

ЗАВИСИМОСТЬ АКТИВНОСТИ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ ОТ МИТОТИЧЕСКОГО ИНДЕКСА ОПУХОЛЕЙ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Л.П. Смирнова, И.В. Кондакова, Е.М. Слонимская, С.А. Глущенко, М.Ф. Ялова

НИИ онкологии Томского научного центра СО РАМН

Рак молочной железы (РМЖ) занимает первое место в ряду онкологических заболеваний у женщин. Он широко распространен как в нашей стране, так и за рубежом, наблюдается и его неуклонный рост. Несмотря на определенные успехи, достигнутые в разработке и применении новых эффективных методов в диагностике и лечении РМЖ, эта проблема еще далека от своего окончательного решения. Этиологические факторы развития РМЖ не изучены до конца. Нередко одной из причин возникновения РМЖ называют окислительный стресс, протекающий на организменном уровне [4]. Известны часто встречающиеся системные нарушения в уровнях антиоксидантной защиты [2, 9], которые являются факторами риска данной онкопатологии.

Одним из ключевых параметров, характеризующих опухолевый рост, является пролиферативная активность опухолевых клеток. Имеющиеся в настоящее время данные не позволяют точно определить внутриклеточные факторы, способные влиять на скорость опухолевого роста. В связи с этим целесообразно изучение биохимических процессов, оказывающих регулирующее влияние на пролиферацию опухолевых клеток.

Из данных литературы известно, что свободнорадикальные молекулы являются участниками многих внутриопухолевых событий. Свободные радикалы принимают участие в прогрессии опухолевых клеток, поддерживая рост опухоли, её инвазивность и метастатический потенциал [19]. Известно, что супероксидный радикал и перекись водорода в низких концентрациях стимулируют деление клеток [1, 12]. В ткани молочной железы предшественником свободных радикалов, по-видимому, являются стероидные гормоны, которые в процессе тканевого метаболизма превращаются в хиноны и гидрохиноны, обладающие генотоксическим эффектом [4, 14]. Кроме того, появились сообщения о существовании корреляции между наличием рецепторов к эстрогенам и

высоким уровнем глутатионпероксидазы в некоторых опухолевых линиях [8].

Антиоксидантные ферменты, контролируя концентрацию радикалов, могут выступать в качестве опосредованных регуляторов пролиферации опухолевых клеток [6, 10]. Ранее нами было показано в эксперименте, что активность антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутаза, глутатионпероксидаза и глутатионтрансфераза) существенно зависит от пролиферативной активности опухолей в разные фазы роста [3]. Известно, что марганецсодержащая супероксиддисмутаза (СОД) является одним из факторов супрессии опухолей молочной железы [15, 16]. Однако неизвестна степень участия различных антиоксидантных ферментов в регуляции скорости пролиферативных процессов опухолей. Поэтому, исходя из имеющихся данных о роли активных кислородных метаболитов в регуляции пролиферативных процессов, мы сочли необходимым исследовать активность антиоксидантных ферментов (АОФ) в опухолях человека в зависимости от степени их пролиферативной активности.

Целью нашего исследования явилось изучение активности антиоксидантных ферментов в зависимости от выраженности процессов пролиферации в злокачественных новообразованиях рака молочной железы и фиброаденомах.

Материалы и методы

Исследованию подвергалась ткань опухоли 40 больных РМЖ после выполнения хирургического вмешательства в объеме радикальной мастэктомии и 20 больных с доброкачественными опухолями после секторальной резекции. Все больные находились на лечении в отделении общей онкологии НИИ онкологии Томского научного центра СО РАМН. Возраст больных составил 35–60 лет. Распространённость процесса оценивалась как T₁₋₃N₁₋₂M₀. Ткань опухоли очищали от участков некроза и кровоизлияний и помещали в жидкий

азот. Пролиферативную активность опухолевой ткани определяли по митотическому индексу, который вычисляли как количество делящихся клеток на 1000. Опухолевые образцы измельчали в жидком азоте, затем гомогенизировали при 4°C в 50 мМ фосфатном буфере, pH 7,4, содержащем 1 мМ ЭДТА и 1% тритона X-100, из расчёта 900 мл буфера на 100 мл ткани. Гомогенат центрифугировали при 30000 g в течение 45 мин при 4°C (ультрацентрифуга L8-70M "Beckman", США). В полученном супернатанте определяли активность антиоксидантных ферментов.

