые клетки на её протяжении гетерогенны (Ciuce M. et al., 2020). В тоже время описываемые регуляторные эффекты АФК, 2-д-Д-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.

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.

Задачи исследования:

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 полученных результатов. 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 фосфоорилазной 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. 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 адъювантной 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.

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.

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).

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-дезоксид-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 фосфорилазной активности ТФ на фоне дисбаланса активности ферментов антиоксидантов могут формировать условия для стимулирования тканевыми метаболитами (2-д-Д-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 исследований 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.

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 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).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования. Проведенные исследования соответствуют этическим принципам Хельсинкской декларации, принятой Генеральной ассамблеей Всемирной медицинской ассоциации (1997-2000 гг.), исключают ограничение интересов пациента и нанесения вреда его здоровью, что подтверждено заключением комиссии по биоэтике ГОО ВПО ДОННМУ ИМ. М. ГОРЬКОГО № 59/5-1 от 22.09.22 г., протокол № 3. Больные проходили лечение в Донецком Республиканском онкологическом центре им. Г.В. Бондаря, были проинформированы и дали согласие на участие в исследовании.

Исследование изучаемых показателей проводили в образцах 163 эпителиальных опухолей немелкоклеточного рака легких (НМРЛ, n=63), рака желудка (РЖ, n=52), кишечника (РК, n=48). Контролем служили визуально нетрансформированные ткани края резекции, удаленные от опухолевого узла не менее, чем на 1см. Особенности ферментативной активности также определяли в плазме периферической венозной крови, плазме венозной крови, оттекающей от органа; в эритроцитах крови и в плазме, богатой тромбоцитами. 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).

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 НМРЛ соответствовали T₂N₀₋₂M₀ и T₃N₀₋₂M₀; РЖ и РК – преимущественно T₃N₀₋₂M₀ стадиям. По степени дифференцировки (классификация ВОЗ, 1973) преобладали карциномы G₁ и G₂ степени. Неоадьювантная терапия опухолей, включенных в исследование, не проводилась.

Виды активности ТФ определяли спектрофотометрически при λ 300 и 267 нм по изменениям оптической плотности тимина (дезокситимидина) (Борзенко Б. Г., 1986). Активность аденозиндезаминазы исследовали по снижению оптической плотности аденозина при 265 нм (Tritsch G. L., 1983). Активность ксантиноксидазы – по нарастанию мочевой кислоты при 283 нм. Активность СОД регистрировали на 480 нм по торможению самопроизвольного окисления адреналина в щелочной среде (Макаревич О. П., 1983). За 1 условную единицу активности СОД принимали активность, замедлявшую его самоокисление в 2 раза. Активность глутатионпероксидазы (ГПО) оценивали по изменению содержания восстановленного глутатиона, определяя его конъюгаты с 2-нитро-5-тиобензоатом (Moin V. M., 1986).

Статистическая обработка полученных результатов исследования проводилась с помощью специализированных программ «MedStat» v. 5.2 и «Statistica 10.0» (StatSoft). Для проверки распределения на нормальность применялся критерий W Шапиро-Уилка. Данные, не подчинявшиеся закону нормального распределения, представлены в виде медианного значения данных (Me) и интервала между 25-м и 75-м перцентилями (первый и третий квартили (Q_1 ; Q_3)). 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).

Результаты исследований и их обсуждение. Впервые поведено одновременное определение классической – фосфорилазной активности (т.н. катаболической, ТФк, обеспечивающей появление в клеточном метаболизме сигнальной 2-дезоксид-рибозы) и трансферазной (далее – анаболической, ТФан, способной с помощью косубстрата обеспечить генерацию дезокситимидина – субстрата для тимидинкиназы, являющейся маркером пролиферацией) (таблица 1).

Таблица 1 – Активность тимидинфосфорилазы и аденозиндезаминазы в опухолях различной локализации, нмоль/мин·мг

	НМРЛ		РЖ		РК	
Ткани	Контроль n = 63	Опухоль n = 63	Контроль n = 52	Опухоль n = 52	Контроль n = 48	Опухоль 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: * – $p < 0,05$ по сравнению с индивидуальным контролем.

Согласно результатам дисперсионного однофакторного анализа, ANOVA для исследуемых эпителиальных опухолей желудка, кишечника, НМКР характерно повышение активности ферментов обмена нуклеозидов. Трансферазная активность ТФ (ТФан) сопоставима с фосфорилазной (ТФк) (таблица 1), оказывает значимое влияние на уровни дезокситимидина, следовательно, более корректным является их одновременное изучение.

Выявлены взаимосвязи между опухолевой активностью: ТФк и ТФан (показатель ранговой корреляции Спирмена $\rho = 0,30$); ТФк и АДА ($\rho = 0,38$); но более сильная связь выявлена для ТФан и АДА ($\rho = 0,72$); $p < 0,05$.

Согласно анализа ANOVA и сравнения формы распределения данных внутри выборок (критерий хи-квадрат, χ^2) выборки по видам опухолевой активности ТФ (в отличие от активности АДА) были неоднородными для опухолей всех локализаций. Статистически были выделены подгруппы, в которых лишь для одного вида активности наблюдалось выраженное повышение по сравнению со смежными контрольными тканями (рисунок 1).

На примере данных по НМРЛ видно, что в одной из подгрупп (сплошной линией отмечены различия в опухолевой ткани по сравнению с контролем) преобладала активность ТФан, а в другой (пунктир), наоборот, ТФк. Подобные подгруппы выделялись и в РЖ, и в выборке по РК. Известно, что опухоли одной морфологии и локализации могут отличаться по уровням экспрессии ТФ. Также, по мнению одних исследователей, что это отражает интенсивность ангиогенеза. Другие указывают на преимущественную взаимосвязь ТФ с интенсивностью пролиферации. Нами были сопоставлены индивидуальные особенности видов активности ТФ с уровнями опухолевой экспрессии CD34 (ангиогенез) и Ki-67 (пролиферация).

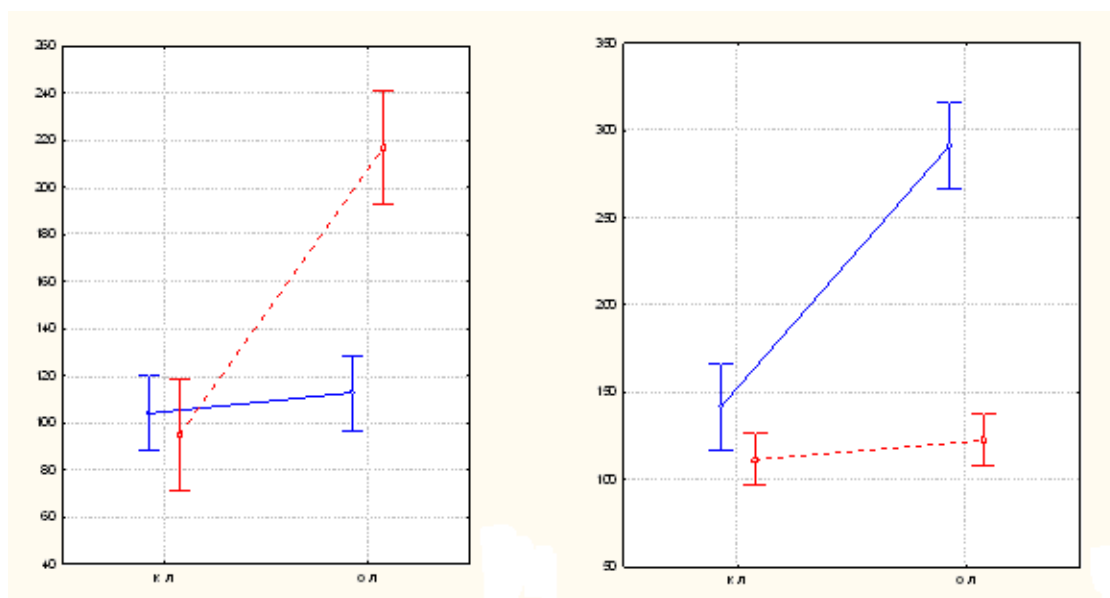


Рисунок 1 – Неоднородность НМРЛ по видам активности ТФ, нмоль/мин·мг; слева ТФк, справа ТФан в подгруппах: I-я - сплошная линия, II-я – пунктир

