

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2022-21-2-73-81>

Особенности активности ферментов обмена нуклеозидов и антиоксидантной системы в солидных опухолях

Е.М. Бакурова¹, И.В. Василенко¹, Ю.Д. Турсунова¹, Н.М. Добаева², Б.Г. Борзенко¹, В.Н. Ельский¹

¹ГОО ВПО «Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького»; 83003 Донецк, пр-кт Ильича, 16;
²ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет»; Россия, 344022 Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, 29

Контакты: Елена Михайловна Бакурова 32023@mail.ru

Введение. Сольдные опухоли, формируя агрессивный фенотип, приобретают способность к инвазии и метастазированию, устойчивость к апоптозу. При этом их пролиферативная активность снижается, активируется ангиогенез. Роль триггерных молекул этих процессов могут играть тканевые метаболиты – 2-дезоксид-Д-рибоза и ее фосфорилированная форма (2-д-Д-Риб-1-Ф), а также пероксид водорода (H_2O_2).

Цель исследования – изучить особенности активности ферментов обмена нуклеозидов и антиоксидантной системы в эпителиальных опухолях различной локализации.

Материалы и методы. Спектрофотометрически в гомогенатах опухолей были исследованы особенности активности ферментов метаболизма нуклеозидов (тимидинфосфорилазы, аденозиндезаминазы) и ферментов антиоксидантной системы – супероксиддисмутазы (СОД) и глутатионпероксидазы (ГПО). Параллельно проводили сравнительное морфологическое исследование тканей опухолей, иммуногистохимически определяли особенности экспрессии эпителиальных и мезенхимальных маркеров, маркера эндотелиоцитов.

Результаты. В карциномах немелкоклеточного рака легких (НМРЛ), в солидных опухолях желудка и кишечника (аденокарциномах желудка и кишечника, далее – КЖК) установлено повышение активности тимидинфосфорилазы в среднем в 1,8 раза ($p = 0,002$) и аденозиндезаминазы (для НМРЛ в 1,7 раза, для КЖК в 1,9 раза; $p = 0,001$). Достоверных изменений активности СОД в опухолях не выявлено. Активность ГПО имела тенденцию к снижению в среднем в 1,3 раза ($p = 0,01$ для НМРЛ, $p = 0,02$ для КЖК). Кластерный анализ особенностей ферментативной активности исследуемых опухолей выявил ее неоднородность. На основании его результатов в каждой локализации были выделены по 2 кластера (или подгруппы). Во 2-х подгруппах НМРЛ и КЖК активность СОД в опухолях была выше, чем в контроле. При этом повышения активности ГПО в них не установлено. В этих же подгруппах наблюдалась тенденция к максимальному повышению фосфорилазной активности тимидинфосфорилазы ($p = 0,045$ для НМРЛ, $p = 0,049$ для КЖК). Следовательно, в опухолях НМРЛ и КЖК, выделенных во 2-е подгруппы, как H_2O_2 , так и 2-д-Д-Риб-1-Ф могли формироваться более интенсивно. 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).

Заключение. Эпителиальные опухоли изученных локализаций с индивидуальной высокой активностью тимидинфосфорилазы и СОД, и низкой активностью ГПО способны продуцировать как 2-д-Д-Риб-1-Ф, так и H_2O_2 . Это способствует кумулированию их эффектов по общим сигнальным путям, участвующим в опухолевой прогрессии.

Ключевые слова: тимидинфосфорилаза, аденозиндезаминаза, глутатионпероксидаза, супероксиддисмутазы, карцинома

Для цитирования: Бакурова Е.М., Василенко И.В., Турсунова Ю.Д. и др. Особенности активности ферментов обмена нуклеозидов и антиоксидантной системы в солидных опухолях. Российский биотерапевтический журнал 2022;21(2):73–81. DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-2-73-81

The features of enzymes activity to nucleoside and antioxidant systems in solid tumors

Elena M. Bakurova¹, Inna V. Vasilenko¹, Yulia D. Tursunova¹, Natalya M. Dobaeva², Berta G. Borzenko¹, Viktor N. Yelsky¹

¹M. Gorky Donetsk National Medical University; 16 Ilyicha Ave., Donetsk 83003;

²Rostov State Medical University; 29 Nakhichevan Lane, Rostov-on-Don 344022, Russia

Contacts: Elena Mikhailovna Bakurova 32023@mail.ru

Background. Solid tumors can create their aggressive properties. There are characterized by the invasion and metastatic activity, the resistance of the tumor clone to apoptosis. These pathways triggering may be realized both by 2-deoxy-D-ribose and its phosphorylated form (2-d-D-Rib-1-P), and by hydrogen peroxide.

Aim. To investigate the peculiarities of enzymes activity to nucleoside metabolism and antioxidant system in epithelial tumors of different localization.

Materials and methods. The features of the thymidine phosphorylase, adenosine deaminase, superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPO) activity were studied in tumor homogenates. The visually no transformed tissues of the surgical resection edges were used as a control. Enzymes activity was determined by spectrophotometrical and morphological features were examined by the immunohistochemical methods in tissues of non-small cell lung cancer (NSCLC), samples of gastric and colon carcinomas (GCC).