Кинетика ферментативных реакций изучалась с использованием спектрофотометра "Beckman-DU8B" (США). Активность каталазы измеряли по скорости утилизации гидропероксида водорода [5], активность супероксиддисмутазы – по скорости ингибирования восстановления нитросинего тетразолия в ксантиноксидазной системе [20]. Активность глутатионпероксидазы (ГП) измеряли в сопряженной глутатионредуктазной реакции по замедлению скорости окисления НАДФН гидропероксидом третичного бутила [17], активность глутатионтрансферазы (ГТ) – по образованию конъюгатов глутатиона с 1-хлор-2,4-динитробензолом [13], активность глутатионредуктазы (ГР) – по окислению НАДФН в присутствии окисленного глутатиона [7]. Содержание белка в исследуемой ткани определяли по методу Лоури [18]. Активность АОФ представлена в молярной концентрации субстрата на 1 мг белка. Статистическую обработку результатов проводили с использованием непараметрического U-критерия.

Результаты исследований

Анализ пролиферативной активности показал, что опухоли имеют большой разброс числовых значений показателей митотического индекса. Минимальный показатель митотического индекса в тканях фиброаденомы составил 3⁰/₀₀, а максимальный – 12⁰/₀₀. В тканях рака молочной железы минимальный митотический индекс был равен 16⁰/₀₀, а максимальный – 46⁰/₀₀. В связи с этим мы условно разделили исследуемый материал на пять групп. В первые две группы были включены образцы ткани фиброаденом с показателем митотического индекса на уровне 3–6 и 7–12⁰/₀₀. Три следующие группы включали образцы злокачественных опухолей с индексами пролиферации: 16–27, 28–35⁰/₀₀ и более 35⁰/₀₀ соответственно. Была

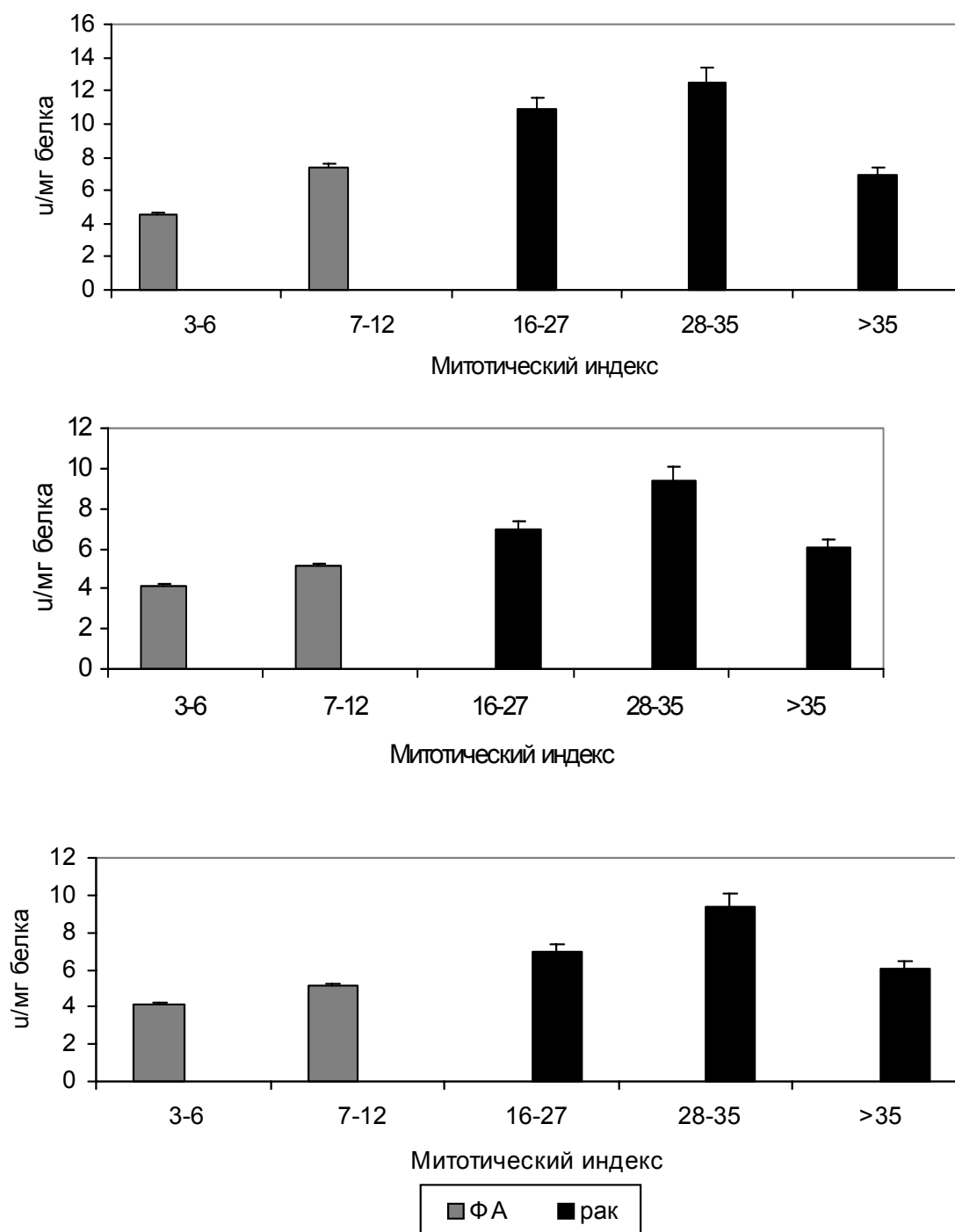
проведена сравнительная оценка активности антиоксидантных ферментов в зависимости от митотического индекса исследуемых опухолей.