Установили, что активность ТФк в тканях НМРЛ с низким уровнем экспрессии CD34 составляла $35,16 \pm 8,62$ нмоль/мин·мг. При его умеренной экспрессии $77,17 \pm 20,22$ нмоль/мин·мг; при высоких уровнях экспрессии CD34 - повышалась до $136,24 \pm 25,43$ нмоль/мин·мг. Была установлена прямая корреляционная связь между изменениями активности ТФк и показателем ангиогенеза CD34 (коэффициент парной корреляции Кендалла 0,76; $p < 0,05$). Для ТФан такой корреляции не выявлено. Однако, была установлена её связь с особенностями экспрессии Ki-67. 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 критерию χ^2 общие тенденции особенностей видов активностей ТФ, которые коррелировали с особенностями ангиогенеза и пролиферации, в выделенных подгруппах как в НМРЛ, так и при РЖ, РК таковы: I подгруппа – ТФан опухоли в 1,6 раза и больше превышала контроль, II подгруппа – ТФк опухоли в 1,6 – 2 раза выше контрольной, III – при сопоставлении с индивидуальным контролем виды активности ТФ в опухоли выше, но достоверно не отличались от активности в контрольной выборке, IV – как ТФк, так и ТФан опухоли в 1,6 – 2 раза выше контрольных. Отметим, что подгруппа I была наиболее многочисленной по количеству случаев во всех локализациях. Вместе с подгруппой IV, для которой также была характерна высокая опухолевая трансферазная активность, удельный вес опухолей с высокой активностью ТФан в выборках составил: НМРЛ 70%, РЖ 89%, КРР 76%. Следовательно, можно утверждать о существенном вкладе в опухолевый метаболизм и этого вида активности. Корреляции с уровнями экспрессии Ki-67 и CD34 для двух видов активности ТФ делают их перспективными биохимическими маркерами. В дальнейшем считаем более корректным одновременное изучение ТФк и ТФан.

Поскольку мониторинг имеет чрезвычайное значение при решении целого ряда вопросов клинической онкологии, важен поиск информативного материала, удобного для широкого использования. 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. По результатам дисперсионного однофакторного анализа ANOVA ПлБТот наиболее близка по значениям с опухолевой активностью для ТФк и для ТФан (рисунок 2).

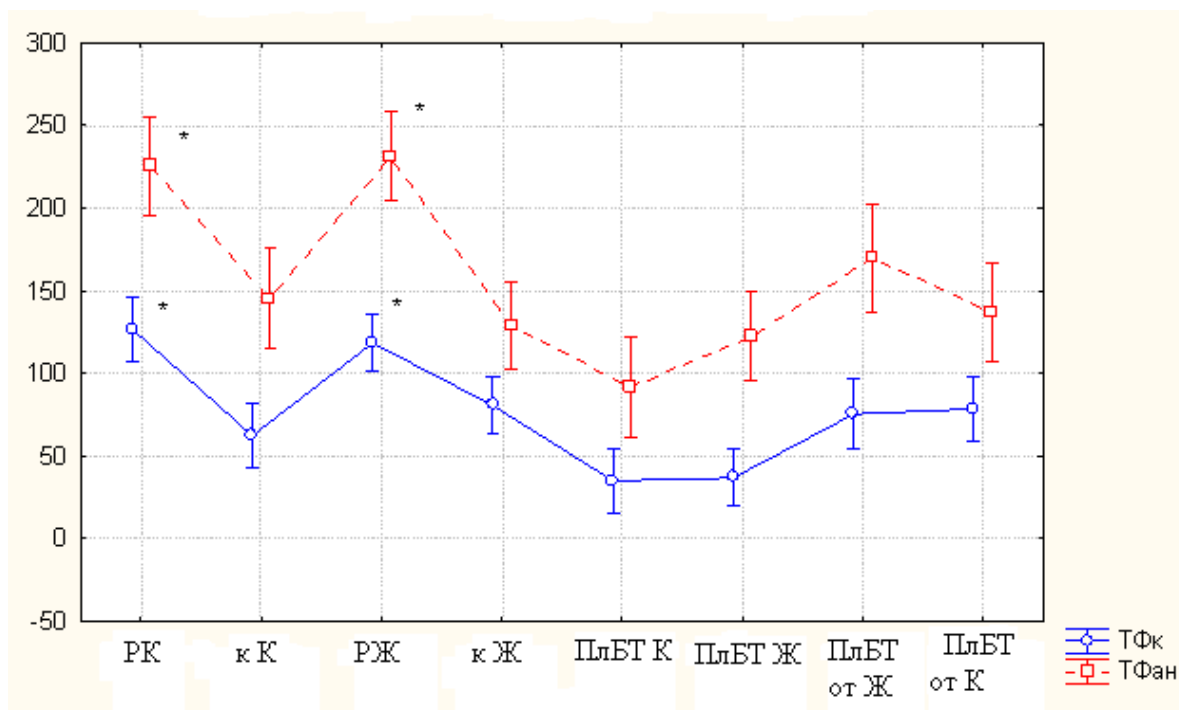


Рисунок 2 – Особенности видов активности ТФ при РЖ и РК, нмоль/мин·мг. Примечание: РК, РЖ – опухоли; кК, кЖ – контрольные ткани; ПЛБТ К – ПЛБТ при РК; ПЛБТ Ж – ПЛБТ при РЖ; ПЛБТот Ж и ПЛБТот К – их плазма, богатая тромбоцитами, оттекающая от пораженного органа

Как карциномы, так и ПЛБТот характеризовалась наиболее высокой активностью ТФ. Достоверные отличия между видами активности ТФ в этом материале и в опухоли отсутствуют.

Изменения активности АДА также были более выражены в ПЛБТот (оттекающей от органа). 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.

В то же время, плазма периферической крови, богатая тромбоцитами (ПЛБТ) является более доступным материалом (кровь забиралась из локтевой вены традиционным способом). Установленные корреляции особенностей видов активности ТФ в ПЛБТ с опухолевой активностью, делают её перспективным материалом для онкомониторинга. 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 $\rho = 0,50$), $p < 0,05$.

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 подгруппах опухолей РК (согласно критерию χ^2) их сопоставили с особенностями активности в оттекающей от опухоли плазме (Пл_от) и плазме периферической крови (Пл). Так в I подгруппе с доминированием в опухолях трансферазной активности (ТФан опухоли $199,46 \pm 13,03$, ТФан контроля $108,40 \pm 15,23$ нмоль/мин·мг; выше в 1,8 раза, $p < 0,05$. ТФк $71,67 \pm 17,55$ не превышала контроль - $55,89 \pm 14,71$ нмоль/мин·мг), ТФан Пл_от значительно превышала не только контроль ($67,55 \pm 11,70$; выше в 2,4 раза, чем в Пл в норме $28,63 \pm 6,95$ нмоль/мин·мг), но и свою активность в плазме периферической крови (Пл) ($34,93 \pm 14,82$; выше в 1,9 раза). При этом фосфорилазная активность ТФк Пл_от не отличалась от ТФк Пл ($5,84 \pm 1,25$ и $6,86 \pm 1,66$ нмоль/мин·мг). В опухолях РК, отнесенных во II подгруппу, наоборот, значительно повышалась опухолевая фосфорилазная активность (ТФан опухоли $78,25 \pm 8,61$, ТФан контроля $100,00 \pm 13,38$ нмоль/мин·мг; $p > 0,05$. ТФк опухоли $213,88 \pm 35,45$ в 3,1 раза превышала контроль - $68,67 \pm 13,67$ нмоль/мин·мг). В этой подгруппе активность ТФк Пл_от была выше, чем в I подгруппе ($18,60 \pm 4,56$) и выше, чем в своей плазме периферической крови ($11,03 \pm 2,49$ нмоль/мин·мг). ТФан Пл_от в 1,4 раза незначительно превышала контроль, составляя $40,40 \pm 10,69$, была близка к своей активности в Пл ($27,53 \pm 8,28$ нмоль/мин·мг). Таким образом, как в Пл_от, так и ПлБТот, оттекающих от органа, получаемых интраоперационно, исследование видов активности ТФ позволит судить об особенностях их опухолевой активности.