Results. Thymidine phosphorylase activity and adenosine deaminase activity in various malignant tumors were increased in comparison to the control. Respectively, thymidine phosphorylase activity was higher than by 1.8 times ($p = 0.002$ for NSCLC, $p = 0.001$ for GCC). An increase of adenosine deaminase activity was revealed both in tissues of NSCLC (more than 1.7 times) and in GCC (by 1.9 times, $p = 0.001$). No significant changes in SOD activity were detected in the tumors. GPO activity tended to decrease by an average of 1.3 times ($p = 0.01$ for NSCLC, $p = 0.02$ for GCC). 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 thymidine phosphorylase 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.

Conclusion. 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 thymidine phosphorylase and SOD and low GPO activity the metabolic stimulation of tumor progression may be occur.

Keywords: thymidine phosphorylase, adenosine deaminase, glutathione peroxidase, superoxide dismutase, tumor

For citation: Bakurova E.M., Vasilenko I.V., Tursunova Yu.D. et al. The features of enzymes activity to nucleoside and antioxidant systems in solid tumors. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2022;21(2):73–81. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-2-73-81

Введение

Индивидуальные химио- и радиочувствительность опухоли зависят от ее структурных особенностей. Карциномы различных локализаций могут приобретать агрессивные свойства, вырабатывая резистентность к апоптозу, усиливая ангиогенез, увеличивая подвижность и миграционную активность опухолевых клеток [1]. Эти свойства во многом связаны с реализацией опухолью эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП) [1, 2]. Стоит отметить, что в его инициации могут участвовать активные формы кислорода (АФК) [3]. Так, пероксид водорода (H_2O_2) и супероксид анион (O_2^-) стимулируют главные компоненты неоваскулогенеза – прогениторные эндотелиальные клетки [4]. АФК способны активировать ряд онкогенов, участвовать в трансдукции их сигналов, связанных с пролиферацией, выживаемостью, инвазивностью [3, 5]. Они играют важную роль не только в инициации и промоции опухолевого роста, но и в его прогрессии [5].

Известно, что продукцию АФК могут обеспечить эндогенные метаболиты [5], в том числе 2-де-

зоксид-D-рибоза и ее фосфорилированная форма [6, 7]. Причем она и сама обладает рядом проангиогенных эффектов [4, 8]. Эта альдопентоза образуется в результате катаболизма нуклеозидов, например при деградации дезокситимидина и дезоксиаденозина, запускаемой тимидинфосфорилазой (ТФ) и аденозиндеаминазой (АДА) [9, 10]. В настоящее время ТФ идентифицирована как ангиогенный фактор (platelet-derived endothelial cell growth factor, PD-ECGF). Также она имеет антиапоптозные и пропролиферативные эффекты [8, 9]. ТФ реализует их за счет своей ферментативной активности. Различают 2 вида активности ТФ. Установлено, что *in vivo* она продуцирует дезокситимидин, преимущественно за счет своей альтернативной трансферазной активности (условно – ТФ анаболическая, ТФан) [9, 11]. В обратной фосфорилазной реакции *in vivo* фермент обеспечивает именно катаболизм дезоксинуклеозида до тимина и 2-дезоксид-D-рибозо-1-фосфата (2-d-D-Риб-1-Ф). Мы условно обозначили эту активность как катаболическую (ТФк). Формирующаяся затем 2-дезоксид-D-рибоза (2-d-D-Риб) реализует эффекты ТФ,

активируя интегриновый сигнальный путь p70/s6 киназы. Интересно, что H_2O_2 и 2-д-Д-Риб могут стимулировать одинаковые факторы транскрипции, например ядерный фактор каппа В (nuclear factor kappa B, NF- κ B), отвечающие за устойчивость клетки к апоптозу, запускающие процессы ангиогенеза [4, 6].

Наряду с ферментами обмена нуклеозидов нами изучались особенности активности супероксиддисмутазы (СОД) и глутатионпероксидазы (ГПО). Они непосредственно участвуют в инактивации $O_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 [5, 7, 12].

Цель исследования – сравнительное изучение активности ферментов метаболизма нуклеозидов и ферментов антиоксидантной системы в опухолях эпителиального гистогенеза различной локализации.

Данный подход поможет исследовать взаимосвязи между усилением прооксидантных процессов и продукцией 2-д-Д-Риб-1-Ф, опосредующих опухолевую прогрессию.

Материалы и методы

Нами исследованы 25 случаев немелкоклеточного рака легких (НМРЛ). По уровню инвазии (классификации TNM) опухоли соответствовали стадиям T2N0–2M0 и T3N0–2M0. По гистологическому строению это были 13 случаев плоскоклеточного рака, 10 аденокарцином, 2 случая нейроэндокринных опухолей. По степени дифференцировки (согласно классификации Всемирной организации здравоохранения, 1973) преобладали карциномы G₁ и G₂ степени.

