

УДК 577.125

**ИЗМЕНЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ОКСИДА АЗОТА
И АКТИВНОСТИ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ
В КРОВИ БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

© 2011 г.

*И.Е. Окрут¹, Д.А. Шакерова², Т.А. Веселова²*¹ Нижегородская государственная медицинская академия² Нижегородский госуниверситет им. Н.И. Лобачевского

dinara.shakerova@mail.ru

Поступила в редакцию 05.08.2011

Проведена оценка состояния сосудистого эндотелия по количеству NO, а также исследован уровень свободнорадикального окисления в крови пациентов с раком молочной железы до и после лечения. В плазме крови онкологических больных до лечения показано накопление NO и активация свободнорадикального окисления. Лечение в комплексе с озонотерапией приводило к нормализации уровня NO в крови онкологических больных.

Ключевые слова: дисфункция эндотелия, оксид азота, свободнорадикальное окисление, озонотерапия.

Введение

У больных злокачественными новообразованиями с развитием заболевания возникают выраженные патологические нарушения функции многих органов. Опухоль оказывает депрессивное влияние на системы и структуры всего организма больного в результате воздействия биологически активных продуктов метаболизма злокачественного роста. Существует предположение, что биологически активные метаболиты, выделяемые в процессе жизнедеятельности раковых клеток, оказывают негативное влияние на эндотелий сосудов [1]. Эндотелиальная дисфункция, в свою очередь, определяет тяжесть течения заболевания и эффективность выбранной терапии.

Эндотелий – однослойный пласт специализированных клеток мезенхимного происхождения, выстилающих кровеносные, лимфатические сосуды и полости сердца. Среди избытка биологически активных веществ, вырабатываемых эндотелием, важнейшим является оксид азота – NO. Открытие ключевой роли NO в сердечно-сосудистом гомеостазе было удостоено Нобелевской премии в 1998 году. Нормально функционирующий эндотелий отличается непрерывной выработкой NO с помощью эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) из L-аргинина [2]. Это необходимо для поддержания нормального тонуса сосудов. В то же время, NO подавляет пролиферацию гладкой мускулатуры сосудов, предотвращает патологическую перестройку сосудистой стенки, прогрессирование атеросклероза [3]. Это определило выбор нами оксида азота в качестве маркера состояния сосудов эндотелия.

В высоких концентрациях NO может оказывать на клетки токсический эффект, связанный с образованием сильного окислителя, очень реакционного и токсичного свободнорадикального соединения – пероксинитрита (ONOO⁻). Пероксинитрит образуется при взаимодействии NO с супероксидным анион-радикалом (O₂⁻). В клетках, подвергнутых действию высоких концентраций NO, нарушается энергетический обмен и синтез ДНК. В организме с опухолью эта способность оксида азота используется для уничтожения опухолевых клеток макрофагами, которые не только сами производят NO, но и секретируют фактор некроза опухолей, вызывающий индукцию NOS в опухолевых и других клетках [4]. Цель настоящего исследования – оценка уровня продукции NO и состояния свободнорадикального окисления при раке молочной железы (РМЖ) на фоне применяемой терапии с включением озонотерапии.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования служила плазма крови больных раком молочной железы до и после лечения. Всего было проанализировано 50 проб крови пациенток, находившихся в стационаре Нижегородского областного онкологического диспансера до лечения и 35 проб крови после проведенной традиционной терапии с включением озонотерапии. Озонированный раствор вводили внутривенно капельно, 10 процедур через день. Концентрация озона в оксигенной газовой смеси составляла 400–600 мкг/мл. В контрольную группу вошли 28 проб практически здоровых людей, сопоставимых по возрасту с основной группой больных.

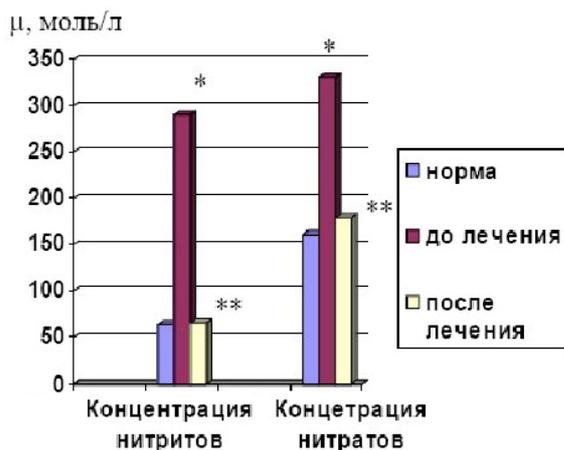


Рис. Содержание нитритов и нитратов в крови больных РМЖ. * – Различия достоверны по сравнению с контролем ($p < 0.05$), ** – различия достоверны по сравнению с показателями до лечения ($p < 0.05$)