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.

Наряду с особенностями активности ТФ и АДА нами исследована опухолевая активность ферментов – антиоксидантов (таблица 2).

Таблица 2 – Активность ферментов обмена нуклеозидов и антиоксидантной системы в тканях немелкоклеточного рака легких (НМРЛ), карциномах желудка и кишечника (КЖК)

Ткани	Активность ферментов, нмоль/мин·мг; (медиана, квартили)							
	ТФк		АДА		СОД		ГПО	
	К	О	К	О	К	О	К	О
НМРЛ (n = 25)	96,1 (78,9; 129,4)	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 – контроль, нетрансформированная ткань; О – опухоль;
* – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$ по сравнению с индивидуальным контролем.

Согласно полученным данным, активность ферментов антиоксидантной системы (АОС) в образцах нетрансформированной слизистой желудка не отличалась от активности в слизистой оболочке кишечника. Активность СОД и ГПО в гомогенатах их карцином также не зависели от локализации ($p = 0,86$ и $p = 0,82$). Не выявлено достоверных отличий для активности ферментов обмена нуклеозидов в образцах нетрансформированных слизистых желудка по сравнению с активностью в слизистой кишечника. Их активность в карциномах также не связана с локализацией ($p = 0,57$ и $p = 0,62$). Для дальнейшего анализа материал объединили в группу карцином желудка и кишечника (КЖК). Для опухолевой активности СОД не установлено достоверных отличий по сравнению с нетрансформированными тканями, служившими индивидуальным контролем (табл. 2). При этом, как в образцах НМРЛ, так и в образцах КЖК активность ГПО была снижена по сравнению с нетрансформированными тканями. Выявлена отрицательная связь особенностей активности ГПО с патологией ($p = -0,47$; $p < 0,05$). Причем в КЖК активность ГПО была минимальной по сравнению с НМРЛ ($p = 0,002$).

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 (таблица 3, 4).

Для корректного их описания были выбраны кластеры активности СОД, чьи абсолютные значения минимальны среди исследовавшихся ферментов (таблица 3, 4). Важно, что данные по остальным ферментам соответствовали каждому индивидуальному образцу, отнесенному в конкретный кластер (далее – подгруппы 1 и 2) по активности СОД.

Таблица 3 – Активность ферментов (Е) АОС и обмена нуклеозидов в опухолях НМРЛ согласно кластерному делению на подгруппы по особенностям активности СОД

Кластеры	Активность ферментов, нмоль/мин·мг; (медиана, квартили)					
	НМРЛ 1гр			НМРЛ 2гр		
Е	Контроль	Опухоль	р	Контроль	Опухоль	р
СОД	0,8 (0,7; 0,9)	0,7 (0,6; 0,8)	0,08	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

Таблица 4 – Активность ферментов (Е) АОС и обмена нуклеозидов в опухолях КЖК согласно кластерному делению на подгруппы по особенностям активности СОД

Кластеры	Активность ферментов, нмоль/мин·мг; (медиана, квартили)					
	КЖК 1гр			КЖК 2гр		
Е	Контроль	Опухоль	р	Контроль	Опухоль	р
СОД	1,1 (0,8; 1,3)	1,0 (0,6; 1,1)	0,08	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)	0,01
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

Как в выборках карцином различных локализаций, так и в выделенных кластерах (подгруппы 1 и 2) сохранялась прямая сильная связь между увеличением активности ТФан и АДА (ранговый коэффициент Спирмена $\rho = 0,74$; $p < 0,001$). В кластерах были выявлены корреляции активностей ТФан и ТФк ($\rho = 0,47$; $p < 0,001$), а также АДА и ТФк ($\rho = 0,55$; $p < 0,001$). Это также может указывать на кооперативные сдвиги активности ферментов обмена

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

В отличие от активности АДА изменения активности ксантиноксидазы (КСО) в гомогенатах опухолей менялись не однонаправленно. Действительно, в большинстве случаев НМКРЛ (18 из 25; 72%), и в АКЖК (17 из 22; 77%) установлено повышение активности КСО по сравнению с нетрансформированными тканями, соответственно в 2,2 раза ($p = 0,01$) и в 1,9 раза ($p = 0,001$). Поскольку O_2^- , трансформирующийся затем в H_2O_2 – продукты её реакции, можем предположить эквивалентное нарастание их уровней на фоне повышения активности КСО. В тоже время, в ряде случаев, в образцах опухолей изучаемых локализаций достоверных различий между активностью КСО в опухоли по сравнению с индивидуальным контролем не выявлено. На первый взгляд, это противоречит установленному повышению активности АДА. В тоже время, известно об активации «запасных путей синтеза» нуклеотидов и пролиферации при опухолевом росте. Следовательно, можем предположить активное потребление продукта реакции, катализируемой АДА, в «запасных путях» ресинтеза нуклеотидов.

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^- и H_2O_2 , и 2-д-Д-Риб-1-Ф. Таким образом, кластерный анализ выявил метаболическую неоднородность среди опухолей одной локализации и морфологии.

Известно, о системном влиянии опухоли на организм, что опухолевой прогрессии сопутствует развитие анемического синдрома (Clelia Madeddu, 2018, Julia Bohlius, 2019), которое происходит на фоне развития «синдрома старения эритроцитов» и истощения эритропоэза. Кластерный анализ абсолютных значений ферментативной активности эритроцитов в каждой локализации выявил подгруппы (кластеры), где нарушения метаболизма были наиболее выражены (таблица 5).

Таблица 5 – Активность ферментов – антиоксидантов и аденозиндезаминазы в эритроцитах по результатам кластерного анализа, 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; 8,88)	4,28 ** (3,48; 6,84)

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

В этих подгруппах на фоне повышения активности СОД наблюдалось выраженное снижение активности ГПО. Причем эритроциты, выделенные во второй кластер при КЖК, отличались минимальной активностью, ниже в 4,2 раза контроля, но и в 1,7 раза ниже активности во втором кластере при НМРЛ ($p = 0,03$).

Можно отметить, что дисбаланс активности ферментов АОС при развитии рака может носить распространенный характер. При этом в эритроцитах наблюдается угнетение активности Zn-зависимой АДА, что связано с повышением клеточных уровней аденозина и усилением гемолиза (Миронова К. А., 2020). Снижение АДА специфично для эритроцитарной дисфункции, т.к. в тромбоцитах (ПлБТ и ПлБТот) она наоборот была повышена.

Следовательно, нами выявлена метаболическая неоднородность эпителиальных опухолей одной локализации, характеризующаяся повышением продукции H_2O_2 и 2-д-Д-Риб-1-Ф, что может способствовать кумулированию их сочетанных эффектов на процессы ангиогенеза, инвазии, устойчивости к апоптозу. Усиление прооксидантных процессов зачастую может носить распространенный характер. Эти ферментативные особенности были более характерны для вторых кластеров НМРЛ и КЖК. 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 активности ТФ (таблица 3, 4). Это могло привести к метаболическому стимулированию развития агрессивного фенотипа эпителиальной опухоли. Эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) регистрировали по ряду признаков (рисунок 3 – 5).