Рак желудка изучен в 10 случаях, из них 8 – рак кишечного типа, 2 – смешанного типа; преимущественно T3N0–xM0 стадии, G₁ и G₂ степени дифференцировки. Рак кишечника изучен в 12 случаях, соответствовавших стадии T3N0–xM0.

Неoadьювантная терапия опухолей, включенных в исследование, не проводилась.

Группу больных с НМРЛ составили мужчины ($n = 19$) и женщины ($n = 6$) в возрасте от 54 до 73 лет (средний возраст – 62,6 года). Среди больных раком желудка и кишечника были мужчины ($n = 7$) и женщины ($n = 15$) в возрасте от 58 до 75 лет (средний возраст – 65,8 года).

Активность ферментов обмена нуклеозидов и антиоксидантной системы изучали в сопоставлении с индивидуальным контролем в гомогенатах тканей НМРЛ, солидных опухолей желудка и кишечника (аденокарцином желудка и кишечника, далее – КЖК). В качестве контроля использовали визуально нетрансформированные ткани края резекции, удаленные от опухолевого узла не менее чем на 1 см [13].

Виды активности ТФ определяли спектрофотометрически при λ 300 и 267 нм по изменениям оптической плотности тимина (дезокситимидина) [11]. Активность АДА исследовали по снижению оптической

плотности аденозина при 265 нм [10]. Активность СОД регистрировали на 480 нм по торможению самопроизвольного окисления адреналина в щелочной среде [10]. За 1 условную единицу активности СОД принимали активность, замедляющую ее самоокисление в 2 раза. Активность ГПО оценивали по изменению содержания восстановленного глутатиона, определяя его конъюгаты с 2-нитро-5-тиобензоатом [10].

Статистическая обработка полученных результатов исследования проводилась с помощью лицензионных программ MedStat (Альфа) и Statistica 5.5 (StatSoft). Для проверки распределения на нормальность применялся критерий У-Шапиро–Уилка. Данные, не подчинявшиеся закону нормального распределения, представлены в виде медианы (Me) и интервала между 25-м и 75-м перцентилями (1-й и 3-й квартили (Q₁; Q₃)). Различия между 3 и более группами устанавливали с помощью критерия множественных сравнений Краскела–Уоллиса (H). Для сравнения 2 независимых выборок использовали U-критерий Манна–Уитни. Корреляционную взаимосвязь между признаками анализировали, рассчитывая ранговый коэффициент корреляции Спирмена (ρ).

Параллельно с биохимическими проводили сравнительное патоморфологическое исследование тканей опухолей по общепринятым методикам, включавшим фиксацию материала, окраску срезов гематоксилином и эозином. В этом же материале иммуногистохимически определяли ряд маркеров (эпителиальные (панцитокератин AE1/AE3, цитокератин 18), клеточно-клеточной адгезии (E-кадгерин)), а также регистрировали появление экспрессии мезенхимальных маркеров (виментина, α -актина гладких мышц) [2]. Особенности пролиферации клеток опухоли оценивали по уровням экспрессии Ki-67, интенсивность ангиогенеза – по экспрессии сосудистого маркера CD34 [2]. Использовали систему визуализации EnVision FLEX (Dako, Дания).

Результаты и обсуждение

Анализ особенностей ферментативной активности в нетрансформированных тканях края резекции (контрольные образцы) проводили с использованием U-критерия Манна–Уитни (табл. 1). В образцах слизистой оболочки желудка при сравнении с образцами слизистой кишечника достоверных различий в активности изучаемых ферментов не выявлено. Далее объединили их в одну группу и сопоставили с особенностями обмена в легочной ткани. Установили, что в нетрансформированных тканях легкого активность ТФк в 1,3 раза ($p = 0,003$) и ГПО в 1,5 раза ($p = 0,003$) выше, чем в образцах слизистой желудка и кишечника.

При исследовании взаимосвязей ферментативной активности лишь для ТФан и АДА установлена прямая связь ($\rho = 0,340$; $p < 0,024$) как в образцах

Таблица 1. Активность ферментов обмена нуклеозидов и антиоксидантной системы в образцах немелкоклеточного рака легких (НМРЛ), карцином желудка и кишечника (КЖК) (нмоль/мин · мг), Me (Q₁; Q₃)

Table 1. The antioxidant system and nucleoside metabolism enzymes activity in samples of non-small cell lung cancer (NSCLC), of gastric or colon cancer (GCC) (nmol/min · mg), Me (Q₁; Q₃)

Локализация Localisation	ТФк TP		АДА ADA		СОД SOD		ГПО GPO	
	Контроль Control	Опухоль Tumor	Контроль Control	Опухоль Tumor	Контроль Control	Опухоль Tumor	Контроль Control	Опухоль Tumor
НМРЛ (n = 25) NSCLC (n = 25)	96,1 (78,9; 29,4)	171,1** (120,2; 211,9)	122,3 (103,2; 149,1)	202,3** (181,1; 231,1)	1,0 (0,8; 1,1)	0,9 (0,7; 1,4)	3,4 (2,3; 5,1)	2,9* (1,9; 4,2)
КЖК (n = 22) GCC (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)

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

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ in comparison with individual control.