На наш взгляд, NO является наиболее информативным показателем для оценки статуса работы эндотелиального пласта при такой системной патологии, как рак молочной железы. Для оценки функционирования эндотелия в плазме крови определяли содержание оксида азота по методике П.П. Голикова [5]. О концентрации оксида азота в крови судили по содержанию его конечных метаболитов – нитратов и нитритов, как наиболее верифицированных маркеров оценки метаболизма оксида азота. Метод основан на получении красной окраски раствора, содержащего нитрит, при добавлении к нему реагентов: сульфаниламида (белого стрептоцида) и N-(1-нафтил)этилендиамина дигидрохлорида (НЭДА) – реакция Грисса. Нитраты определяли косвенным путем, для чего их восстанавливали до нитритов, пропуская через подготовленный субстрат – губчатый кадмий. Уровень нитратов и нитритов оценивали в безбелковом экстракте. Измерения концентраций проводили с помощью спектрофотометра APEL PD 303 (Япония) при длине волны 546 нм в кювете длиной 10 мм по отношению к контролю. В качестве стандарта использовали эталонный раствор с концентрацией нитритов 50 μмоль/л. Расчет проводили по формуле

$$C = \frac{E_0}{E_k} \times 50, \quad (1)$$

где C – концентрация нитритов и нитратов, E_0 – экстинция опыта, E_k – экстинция эталона, 50 – концентрация нитритов в эталонном растворе. Содержание нитритов и нитратов выражали в μмоль/л плазмы крови.

Уровень свободнорадикального окисления тестировали по содержанию молекулярных продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и методом индуцированной биохемилю-

минесценции. Содержание продуктов перекисного окисления липидов (диеновых конъюгатов – ДК, триеновых конъюгатов – ТК, оснований Шиффа – ОШ) определяли спектрофотометрически по И.А. Волчегорскому и выражали в относительных единицах оптической плотности [6]. Для регистрации индуцированной биохемилюминесценции использовали прибор биохемилюминометр (БХЛ-07, Н. Новгород), сопряженный с компьютером IBM PC/AT в диалоговом режиме. Результат измерений распечатывали в унифицированной форме в виде хемилюминограммы с расчетом следующих параметров:

– индекс I_{\max} (mv) – максимальная интенсивность свечения, показывающая потенциальную способность биологического объекта к свободнорадикальному окислению, в том числе и перекисному окислению липидов;

– индекс S (mv) – светосумма хемилюминесценции за 30 секунд, величина, соответствующая обрыву цепи свободнорадикального окисления и поэтому обратно пропорциональная антиоксидантной активности пробы крови.

Результаты и их обсуждение

NO, соединяясь с кислородом, способен превращаться в нитраты, которые затем восстанавливаются до нитритов. Нитраты – соли азотной кислоты – не относятся к ядовитым веществам, но представляют опасность тем, что из них образуются нитриты – соли азотистой кислоты. Именно нитриты могут оказывать токсическое действие на организм, как прямое, так и опосредованное, через образование других вредных веществ, например нитрозаминов. Нитриты в высоких концентрациях реагируют с гемоглобином крови, образуя метгемоглобин. Метгемоглобин не может выполнять функции переносчика кислорода, что приводит к гипоксии (кислородному голоданию) тканей [7].

Как показали наши исследования, в крови больных раком молочной железы до лечения наблюдалась повышенная концентрация нитритов (в 3 раза) и нитратов (в 2 раза) по сравнению с показателями группы здоровых лиц (рисунок). Известно, что в очаге воспаления накапливается продукт частичного восстановления кислорода – супероксидный анион-радикал. NO и супероксид-анион подвергаются быстрому радикал-радикальному взаимодействию с образованием медиатора окислительного клеточного повреждения – пероксинитрита. Пероксинитрит повреждает сосудистый эндотелий, увеличивает агрегацию тромбоцитов. Пероксинитрит проходит через внешнюю и внутреннюю мембраны клеток и, оказавшись внутри клетки, поврежда-

Таблица 1

Содержание молекулярных продуктов ПОЛ в крови больных раком молочной железы

Показатель	Контроль	До лечения	После лечения
ДК, отн. ед.	0.17±0.05	0.23±0.01*	0.22±0.01
ТК, отн. ед.	0.04±0.001	0.11±0.02*	0.10±0.11
ОШ, отн. ед.	3.25±0.25	14.44±1.07*	12.93±1.06

* Различия достоверны по сравнению с контролем ($p < 0.05$).

Таблица 2

Показатели биохемилюминесценции в крови больных раком молочной железы

Показатель	Контроль	До лечения	После лечения
I_{\max}	1.25±0.12	2.88±0.28*	2.59±0.08
S	14.0±1.5	22.91±0.79*	22.26±0.12

* Различия достоверны по сравнению с контролем ($p < 0.05$).

ет ДНК клетки-мишени путем ее дезаминирования, а также ингибирования рибонуклеотид-редуктазы, которая регулирует скорость репликации ДНК [8]. Также пероксинитрит окисляет белки и липиды клеточных мембран. Известно, что в присутствии пероксинитрита или продуктов его распада образуются тиольные радикалы глутатиона, в результате чего последний из антиоксиданта превращается в прооксидант, инициируя перекисное окисление липидов [9, 10].