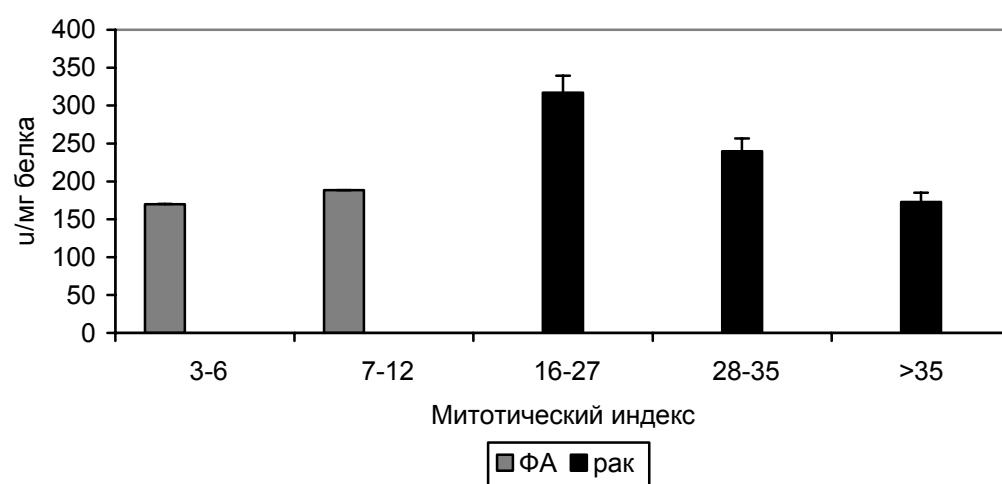
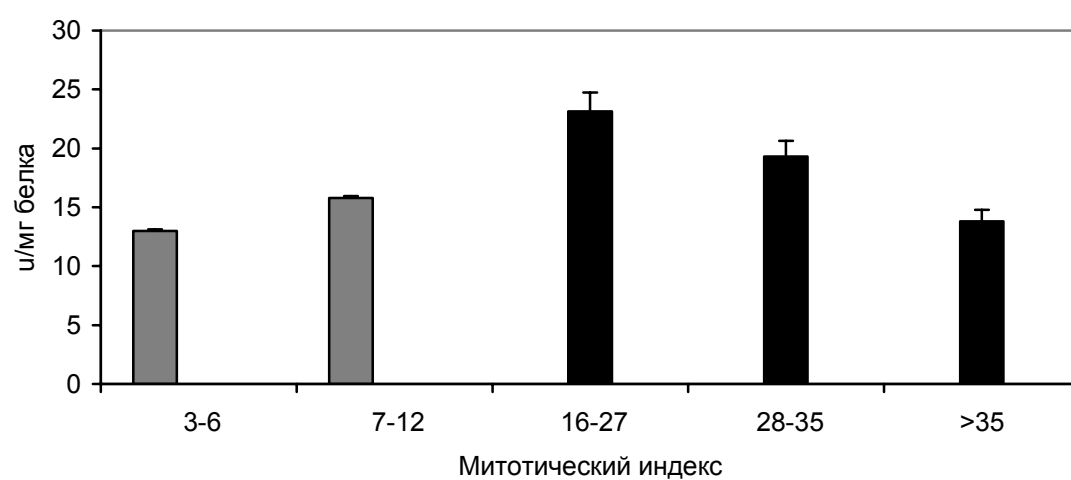
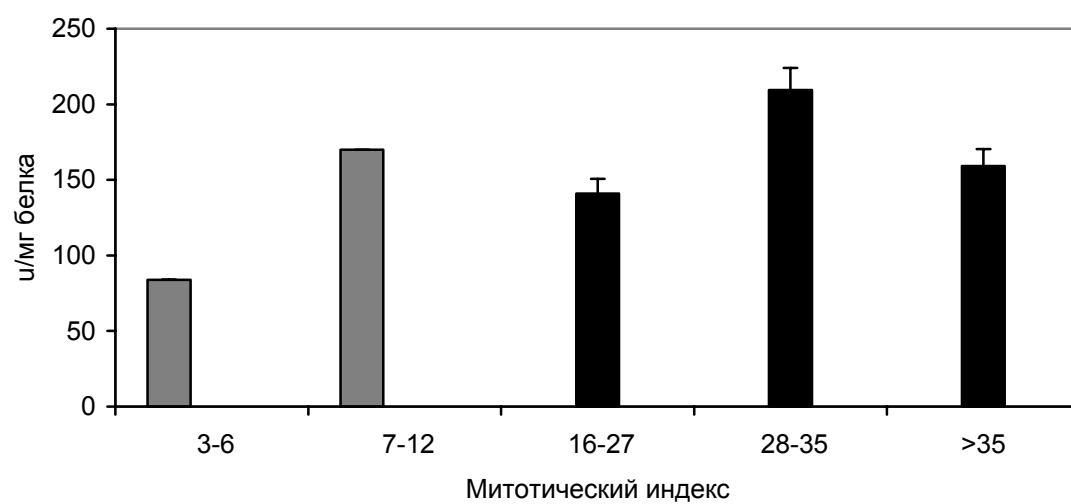
Установлено, что активность ферментов, утилизирующих активированные кислородные метаболиты (СОД, каталаза), существенно зависит от количества митозов в опухолях (рис. 1). Максимальную активность СОД имеет в злокачественных опухолях с индексом пролиферации 28–35⁰/₀₀. Активность каталазы в этой группе минимальна. В противоположность этому в тканях РМЖ с наивысшим митотическим индексом (>35⁰/₀₀) были зарегистрированы низкая активность СОД и высокая активность каталазы. Мы связываем снижение активности СОД в этой группе опухолей с их высокой потребностью в супероксидном радикале, который может являться стимулятором пролиферации клеток [6, 12]. Повышенная активность каталазы в группе образцов максимально пролиферирующих опухолей, вероятно, связана с необходимостью удаления перекиси водорода, которая является токсичным продуктом. Кроме того, промежуточным продуктом реакции, катализируемой антиоксидантным ферментом – каталазой, является супероксидный радикал. Поэтому высокая активность фермента может обуславливать дополнительное поступление этого интермедиата, регулирующего митотическую активность опухолевых клеток. Повышенная активность обоих ферментов в ткани фиброаденом с более высоким индексом пролиферативной активности говорит об изменениях, связанных с метаболизмом активных форм кислорода.