Примечание. ТФк – тимидинфосфорилаза (катаболическая); АДА – аденозиндеаминаза; СОД – супероксиддисмутаза; ГПО – глутатионпероксидаза.

Note. TP – thymidine phosphorylase; ADA – adenosine deaminase; SOD – superoxide dismutase; GPO – glutathione peroxidase.

слизистых желудка и кишечника, так и в нетрансформированной ткани легкого.

Предполагаем, что изучение особенностей активности ферментов в гомогенате опухоли (см. табл. 1) позволяет оценить суммарный вклад и стромальных компонентов, и самих клеток опухоли в формирование ее метаболитов. В частности, не только опухолевые клетки, но и макрофаги стромы, тромбоциты способны секретировать 2-д-Д-Риб-1-Ф, реализующий проангиогенные паракринные сигналы [4, 8, 9]. Лимфоциты и ассоциированные с опухолью макрофаги участвуют в формировании АФК [7]. Считают, что микроокружение опухоли играет эссенциальную роль как в инициации опухолевого роста, так и в его прогрессии, и в метастазировании [7].

Особенности ферментативной активности в гомогенатах опухолей сопоставляли с их активностью в нетрансформированной ткани края резекции, используя непараметрический Т-критерий Вилкоксона. Выявили, что для опухолей исследуемых локализаций было характерно нарастание активности ферментов обмена нуклеозидов. Так, активность ТФк в гомогенатах и НМРЛ, и КЖК была выше, чем в их индивидуальных контрольных образцах ($p = 0,002$ и $p = 0,001$ соответственно). При этом в гомогенатах НМРЛ она была выше, чем в КЖК ($U = 111,50$; $Z = 3,06$; $p = 0,002$). Наши результаты хорошо согласуются с данными S. Tabata и соавт. об активации катаболизма дезокситимидина в опухолях по сравнению со смежными нетрансформированными тканями [6]. На первый взгляд, это идет вразрез с традиционным мнением об активации синтеза дезокситимидилата по «запасному пути» при опухолевом росте [9]. Тем важнее одновременное исследование всех видов активности ТФ.

Помимо повышения «классической» фосфорилазной активности ТФ в тканях опухолей регистри-

ровали повышение и ее дезоксирибозилтрансферазной активности (так называемой ТФан) более чем в 1,5 раза ($p = 0,002$ и $p = 0,001$ для НМРЛ и КЖК соответственно). Следовательно, альтернативный ресинтез нуклеозида дезокситимидина, являющегося субстратом для тимидинкиназы – маркера пролиферации, создает предпосылки для активации «запасного пути» синтеза дезокситимидилата.

Также выявлено повышение активности ключевого фермента катаболизма аденозина. В тканях НМРЛ она превышала активность в контроле в 1,7 раза ($p = 0,001$), а в КЖК еще значительно – в 1,9 раза ($p = 0,001$). Такая активность АДА ведет к повышению уровней дезоксиинозина в опухоли. Это может способствовать его дальнейшему потреблению в качестве косубстрата ТФан, так как известно о роли дезокси-пуриноклеозидов для трансферазной активности ТФ [9]. Косвенно об этом свидетельствует установленная корреляция активности АДА и ТФан, более выраженная в опухолях по сравнению с контролем ($p = 0,704$; $p < 0,001$).

Можно предположить, что выявленное нами повышение видов активности ТФ (фосфорилазной и трансферазной) и АДА может быть универсальным свойством карцином исследуемых локализаций.

В отличие от ферментов обмена нуклеозидов, опухолевая активность ферментов антиоксидантной системы или не отличалась достоверно от контроля (СОД), или снижалась (ГПО). Последнее подтверждает выявленная отрицательная связь особенностей активности ГПО с патологией ($\rho = -0,465$; $p < 0,05$). Причем в КЖК активность ГПО была минимальной по сравнению с НМРЛ ($p = 0,002$). В результате рангового однофакторного анализа Краскела–Уоллиса и медианного теста (χ^2) выявили, что особенности активности ГПО и ТФк в опухолях специфичны

Таблица 2. Активность ферментов антиоксидантной системы и обмена нуклеозидов в образцах немелкоклеточного рака легких (НМРЛ) согласно кластерному делению на подгруппы по особенностям активности СОД (нмоль/мин · мг), Me (Q_1 ; Q_3)

Table 2. The antioxidant system and nucleoside metabolism enzymes activity in samples of non-small cell lung cancer due to the cluster division into subgroups according to the features of SOD activity (nmol/min · mg), Me (Q_1 ; Q_3)