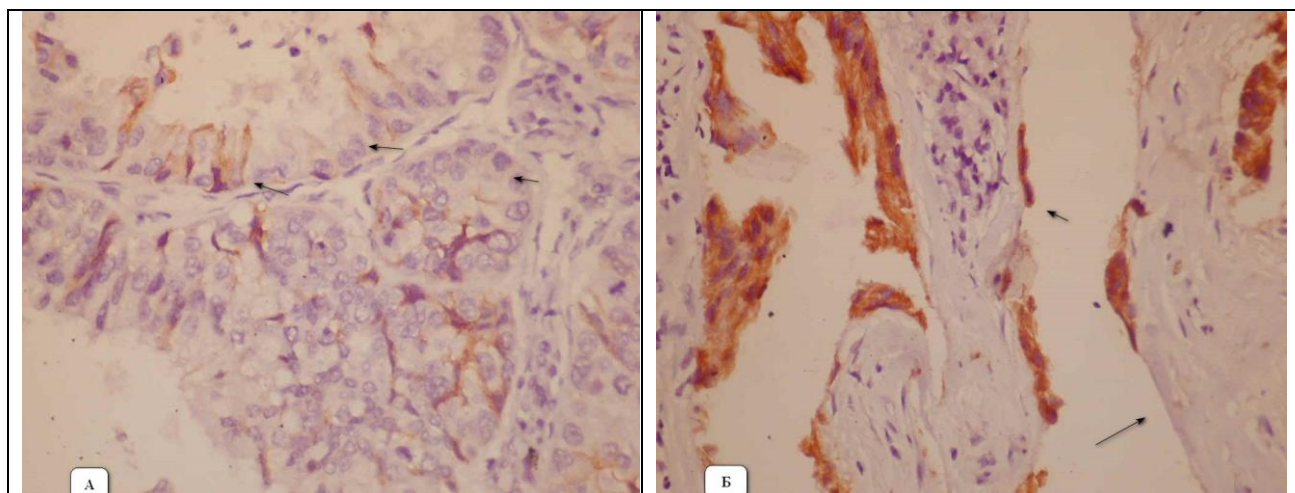


Рисунок 3 – Снижение экспрессии: А – Е-кадгерина; Б – панцитокератина AE1/AE3 (иммуногистохимическое (ИГХ) окрашивание с использованием антител; x400). Папиллярная аденокарцинома легких, 2-я подгруппа НМРЛ

В частности, наблюдали снижение (или отсутствие) мембранной экспрессии Е-кадгерина, появление её в цитоплазме опухолевых клеток (рисунок 3, А). Также снижалась экспрессия цитокератина AE1/AE3 и цитокератина 18 (рисунок 3, Б, рисунок 4, А).

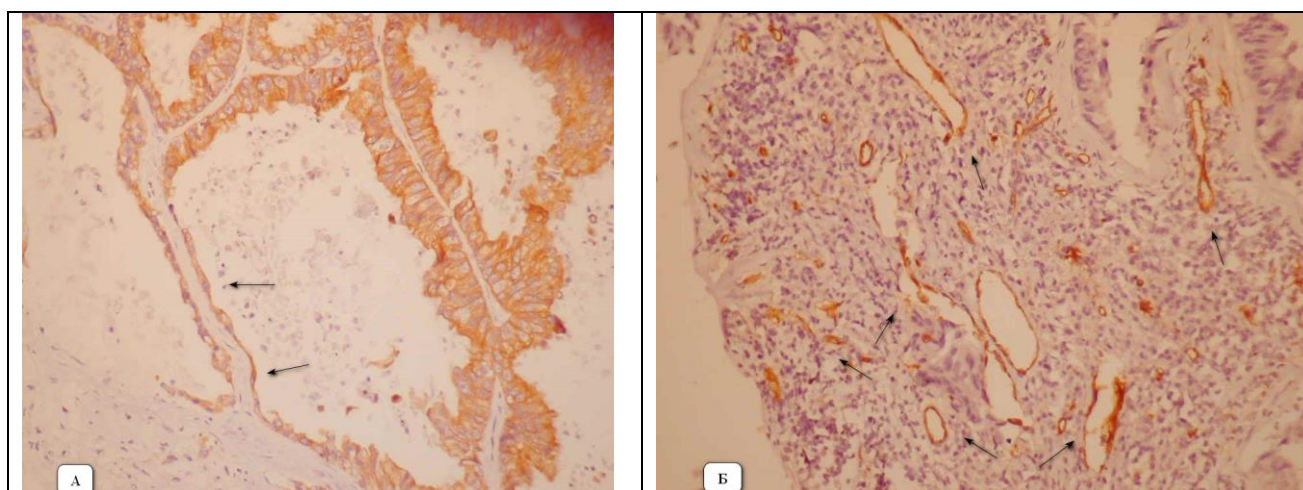


Рисунок 4 – Особенности экспрессии: А – цитокератина 18; Б – маркера эндотелиоцитов CD 34 (ИГХ окрашивание с использованием антител; x200). Папиллярная аденокарцинома легких, 2-я подгруппа НМРЛ

Некоторые клетки обособливались, вытягивались, приобретали фибробластоподобную форму (рисунок 4, А).

При этом появлялись признаки стволовых клеток (экспрессия маркера D2-40, рисунок 5, А), экспрессия мезенхимальных маркеров (виментина, рисунок 5, Б).

Данные эпителиальные опухоли характеризовались усиленным ангиогенезом (экспрессия CD34 была интенсивной, рисунок 4, Б).

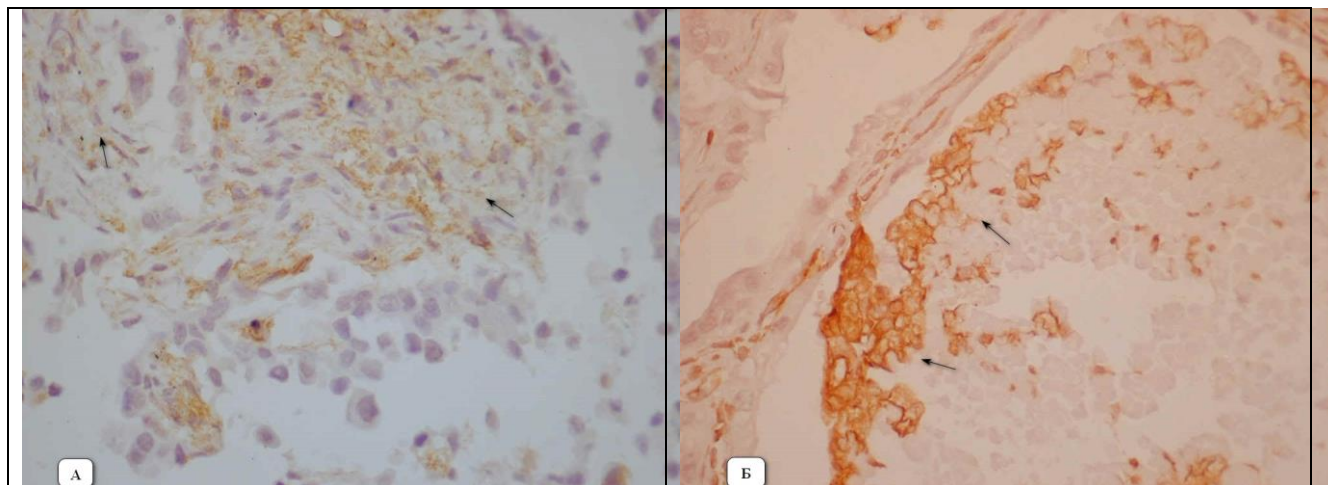


Рисунок 5 – Появление признаков стволовых клеток и экспрессия мезенхимальных маркеров (ИГХ окрашивание с использованием антител к: А – D2-40, Б – виментину; x400). Папиллярная аденокарцинома легких, 2-я подгруппа НМРЛ

Пролиферация 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 также снижалась. Это согласуется с неоднородностью видов активности ТФ, коррелировавших с индивидуальными особенностями экспрессии CD34 и Ki-67 (рисунок 1).