Дополнительным подтверждением участия активных форм кислорода в регуляции пролиферативных процессов могут быть обнаруженные нами изменения в активности ксантиноксидазы – фермента, катализирующего образование супероксида. Активность фермента в зависимости от показателей митотического индекса представлена на рис. 1. Очевидно, что минимальные значения активности ксантиноксидазы наблюдались в тканях доброкачественных опухолей с самой низкой скоростью пролиферации.

На рис. 2 представлены результаты исследования активности глутатионзависимых АОФ, разрушающих пероксиды липидов и фосфолипидов, в исследуемых группах опухолей. Установлено, что уровень активности этих ферментов также определенным образом коррелирует с пролиферативной

Рис. 1. Уровень активности супероксиддисмутазы (*а*), каталазы (*б*) и ксантиноксидазы (*в*) в опухолях молочной железы с различным митотическим индексом ($\%_{00}$)





активностью опухолевых клеток. В тканях почти всех фиброаденом значения активности глутатионзависимых ферментов были достоверно ниже, чем в активно пролиферирующих злокачественных опухолях. Активность ГП, ГТ и ГР достоверно снижалась по мере увеличения митотического индекса в ткани рака молочной железы. Вероятно, ферменты метаболизма липопероксидов, так же как и СОД, могут являться регуляторами пролиферации, влияя на концентрацию липидных пероксидов в опухолевых клетках. Такое заключение согласуется с данными J. Hu и L. Engman [11], которые обнаружили синергичность действия липидных радикалов и опухолевых промоторов – форболовых эфиров.

Таким образом, наши данные подтверждают наличие зависимости между уровнем активности ферментов, утилизирующих кислородные радикалы, и скоростью пролиферативных процессов в опухолевых клетках. В злокачественных опухолях с наиболее высокими значениями митотического индекса было отмечено достоверное снижение активностей всех исследованных ферментов – супероксиддисмутазы, ксантиноксидазы, глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы, глутатионтрансферазы, за исключением каталазы. По всей вероятности, это обусловлено потребностью в повышенной концентрации свободнорадикальных молекул для стимуляции деления и роста количества клеток. Низкая активность СОД, ГП, ГР, ГТ и высокая активность каталазы в тканях РМЖ с максимальными показателями митотического индекса могут рассматриваться как одни из показателей неблагоприятного прогноза заболевания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вартамян Л. С., Садовникова И.П., Гуревич С.М. // Биохимия. 1992. № 57. С. 671–678.
2. Савина Е.В., Слонимская Е.М., Кондакова И.В., Гарбуков Е.Ю. // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2000. Т. 129, прил. № 1. С. 68–70.
3. Смирнова Л.П., Кондакова И.В. // Сиб. онкол. журн. 2002. № 1. С. 65–69.
4. Ambrosone C.B. // Antioxidant Redox Signal. 2000. Vol. 2. № 4. P. 903–917.
5. Beers R.F., Sizer J.W. // J. Biol. Chem. 1952. Vol. 195. P. 133–140.
6. Burdon R.H. // Free Rad. Biol. Med. 1995. Vol. 18. P. 775–795.
7. Carbery J., Mannervic B. // J. Biol. Chem. 1975. Vol. 250. P. 5475–5480.
8. Esworthy R.S., Baker M.A., Chu F.F. // Cancer Res. 1995. Vol. 55. № 4. P. 957–962.
9. Gerber M., Astre C., Segala C. et al. // Cancer Letters. 1997. Vol. 114. P. 211–214.
10. Grigolo B., Lisignoli G., Toneguzzi S. et al. // Anticancer Res. 1998. Vol. 18. P. 1175–1180.
11. Hu J., Engman L., Cotgreave I. // Carcinogenesis. 1995. Vol. 16. P. 1815–1824.
12. Jang A.H., Oberley T.D., Oberley L.W. // Develop. Biology. 1987. Vol. 23. P. 546–558.
13. Keen J.H., Habing W.H., Jakoby W.B. // J. Biol. Chem. 1976. Vol. 251. P. 6183–6188.
14. Kodama M., Inoue F., Saito H. // Anticancer Research. 1997. Vol. 17. P. 439–444.
15. Li J.J., Oberley L.W., Fan M. // FASEB. 1998. Vol. 12. P. 1713–1723.
16. Li Z., Khaletskiy A., Wang J. // Free Radic. Biol. Med. 2001. Vol. 30, № 2. P. 260–267.
17. Littel C., O'Brien P.J. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1968. № 31. P. 145–150.
18. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.H., Randall R.J. // J. Biol. Chem. 1951. Vol. 193. P. 265–275.
19. Malins D.E., Polissar N.L., Gunselman S.J. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1996. Vol. 93, № 6. P. 2557–2563.
20. Oberley L.W., Spitz D.R. Handbook for Oxyradical Research. Washington: CRC Press, 1985. P. 28–31.