Фермент Enzyme	НМРЛ (1-я подгруппа) NSCLC (subgroup 1)			НМРЛ (2-я подгруппа) NSCLC (subgroup 2)		
	Контроль Control	Опухоль Tumor	<i>p</i>	Контроль Control	Опухоль Tumor	<i>p</i>
СОД SOD	0,8 (0,7; 0,9)	0,7 (0,6; 0,8)	0,01	1,1 (1,0; 1,4)	1,4 (1,2; 1,5)	0,07
ГПО GPO	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 TP	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 TPan	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 ADA	116,3 (89,3; 139,5)	192,5 (153,5; 203,7)	0,01	142,3 (103,2; 165,8)	223,2 (199,1; 287,4)	0,01

Примечание. Здесь и в табл. 3: СОД – супероксиддисмутаза; ГПО – глутатионпероксидаза; ТФк – тимидинфосфорилаза (катаболическая); ТФан – тимидинфосфорилаза (анаболическая); АДА – аденозиндезаминаза.

Note. Here and in table 3: SOD – superoxide dismutase; GPO – glutathione peroxidase; TP – thymidine phosphorylase; TPan – thymidine phosphorylase (anabolic); ADA – adenosine deaminase.

и связаны с локализацией опухоли. Так, для активности ТФк получены значения критериев $H = 9,38$ ($p = 0,002$), $\chi^2 = 9,09$ ($p = 0,003$); для ГПО – $H = 9,31$ ($p = 0,003$), $\chi^2 = 9,09$ ($p = 0,002$). Согласно результатам анализа, для остальных ферментов особенности их активности в карциномах не были связаны с локализацией.

Важно отметить, что повышение активности ТФк на фоне низкой активности ГПО, выявленное в карциномах, может способствовать повышению уровней как 2-д-Д-Риб-1-Ф, так и H_2O_2 . К тому же известно, что 2-д-Д-Риб-1-Ф стимулирует генерацию АФК [4, 6, 7]. Это повышает вероятность активации клеточных программ, связанных с опухолевой прогрессией, запускаемых H_2O_2 и 2-д-Д-Риб-1-Ф [4, 6, 7].

Ранее нами было установлено, что опухоли одного патоморфологического типа и локализации неоднородны по видам активности ТФ и АДА [11]. Была выявлена связь изменений активности ТФан и ТФк с интенсивностью процессов пролиферации и ангиогенеза конкретной опухоли. Так, в НМРЛ установлена прямая положительная связь трансферазной активности (ТФан) с уровнями экспрессии маркера пролиферации Ki-67. Фосфорилазная активность (ТФк) коррелировала с уровнями сосудистого маркера CD34 [11].

В данном исследовании проводился кластерный анализ абсолютных значений ферментативной активности в группах опухолей НМРЛ, а также в группе КЖК. Выявлена ее неоднородность в каждой из

групп. Опухоли одной локализации статистически распределились в 2 кластера. Для корректного их описания были выбраны кластеры активности СОД, чьи абсолютные значения минимальны среди исследованных ферментов (табл. 2, 3). Данные по остальным ферментам соответствовали каждому индивидуальному образцу, отнесенному в конкретный кластер (далее – 1-е и 2-е подгруппы) по активности СОД.

Важно отметить, что прямая сильная связь между увеличением активности ТФан и АДА в опухолях данных локализаций сохранялась и в выделенных подгруппах ($p = 0,740$; $p < 0,001$). В них были выявлены корреляция активности ТФан и ТФк ($p = 0,468$; $p < 0,001$), а также АДА и ТФк ($p = 0,545$; $p < 0,001$). Это также может указывать на кооперативные сдвиги активности ферментов обмена дезоксиаденозина и дезокситимидина, которые могут способствовать и формированию дезокситимидилата (вследствие ресинтеза субстрата для тимидинкиназы), и параллельному повышению уровня 2-д-Д-Риб-1-Ф в опухоли.

Согласно полученным нами результатам, во 2-х подгруппах карцином разных локализаций, характеризовавшихся более высокой активностью СОД, повышения активности ГПО не установлено. Наоборот, во 2-й подгруппе КЖК на фоне максимальной активности СОД ($U = 21,00$; $Z = -2,59$; $p = 0,009$ по сравнению с остальными подгруппами) активность ГПО была минимальной ($U = 14,00$; $Z = -3,05$; $p = 0,002$

Таблица 3. Активность ферментов антиоксидантной системы и обмена нуклеозидов в карциномах желудка и кишечника (КЖК) согласно кластерному делению на подгруппы по особенностям активности СОД (нмоль/мин · мг), Me (Q_1 ; Q_3)

Table 3. The antioxidant system and nucleoside metabolism enzymes activity in gastric or colon cancer (GCC) samples due to the cluster division into subgroups according to the features of SOD activity (nmol/min · mg), Me (Q_1 ; Q_3)

Фермент Enzyme	КЖК (1-я подгруппа) GCC (subgroup 1)			КЖК (2-я подгруппа) GCC (subgroup 2)		
	Контроль Control	Опухоль Tumor	<i>p</i>	Контроль Control	Опухоль Tumor	<i>p</i>
СОД SOD	1,1 (0,8; 1,3)	1,0 (0,6; 1,1)	0,01	1,4 (0,9; 1,6)	1,7 (1,3; 2,3)	0,02
ГПО GPO	2,2 (1,4; 3,0)	1,9 (1,0; 2,2)	0,08	2,2 (1,9; 3,0)	1,5 (1,1; 2,0)	0,08
ТФк TP	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 TPan	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 ADA	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

по сравнению с 1-й подгруппой 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 2-м 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 2-х подгрупп были характерны более высокие уровни продукции O_2^- , H_2O_2 и 2-д-D-Риб-1-Ф. Таким образом, кластерный анализ выявил метаболическую неоднородность среди опухолей одной локализации и морфологии.