Рак молочной железы относится к заболеваниям с выраженной воспалительной реакцией. На фоне воспаления повышается синтез цитокинов, которые экспрессируют индуцибельную NOS, последняя, в соответствии с ее уровнем активности, генерирует высокий уровень NO [8]. Снижение концентрации конечных метаболитов оксида азота – нитратов и нитритов – в крови больных раком молочной железы было отмечено нами после лечения. Так, содержание нитратов и нитритов в плазме крови больных раком молочной железы после проводимой терапии не отличалось от таковых в контроле (рисунки), что свидетельствует, по всей видимости, об уменьшении воспалительной реакции и нормализации уровня оксида азота в крови пациентов на фоне лечения.

Проведенные нами исследования свидетельствуют о повышении уровня свободнорадикального окисления и снижении антиоксидантной защиты у больных при наличии РМЖ. Так, в крови больных РМЖ уровни первичных продуктов ПОЛ – ДК и ТК – оказались повышенными по сравнению с нормой, соответственно в 1.5 и 3 раза. Содержание оснований Шиффа – наиболее токсичных продуктов ПОЛ – превышало показатели контроля в 4.5 раза (табл. 1).

Состояние антиоксидантной системы защиты в крови больных раком молочной железы и здоровых доноров оценивалось методом биохемилюминесценции. Данные представлены в табл. 2.

Показатели БХЛ свидетельствуют о снижении работы антиоксидантной системы защиты и

повышении продукции свободных радикалов в крови при наличии злокачественной опухоли. Так, значения I_{\max} и S превышают норму в 2 и 1.5 раза соответственно. Такой прооксидантный сдвиг характерен для островоспалительных заболеваний [11]. Активность свободнорадикального окисления после проведенного лечения практически не изменялась.

Таким образом, изменения содержания нитратов и нитритов в крови пациентов с раком молочной железы до лечения, по сравнению с показателями в крови здоровых доноров, свидетельствуют о накоплении оксида азота и преобразовании его в конечные продукты метаболизма. При наличии патологии было отмечено повышение уровня свободнорадикального окисления липидов и ингибирование антиоксидантной защиты. После лечения уровень конечных метаболитов оксида азота приближался к норме, что может свидетельствовать о нормализации функционирования эндотелия.

Список литературы

1. Петрищев Н.И., Власов Т.Д. Дисфункция эндотелия: причины, механизмы, фармакологическая коррекция. СПб.: Изд-во СПбГМУ, 2003. 184 с.
2. Lowenstein C.J., Dinerman J.L., Snyder S.H. // Annual Internfal Medicine. 1994. V. 120. P. 227–237.
3. Nathan C., Xie Q. // Nitric oxide synthases: roles, tolls and controls // Cell. 1994. V. 79. P. 915–918.
4. Кастратова В.П. // Биохимия. 2004. Т. 69. Вып. 1. С. 41–47.
5. Голиков П.П. Оксид азота в клинике неотложных заболеваний. М.: Медпрактика-М, 2004. 180 с.
6. Волчегорский И.А., Налимов А.Г., Яровинский Б.Г., Лифшиц Р.И. // Сопоставление различных подходов к определению продуктов ПОЛ в гептан-изопропанольных экстрактах крови // Вопросы медицинской химии. 1989. № 1. С. 127–131.
7. Лупинская З.А. // Эндотелий сосудов – основной регулятор местного кровотока // krsu.edu/kg/vestnik/2003/html.
8. Степура А.И., Пилецкая Т.П., Степура И.И. // Биохимия. 2005. Т. 70. Вып. 3. С. 416–429.

9. Коган А.Х., Грачёв С.В., Елисева С.В., Белевич С.Н. // Вопросы медицинской химии. 1996. Вып. 3. С. 193–202.

10. Янченко О.С. Особенности иммунного ответа на развитие опухоли у гинекологических больных до и после лечения. Автореферат дис. ... канд. мед. наук. Н. Новгород, 2006. 24 с.

11. Колесова О.Е., Леонтьева М.И., Фролова Т.М., Зайцев В.Я., Синегуб Г.А. // Стимулирующий эффект озонированного физиологического раствора на антиоксидантную систему организма // Тез. докл. I Всерос. научно-практической конф. «Озон в биологии и медицине», Н. Новгород, 1995. С. 32–33.

THE CHANGE OF NITRIC OXIDE CONCENTRATION AND FREE-RADICAL OXIDATION ACTIVITY IN THE BLOOD OF BREAST CANCER PATIENTS

I.E. Okrut, D.A. Shakerova, T.A. Veselova

The vascular endothelium state has been estimated by NO amount and the level of free-radical oxidation has been analyzed in the blood of breast cancer patients before and after treatment. The accumulation of NO and the activation of free-radical oxidation have been found in blood plasma of cancer patients before treatment. Ozone therapy in the complex treatment led to the normalization of the NO level in the cancer patient blood.

Keywords: endothelial dysfunction, nitric oxide, free-radical oxidation, ozone therapy.