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 %).

Действительно, при сопоставлении с результатами патоморфологического исследования определили, что ЭМП наблюдалась преимущественно в опухолях, распределённых по результатам анализа во вторые кластеры, характеризовавшихся повышением уровней пероксида водорода и 2-д-Д-Рибозо-1-Фосфата (в 100 % образцов опухолей, составлявших 2-й кластер НМРЛ, и в 80 % образцов из 2-го кластера КЖК).

Можем предполагать, что впервые на клиническом материале нами выявлены метаболические особенности, способствующие стимулированию

ЭМП. Согласно анализу, 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 метаболитами (H_2O_2 и 2-д-D-Риб-1-Ф) опухолевой прогрессии.

Согласно данным литературы, они способны стимулировать сигнальные пути, активирующие ангиогенез, меняющие интенсивность пролиферации, стимулирующие миграционную активность клеток, т.ч. за счет экспрессии мезенхимальных маркеров (α -гладкомышечного актина, виментина). Сопоставив описанные в литературе свойства формируемых опухолью H_2O_2 и 2-д-D-Риб-1-Ф, составили частную схему метаболического стимулирования ЭМП (рисунок 6). 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 .

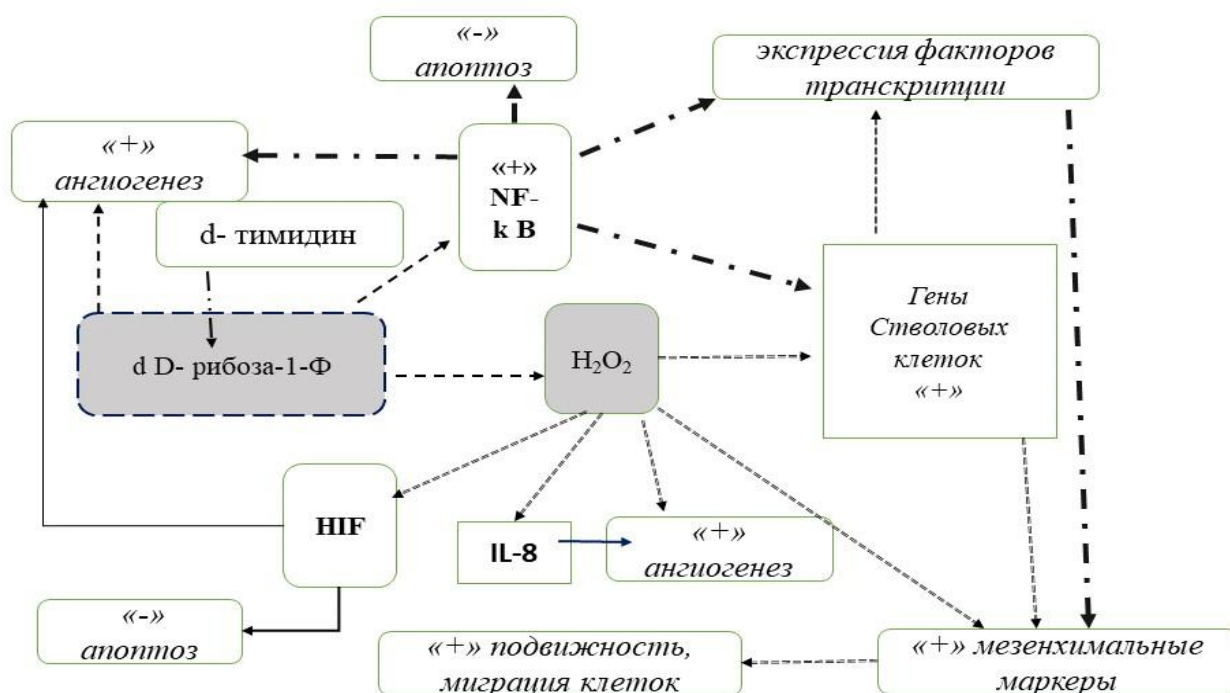


Рисунок 6 – Пероксид водорода и 2-дезоксид-D-рибозо-1-фосфат как пусковые факторы патогенеза эпителиально-мезенхимального перехода, реализуемого карциномой

Примечание: HIF- фактор, индуцируемый гипоксией; NF-kB – ядерный каппа В фактор.

Предполагаем, что индивидуальные метаболические особенности могут непосредственно способствовать активации сигнальных путей, обеспечивающих формирование агрессивных свойств опухоли, т.ч. реализующих эпителиально-мезенхимальный переход.

Наряду с особенностями активности металлоферментов исследовали содержание железа в образцах КЖК. В тканях аденокарцином желудка и кишечника медианные значения уровней железа составили 65,5 ((Q_1 ; Q_3), 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. Для металлов переменной валентности, прежде всего железа и меди, характерно неферментативное взаимодействие с H_2O_2 . Это ведет к формированию самой токсичной АФК – гидроксильного радикала и развитию его эффектов на микроокружение опухоли. 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 (Сучков М. Ю., 2022). 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 клетках 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). 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.

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 = $0,36$ (ρ 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 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, $p = 0,030$). 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-Д-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-Д-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 (ρ 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 клиничко-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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК, входящих в ядро РИНЦ

1. Bakurova E. M. Disorders of purines and pyrimidines metabolism in human gastrointestinal tract cancer [Текст]/ **Е. М. Bakurova**, К. А. Mironova, В. G. Borzenko // Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences – 2013. – Vol. 26, № 4. – Р. 369 – 371. DOI: 10.12923/j.2084-980X/26.4/a.02 *(Диссертантом проведено исследование активности тимидинфосфорилазы, аденозиндезаминазы, написана статья).*
2. Borzenko B. G. Activity of thymidilate "salvage pathway" enzymes in human gastric cancer and blood serum: correlation with treatment modalities [Текст]/В. G. Borzenko, **Е. М. Bakurova**, Y. A. Popovich, E. A. Sidyuk, A. Y. Popovich // Experimental Oncology – 2013. – V 35, №1. - Р. 37 – 40. *(Диссертантом выполнено исследование ряда биохимических показателей, их статистическая обработка и описание в основной части статьи).*
3. Zuikov S. A. Correlation of nucleotides and carbohydrates metabolism with pro-oxidant and antioxidant systems of erythrocytes depending on age in patients with colorectal cancer [Текст]/ S. A. Zuikov, В. G. Borzenko, O. P. Shatova, **Е. М. Bakurova**, G. E. Polunin // Experimental Oncology – 2014. – V. 36, № 2. - Р. 117 – 120. *(Диссертантом выполнен фрагмент работы).*
4. 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. *(Диссертантом выполнено исследование биохимических показателей, статистическая обработка, написана статья).*
5. Василенко И. В. Опухолевое микроокружение в основных гистологических типах рака желудка [Текст]/ И. В. Василенко, Р. Б. Кондратюк, **Е. М. Бакурова**, Р. В. Бузина // Клиническая и экспериментальная морфология. - 2015. - № 4 (16). - С. 9 - 14. *(Диссертантом выполнено исследование ферментативной активности, написан фрагмент статьи).*
6. Бакурова Е. М. Перспективы использования ферментативного теста при гастроинтестинальном раке и раке легких [Текст]/ **Е. М. Бакурова**, Р. В. Бузина, И. В. Василенко, Б. Г. Борзенко // Профилактическая и клиническая

медицина. - 2015. - № 3 (56). - С. 98 - 101. *(Проведены биохимические исследования, написана статья).*

7. Василенко И. В. Особенности фибробластов стромы и их связь с инвазивностью и эпителиально-мезенхимальной трансформацией основных гистологических типов рака [Текст]/ И. В. Василенко, Р. Б. Кондратюк, К. В. Поляков, **Е. М. Бакурова** // Профилактическая и клиническая медицина. - 2015. - № 4 (57). - С. 57 - 61. *(Проведены биохимические исследования, проанализирован и описан материал).*