По результатам дискриминантного анализа наиболее специфичными для выделенных кластеров опухолей одной локализации оказались особенности активности СОД, ТФк, ГПО (для СОД λ Уилкса 0,160; толерантность 0,94; $p < 0,001$; для ТФк, соответственно, $-0,122$; 0,91, $p < 0,001$; для ГПО $-0,160$; 0,94; $p = 0,030$). Следовательно, в НМРЛ, КЖК выявлены подгруппы, характеризовавшиеся дисбалансом активности СОД и ГПО, повышением фосфорилзной активности ТФ без нарастания ее трансферазной активности. Это могло привести к метаболическому стимулированию ангиогенеза, формированию инвазивных свойств опухоли, устойчивости к апоптозу. Например, известно, что H_2O_2 инициирует ассоциацию α - и β -субъединиц фактора, индуцируемого гипоксией (hypoxia-inducible factor, HIF), запуская реализацию его проангиогенных и антиапоптозных эффектов [5]. ТФк, активируя катаболизм дезокситимидина, помимо собственного воздействия на ангиогенез, стимулирует НАДФН₂-оксидазы, форми-

рующие АФК [4, 6]. По мнению S. Tabata и соавт., ТФ способствует активации сигнальных путей, запускаемых H_2O_2 [6]. Так, H_2O_2 активирует ряд чувствительных онкогенов, способствующих опухолевой прогрессии, реализации ЭМП, метастазированию [3, 5]. Эти свойства H_2O_2 позволили W. Li и соавт. считать, что СОД, которая также его продуцирует, может участвовать в развитии ЭМП [12]. При этом опухоль приобретает агрессивные свойства, и традиционные методы лечения становятся неэффективными [14].

Одними из чувствительных к АФК онкогенами, участвующими в программе ЭМП, являются *Snail*-гены. Кодированные *Snail* факторы транскрипции реализуют формирование инвазивных свойств опухоли [14]. Так, вследствие репрессии транскрипции E-кадгерина, ламинина, интегринов мембран нарушаются межклеточные контакты, клеточно-матриксная адгезия [1, 2, 14]. Активация металлопротеиназ обеспечивает протеолиз внеклеточного матрикса, белковых компонентов базальных мембран [5, 6]. Изменения клеточной поляриности и формы сопровождаются экспрессией мезенхимальных маркеров – виментина, α -актина гладких мышц. Клетки приобретают подвижность, способность к инвазии, метастазированию [2]. J. Zeng и соавт. было экспериментально установлено, что H_2O_2 одновременно подавляет экспрессию E-кадгерина и стимулирует экспрессию мезенхимальных маркеров (виментина и N-кадгерина) [3]. Как АФК, так и ТФ стимулируют активность матриксных металлопротеиназ [5, 6].

В данном исследовании, помимо ферментативной активности, были изучены особенности опухолевой экспрессии ряда эпителиальных маркеров,

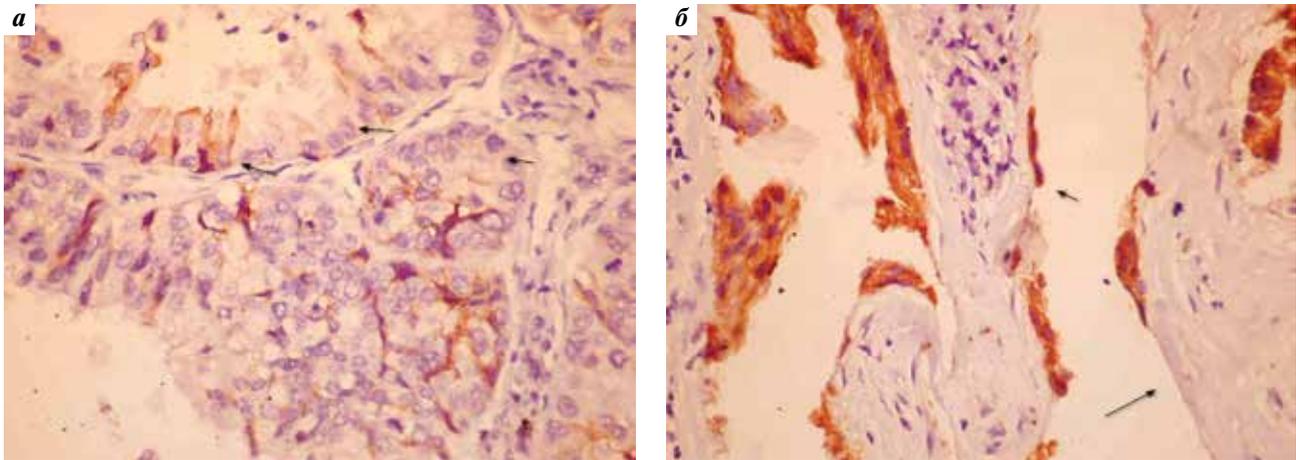


Рис. 1. Немелкоклеточный рак легких (2-я подгруппа, папиллярная аденокарцинома легких): снижение экспрессии E-кадгерина (а); панцитокератина AE1/AE3 (б). Иммуногистохимическое окрашивание с использованием антител. $\times 400$

Fig. 1. Non-small cell lung cancer (subgroup 2, papillary lung adenocarcinoma): decreased expression of E-cadherin (a), pancytokeratin AE1/AE3 (b). Immunohistochemical staining with antibodies. $\times 400$

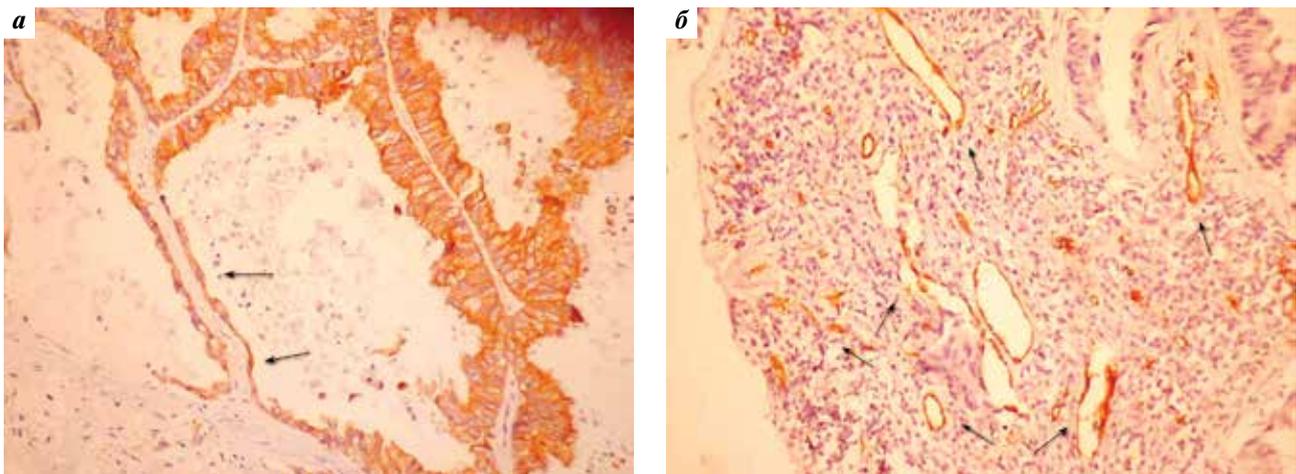


Рис. 2. Немелкоклеточный рак легких (2-я подгруппа, папиллярная аденокарцинома легких): особенности экспрессии цитокератина 18 (а); маркера эндотелиоцитов CD34 (б). Иммуногистохимическое окрашивание с использованием антител. $\times 200$

Fig. 2. Non-small cell lung cancer (subgroup 2, papillary lung adenocarcinoma): the features of expression of cytokeratin 18 (a); endotheliocyte marker CD34 (b). Immunohistochemical staining with cytokeratin 18 and CD34 antibodies. $\times 200$

Ki-67, маркера эндотелиоцитов CD34 и мезенхимальных маркеров. ЭМП регистрировали по ряду признаков. В частности, наблюдали снижение (или отсутствие) мембранной экспрессии E-кадгерина, появление ее в цитоплазме опухолевых клеток (рис. 1). Также снижалась экспрессия цитокератина AE1/AE3 и цитокератина 18 (см. рис. 1, рис. 2). Некоторые клетки обособливались, вытягивались, приобретали фибробластоподобную форму (см. рис. 2, а). При этом появлялась экспрессия мезенхимальных маркеров (рис. 3).

Отметим, что в 1-й подгруппе НМРЛ ($n = 16$) в 7 (44 %) случаях 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 (54 %) случаях, а в их

2-й подгруппе ($n = 10$) переход наблюдали в 8 (80 %) образцах опухолей.

Интенсивность пролиферации варьировала. Среди случаев НМРЛ при наличии ЭМП пролиферативная активность чаще была низкой (экспрессия Ki-67 < 10 % клеток). В образцах без ЭМП она была умеренной (Ki-67 – 20–30 %) и высокой (Ki-67 – 30–40 %), иногда достигая 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 ее интенсивность снижалась.