8. Бакурова Е. М. Тимидинфосфорилаза и возможная связь с формированием особенностей фенотипа рака легких [Текст]/ **Е. М. Бакурова**, Р. В. Бузина, Р. Б. Кондратюк, О. К. Гульков, И. В. Василенко, Б. Г. Борзенко // Патология. - 2015. - № 1 (33). - С. 53-55 *(Проведены исследования ферментативной активности, статистическая обработка и анализ результатов, написана статья).*

9. Борзенко Б. Г. Свойства и функции белка TP/PD-ECGF – фермента и фактора ангиогенеза в норме и при неопластической патологии [Текст]/ Б. Г. Борзенко, А. А. Федорова, **Е. М. Бакурова**, Е. В. Богатырева // Вопросы онкологии. – 2021. - Т. 67, № 6. – С. 746 – 754. DOI 10.37469/0507-3758-2021-67-6-746-754. (ВАК РФ). *(Диссертантом выполнен описываемый эксперимент, поиск источников литературы, анализ данных).*

10. Бакурова Е. М. Особенности активности ферментов обмена нуклеозидов и антиоксидантной системы в солидных опухолях [Текст] / **Е. М. Бакурова**, И. В. Василенко, Ю. Д. Турсунова, Н. М. Добаева, Б. Г. Борзенко, В. Н. Ельский // Российский биотерапевтический журнал. - 2022. – Т. 21, № 2. - С. 73 – 81. DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-2-73-81 (ВАК РФ). *(Диссертантом выполнено исследование биохимических показателей, написание статьи).*

Статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК

11. Бакурова Е. М. Возможность использования биохимических исследований при формировании групп повышенного онкологического риска [Текст] / **Е. М. Бакурова**, Б. Г. Борзенко, А. М. Белозерцев // Новообразование. – 2007. – № 2. - С. 60 - 68. *(Проведены биохимические исследования, проанализирован и описан материал).*

12. Жебеленко Я. Г. Особенности взаимодействия ключевых ферментов углеводного обмена и системы антирадикальной защиты эритроцитов у больных язвенной болезнью и раком желудка [Текст]/ Я. Г. Жебеленко, **Е. М. Бакурова**, Б. Г. Борзенко // Архив клинической и экспериментальной медицины. - 2012. - Т. 21, № 1. - С. 37 - 41. *(Диссертантом проведено исследование ферментов антиоксидантной системы, выполнена статистическая обработка данных, сформулированы выводы).*

13. Бакурова Е. М. Некоторые патохимические механизмы развития гемической гипоксии у больных раком желудка [Текст] / **Е. М. Бакурова**, К. А. Миронова, С. А. Зуйков, О. А. Верхова // Таврический медико-биологический вестник. - 2012. - Т. 15. - № 3-2. - С. 31-33. *(Диссертантом выполнено биохимическое исследование, написание статьи).*

14. Василенко И. В. Проплиферация опухолевых клеток, ангиогенез, особенности метаболизма при эпителиально-мезенхимальной трансформации рака легкого [Текст] / И. В. Василенко, Б. Г. Борзенко, **Е. М. Бакурова**, Р. Б. Кондратюк // Питання експериментальної та клінічної медицини – 2013. – Вип. 17, Т. 2 – С. 160 – 164. *(Диссертантом виконано біохімічне дослідження, написання статті).*
15. Bakurova E. M. The possibility of the enzymatic test application for efficacy estimation of 5-fluorouracil in patients with gastrointestinal cancer [Текст]/ **Е. М. Bakurova**, B. G. Borzenko, K. A. Mironova // Клінічна фармація. - 2013. - Т. 17, № 4. - С. 12 -14. *(Диссертантом проведено дослідження активності тимидинфосфорилази, виконана статистична обробка даних, написання статті).*
16. Борзенко Б. Г. Перспективы индивидуализации химиотерапии фторпиримидинами гастроинтестинального рака [Текст]/ Б. Г. Борзенко, **Е. М. Бакурова**, К. А. Миронова, Л. П. Резниченко, Ю. А. Попович // Университетская клиника. - 2013. - Т. 9, № 1. - С. 62 - 64. *(Диссертантом виконан експеримент, написання статті).*
17. Василенко И. В. Влияние особенностей паренхимы основных гистологических типов рака желудка на воспалительную и иммунноклеточную инфильтрацию в них [Текст] / И. В. Василенко, И. А. Колесникова, Р. Б. Кондратюк, **Е. М. Бакурова** // Медицинская наука и образование Урала. - 2016. - Т. 17, № 2 (86). - С. 54 – 57. *(Диссертантом виконано дослідження тимидинфосфорилази, аналіз результатів експеримента).*
18. **Бакурова Е. М.** Взаимосвязь активности тимидинфосфорилазы с индивидуальными особенностями пролиферации и ангиогенеза опухолей основных локализаций [Текст]// Новообразование. – 2017. – № 1 (16). - С. 69 - 72. *(Работа выполнена самостоятельно).*
19. Василенко И. В. Морфологические особенности паренхимы и стромы основных гистологических форм рака легких [Текст] / И.В. Василенко, И. А. Колесникова, Р. Б. Кондратюк, **Е. М. Бакурова** // Медицинская наука и образование Урала. - 2017. - Т. 18, № 3 (91). - С. 27 - 33. *(Диссертантом виконано дослідження тимидинфосфорилази, аналіз результатів експеримента і їх описання).*
20. Зуйков С. А. Повышение активности ферментов катаболизма пуринов как один из факторов патогенеза злокачественных новообразований [Текст] /С. А. Зуйков, **Е. М. Бакурова**, Е. В. Хомутов, Ю. Д. Турсунова // Новообразование. – 2021. – Т. 13, № 2 (33). - С. 86 - 90. *(Диссертантом виконан аналіз результатів експеримента).*
21. Зуйков С. А. Исследование взаимосвязи показателей углеводного и нуклеотидного обменов с антиоксидантной системой эритроцитов больных раком прямой кишки различного возраста [Текст]/ С. А. Зуйков, Г. Е. Полунин, **Е. М. Бакурова**, Ю. Д. Турсунова // Архив клинической и экспериментальной медицины – 2022. – Т. 31. - № 2. - С. 177 - 182. *(Диссертантом виконан аналіз результатів експеримента).*

22. **Бакурова Е. М.** Эпителиально-мезенхимальный переход опухоли: молекулярные особенности патогенеза [Текст]/ Е. М. Бакурова, И. И. Пацкань // Университетская клиника. – 2022. – № 3(44). – С. 27-31. *(Диссертантом выполнен эксперимент, написание статьи)*.

23. **Бакурова Е. М.** Некоторые метаболические особенности карцином при формировании их агрессивных свойств [Текст]/ Е. М. Бакурова, И. И. Пацкань, Р. Б. Кондратюк, О. С. Антропова, Д.В. Чуркин, Е. И. Золотарева// Архив клинической и экспериментальной медицины – 2022 – Т. 31(4) – С. 358 – 363. *(Диссертантом выполнен эксперимент, написание статьи)*.

Зарубежные электронные издания (Open access journals)

24. Borzenko B. G. Role of Thymidine kinase and Thymidine Phosphorylase as Enzymatic Test for Efficacy of Oncological Patients Treatment [Текст]/ B. G. Borzenko, **Е. М. Bakurova**, K. A. Mironova, Y. D. Tursunova, Y. V. Dumanskiy // (USA, электронный ресурс) Metabolomics. – 2013. - Vol. 3:123. doi:10.4172/2153-0769.1000123 *(Диссертантом выполнена статистическая обработка данных, написание статьи)*.

25. Borzenko B. G. A Double-Function of PD-ECGF/TP Protein that Predict Response to Target Chemotherapy [Текст]/B. G. Borzenko, **Е. М. Bakurova**, K. A. Mironova // (USA, электронный ресурс) Metabolomics. –2015.- Vol. 5, № 2: e136. doi: 10.4172/2153-0769.1000e136 *(Диссертантом проведено исследование активности тимидинфосфорилазы, выполнена статистическая обработка данных)*.

26. Borzenko B. G. Role of Thymidine Phosphorylase/Platelet-Derived Endothelial Cell Growth Factor in Health and Cancer Growth [Текст]/ B. G. Borzenko, **Е. М. Bakurova**, K. A. Mironova, A.Y. Azarchov // (USA, электронный ресурс) JJEЕ. – 2015. – Vol. 1(2): 009. *(Диссертантом выполнен фрагмент эксперимента, статистический анализ данных, разработана концепция статьи, поиск источников цитирования)*.

27. Borzenko B. G. Age-Specific Features of the Enzymatic Proliferation Markers upon the Cancer of Different Localisations [Текст]/ B. G. Borzenko, **Е. М. Bakurova**, K. A. Mironova, Y. D. Tursunova // (India, электронный ресурс) Highlights on Medicine and Medical Research – 2021. – Vol. 10 – P. 61 - 71. *(Диссертантом проведено исследование ферментативной активности, выполнена статистическая обработка данных, написана основная часть статьи)*.

Статьи в журналах, индексируемых в РИНЦ, в сборниках

28. **Бакурова Е. М.** Особенности образования перекиси водорода в эпителиальных опухолях [Текст]// Евразийский союз ученых. - 2015. - № 8-2 (17). - С. 7 - 9. *(Работа выполнена самостоятельно)*.

29. **Бакурова Е. М.** Особенности энергетического метаболома эритроцитов у больных раком распространенных стадий [Текст]// Актуальные вопросы биологической физики и химии. – 2016. – Т. 2, № 2. – С. 175 - 178. *(Работа выполнена самостоятельно)*.

30. **Бакурова Е. М.** Маркеры дисфункции эритрона у больных с диссеминированными формами рака [Текст] // Сборники конференций НИЦ Социосфера. - 2016. - № 56. - С. 316 -320. *(Работа выполнена самостоятельно)*.
31. **Бакурова Е. М.** Возрастные особенности метаболизма эритроцитов у пациентов с распространенными формами рака [Текст] // В сборнике: Университетская наука: взгляд в будущее Материалы международной научно-практической конференции, посвященной 81-летию Курского государственного медицинского университета и 50-летию фармацевтического факультета. В 3-х томах. - 2016. – Т. 1. - С. 60 - 63. *(Работа выполнена самостоятельно)*
32. **Бакурова Е. М.** Особенности генерации 2-дезоксид-рибозо-1-фосфата опухолью, связь с продукцией активных форм кислорода [Текст] // Актуальные вопросы биологической физики и химии. – 2018. – Т. 3, № 3. – С. 584 - 587. *(Работа выполнена самостоятельно)*.
33. **Бакурова Е. М.** Перспективы использования тимидинфосфорилазы в клинической лабораторной диагностике [Текст] // В сборнике научных трудов 2-й Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Современные достижения химико-биологических наук в профилактической и клинической медицине». 2–3 декабря 2021 года; под ред. А.В. Силина, Л.Б. Гайковой. — СПб.: Изд-во СЗГМУ им. И.И. Мечникова, 2021. — 360 с. (с. 220 - 226). *(Работа выполнена самостоятельно)*.
34. **Бакурова Е. М.** Особенности метаболизма эпителиальной опухоли при её мезенхимальном переходе [Текст] // Актуальные вопросы биологической физики и химии. – 2022. – Т. 7, № 4. – С. 604 - 607. *(Работа выполнена самостоятельно)*.
35. Василенко И. В. Пролиферация опухолевых клеток в сопоставлении с распространённостью ЭМТ в раках различной локализации (желудка, легкого, почки) [Текст] / И. В. Василенко, Б. Г. Борзенко, **Е. М. Бакурова** и др. // Питання експериментальної та клінічної медицини – 2012. – Вип. 16, Т 4 – С. 193 – 197. *(Диссертантом виконано біохімічне дослідження, розроблена концепція і виконано написання статті)*.
36. Бакурова О. М. Особливості метаболізму еритроцитів у онкохворих [Текст] / **О. М. Бакурова**, К. С. Агекян, А. А. Горбачов, Б.Г. Борзенко // Перспективи медицини та біології. - 2012. - Т. IV. - № 1. - С. 85 - 87. *(Диссертантом виконано біохімічне дослідження, обробка і описання результатів)*.
37. Миронова К. А. Дисметаболические процессы и дезорганизация гликокаликса эритроцитов при развитии анемии у онкобольных [Текст] / К. А. Миронова, **Е. М. Бакурова** // Сборник материалов IV Межрегиональной научно-практической конференции «Диагностика и лечение анемии в XXI веке». Современные вопросы гематологии в педиатрической, акушерской и онкологической практике. 5 -7 октября 2017 г. – Рязань: ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России. – 2017. - С. 81 - 83. *(Диссертантом выполнен фрагмент исследования, анализ результатов, разработка концепции статьи)*.
38. Бакурова Е. М. Перспективы использования ферментативного теста при гастроинтестинальном раке и раке легких [Текст] / **Е. М. Бакурова**, Р. В. Бузина Р.В., Василенко И.В., Борзенко Б.Г. // Материалы Международной

научно-практической конференции „Инновационные перспективы здравоохранения Донбасса”, Донецк, 21мая 2015 г. – с. 50 – 55. (*Диссертантом опублікована стаття, підготовлен доповідь на конференцію*).

39. Бакурова Е. М. О роли эритроцитов в перераспределении железа в тканях у больных раком распространенных стадий [Текст] / **Е. М. Бакурова**, В. С. Дорошкевич, Н. М. Добаева, Ю. Д. Турсунова // Актуальные вопросы биологической физики и химии. – 2020. – Т. 5, № 4. – С. 584 - 587. (*Диссертантом проведено біохімічне дослідження, аналіз і сопоставление результатов, написание статьи*).

Декларационный патент

1. Пат. 71346 Україна, А61К. Спосіб ранньої діагностики пухлинного процесу [текст] / О. М. Бакурова, Б. Г. Борзенко; № 201115605; заявл. 29.12.2011; опубл. 10.07.2012, Бюл. Промислова власність №13. – 4 с.

Работы апробационного характера

40. Comparative study of pro- and antioxidant systems enzyme activity in tumor and surrounding normal tissues [Текст] / B. Borzenko, S. Zuikov, **E. Bakurova**, T. Moroz, O. Shatova, I. Zincovich // Abstract book, 6-th International Congress of Pathology. – ISP – 22-25 September, Montreal, Canada. – 2010. – P. 62.

41. The activity of adenosine deaminase in erythrocytes and leukocytes is normal even in cases of neoplastic pathology / **E. M. Bakurova**, K. A. Mironova, T. V. Moroz, B. G. Borzenko // Acta Biochimica Polonica, Abstracts VIII Parnas Conference. –2011. - Vol. 58, Suppl. 1. - 27-31 August, Warsaw, Poland. – P. 66.

42. An increase of tissues iron levels as a possible factor of tumor progression [Текст] /**E. M. Bakurova** //Abstract book, VII Lviv-Lublin conference of Experimental and Clinical Biochemistry. - May 23-24, 2013. - Lviv, Ukraine. - P. 6.

43. How relevant is the enzymatic test for treatment of cancer [Текст] / B. Borzenko, **E. Bakurova**, K. Mironova // Abstract book, VII Lviv-Lublin conference of Experimental and Clinical Biochemistry. - May 23-24, 2013. - Lviv, Ukraine - P. 18.

44. Cellular interactions during gastrointestinal cancer development [Текст] / B. G. Borzenko, **E. M. Bakurova**, K. A. Mironova, O. A. Verhova// Programme book. 17th-ECCO -38th- ESMO – 32nd-ESTRO European Cancer Congress. - Amsterdam, the Netherlands, 2013. - P. 259.

45. Особливості обміну модулятора ендотеліальної функції в еритроцитах при старінні організму та у хворих похилого віку із гастроінтестинальним раком [Текст] / **Е. М. Бакурова** // Кровообіг та гемостаз. – 2015. - № 1 -2. (Науково-практична конференція «Ендотеліальна дисфункція при вік-залежній патології – діагностика, профілактика, лікування», м. Київ, 12-13.11.2015р.) - С. 61 – 62.

46. Особенности метаболизма эритроцитов при эндотелиальной дисфункции у онкобольных [Текст] / **Е. М. Бакурова**, Н. М. Добаева // VIII Всероссийская научная конференция с международным участием «Современные направления биохимии человека», г. Санкт-Петербург - 3-5.12.2015 г.- С. 15.

47. Тимидинфосфорилаза – перспективный маркер эпителиально-мезенхимальной трансформации опухоли [Текст] / **Е. М. Бакурова**, Б. Г. Борзенко, И. В. Василенко // Медицинский алфавит. – 2016. – Т. 3, № 16.

(«Консолидация лабораторной медицины и клинической практики: диагностические инновации, лабораторная индустрия»: материалы Общероссийской междисциплинарной научно-практич. конференции с междунар. участием, 14 – 16 сентября 2016 г.) – С. 31 – 32.

48. Тимидинфосфорилаза и индивидуализация терапии фторпиримидинами [Текст] / **Е. М. Бакурова**, Б. Г. Борзенко, И. В. Василенко, Р. Б. Кондратюк, Б. П. Кондратюк // Российский биотерапевтический журнал. – 2016. – Т. 15, № 1. («Отечественные противоопухолевые препараты»: материалы XIII Всероссийской научно-практич. конференции с междунар. участием, г. Москва, 17 – 18 марта 2016г.) – С. 8 – 9.

49. Особенности метаболизма пероксида водорода в опухолях при их эпителиально-мезенхимальном переходе [Текст] / **Е.М. Бакурова**, Р.Б. Кондратюк, Ю.Д. Турсунова // Актуальные вопросы биологической физики и химии. БФФХ-2022: материалы XVII Международной научной конференции, г. Севастополь, 19-23 сентября 2022 г. – Севастополь, 2022. – С. 107 – 108.

АННОТАЦИЯ

Бакурова Елена Михайловна. Активность Особенности активности металлоферментов в карциномах различных локализаций. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 3.3.3 – патологическая физиология. Государственная образовательная организация высшего профессионального образования «Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького», МЗ ДНР РФ, г. Донецк, 2022.

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 перспективными 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 $p = 0,44$ ($p < 0,05$). Для ТФан ПлБТ и уровней ядерной экспрессии Ki-67 в опухоли r Кендалла = 0,37; p 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 фосфоориазной 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-Д-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-Д-Риб-1-Ф и H_2O_2 , способных активировать сигнальные пути, обеспечивающие формирование агрессивных свойств опухоли.

Ключевые слова: ферменты, эпителиально-мезенхимальный переход, эритроциты, плазма, богатая тромбоцитами.

SUMMARY

Bakurova E. M. Metalloenzyme activity in blood cells and tissues different localization carcinomas. – The manuscript.

Dissertation for the degree of doctor of medical sciences in the specialty 3.3.3 - pathological physiology. - State Educational Organization of Higher Professional Education "Donetsk National Medical University named after M. Gorky", Ministry of Health of the DPNR of the Russian Federation, Donetsk, 2022.

In the dissertation research the new decision of an actual scientific problem of identifying metabolic features in the formation of an aggressive phenotype of an epithelial tumor. The problem was solved by determining the indicated metabolic features in epithelial-mesenchymal transition (EMT) of epithelial tumors of different localizations. This approach helped to establish and describe the pathogenic relationship between the features of pro-oxidative processes, the production of 2-deoxy-D-ribose-1-phosphate and the formation of individual aggressive properties among tumors of the same morphology and localization.

It was found that the in non-small cell lung carcinoma (NSCLC), gastric and intestinal solid tumors (GCLC) we found 1.8-fold ($p = 0.002$) and 1.7-fold (for NSCLC, 1.9-fold for GCLC; $p = 0.001$) increase of TPc activity on average. Besides increase of "classical" phosphorylase activity of TP in tumor tissues we also registered increase of its deoxyribosyltransferase activity (so called TPan) more than 1.5 times (respectively, for NSCLC $p = 0.002$; for CLL $p = 0.001$). Correlations were found for ADA and TPan activities that were more pronounced in tumors compared to controls ($\rho = 0.74$ and $\rho = 0.34$; $p < 0.05$). Consequently, alternative resynthesis of deoxythymidine nucleoside, which is a substrate for thymidine kinase, a proliferation marker, creates preconditions for the "salvage pathway" activation of dTMP synthesis described in tumors.

Due to the established correlations with the levels of nuclear expression of Ki-67 and CD34, the types of TP activity may become their promising biochemical indicators. It has been established that an alternative tissue homogenate material can be platelet-rich blood plasma from the tumor. For routine activity studies performed in peripheral blood, platelet-rich plasma (PRP) is more informative than plasma or serum. In comparison, only PRP showed weak correlations with tissue indices. For TPc and CD34, Kendall's pairwise correlation coefficient $r = 0.36$; Spearman's rank correlation $\rho = 0.44$ ($p < 0.05$). For TPan PRP and Ki-67 nuclear expression levels in the tumor, Kendall's $r = 0.37$; Spearman's $\rho = 0.54$ ($p < 0.05$).

A cluster analysis of the enzymatic activity features of the studied NSCLC tumors, as well as GCC, revealed their metabolic heterogeneity. According to its results, tumors of different localization were distinguished into 2 clusters. Common feature to their second clusters was an increase the SOD activity. It was accompanied by increase of TP activity ($p = 0.045$ for NSCLC; $p = 0.049$ for GCC). Therefore, both hydrogen peroxide and 2-d-D-Rib-1-P could be formed in them more intensively. It is important to note that morphological indicators of tumor aggression (decreased or lost expression of cell-cell adhesion marker, expression of mesenchymal markers, active angiogenesis) were detected more frequently in these subgroups.

The obtained results reveal that individual features of the enzymes activity in epithelial tumors may be available source of 2-d-D-Rib-1-P and hydrogen peroxide generation in human cancer cells. In the case of individual higher tumor activity of TP and SOD and low GPO activity the metabolic stimulation of tumor progression may be occur.

Key words: *enzymes, epithelial-mesenchymal transition, erythrocytes, platelet-rich plasma.*

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АДА	аденозиндезаминаза
АОС	антиоксидантна система
АФК	активные формы кислорода
H ₂ O ₂	пероксид водорода
ГПО	глутатионпероксидаза
КСО	ксантиноксидаза
СОД	супероксиддисмутаза
НМРЛ	немелкоклеточный рак легких
ПлБТ	плазма периферической крови, богатая тромбоцитами
ПлБТот	богатая тромбоцитами плазма крови, оттекающей от опухоли
РЖ	рак желудка
РК	рак кишечника
РЛ	рак легких
ТФан	трансферазная активность тимидинфосфорилазы
ТФк	фосфорилазная активность тимидинфосфорилазы
ЭМП	эпителиально-мезенхимальный переход

Подписано в печать 21.01.2023.

Формат 60x84¹/₁₆. Бумага офсетная 80 г/м². Гарнитура Таймс.

Печать цифровая. Усл. печ. л. 1,87. Заказ № 118. Тираж 100 экз.

Изготовлено ФЛП «Сидоров С.П.»,

Свидетельство № 09452

83003, г. Донецк, ул. Разенкова, 6

Тел.: 071-324-23-44, 050-211-37-00

e-mail: goldbook-@mail.ru