В подавляющем большинстве случаев при ЭМП наблюдали выраженную экспрессию сосудистого

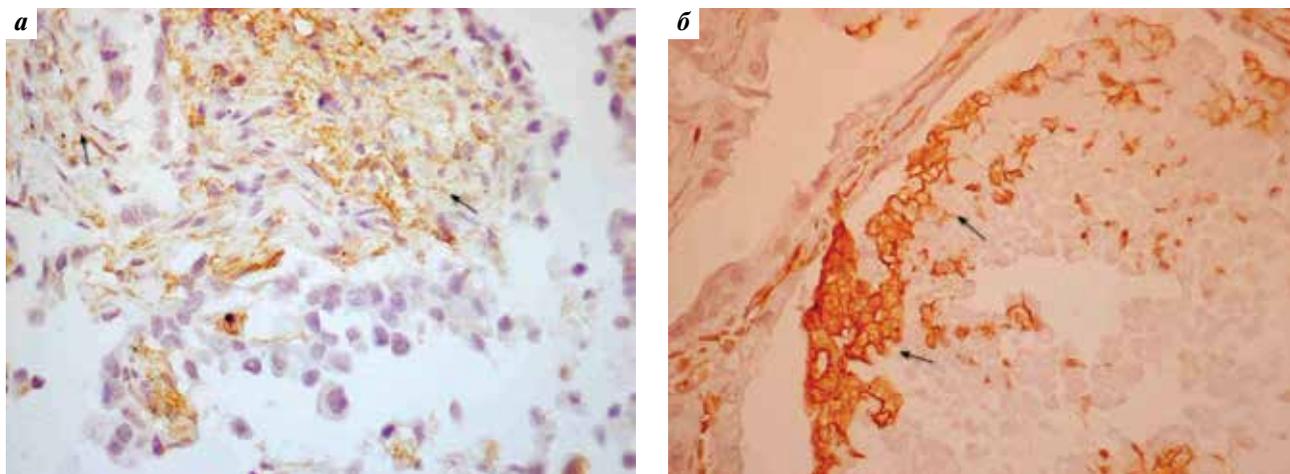


Рис. 3. Немелкоклеточный рак легких (2-я подгруппа, папиллярная аденокарцинома легких). Появление признаков стволовых клеток и экспрессия мезенхимальных маркеров. Иммуногистохимическое окрашивание с использованием антител к D2-40 (а), виментину (б). $\times 400$

Fig. 3. Non-small cell lung cancer (subgroup 2, papillary lung adenocarcinoma). Signs of stem cells and expression of mesenchymal markers. Immunohistochemical staining with antibodies to D2-40 (a), vimentin (b). $\times 400$

маркера CD34 и активацию ангиогенеза как при НМРЛ (см. рис. 2, б), так и в группе КЖК.

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

Заключение

В солидных опухолях различной локализации установлено увеличение активности ферментов деградации дезокситимидина и дезоксиаденозина, выявлен дисбаланс ферментов антиоксидантной системы.

Повышение активности ТФ и АДА – универсальное свойство карцином исследованных локализаций. В кооперации оба фермента могут обеспечивать как

продукцию 2-д-Д-Риб-1-Ф, так и ресинтез дезокситимидина. В пользу последнего свидетельствует нарастание силы связи, характеризующей корреляцию трансферазной активности ТФ и АДА в тканях опухоли ($p = 0,740$, $p < 0,001$).

Опухоли одной локализации и патоморфологического типа метаболически неоднородны по активности антиоксидантных ферментов (СОД, ГПО) и фосфорилазной активности ТФ. Нарастание опухолевой фосфорилазной активности ТФ в среднем в 2 раза на фоне повышения активности СОД и низкой активности ГПО могут формировать условия для стимулирования тканевыми метаболитами (H_2O_2 и 2-д-Д-Риб-1-Ф) опухолевой прогрессии. Предполагаем, что индивидуальные метаболические особенности могут непосредственно способствовать активации сигнальных путей, обеспечивающих формирование агрессивных свойств опухоли, в том числе реализующих ЭМП.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Лыжко Н.А. Молекулярно-генетические механизмы инициации, промоции и прогрессии опухолей. Российский биотерапевтический журнал 2017;16(4):7–17. DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-4-7-17
Lyzhko N.A. Molecular-genetic mechanisms of initiation, promotion and progression of tumors. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2017;16(4):7–17. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-4-7-17
2. Vasilenko I.V., Kondratyuk R.B., Grekov I.S., Yarkov A.M. Epithelial-mesenchymal transition in main types of gastric carcinoma. Clin Exp Morphol 2021;10(2):13–20. DOI: 10.31088/CEM2021.10.2.13–20
3. Zeng J., Li M., Xu J.-Y. et al. Aberrant ROS mediate cell cycle and motility in colorectal cancer cells through an oncogenic CXCL14 signaling pathway. Front Pharmacol 2021;12:764015. DOI: 10.3389/fphar.2021.764015
4. Vara D., Watt J.M., Fortunato T.M. et al. Direct activation of NADPH oxidase 2 by 2-deoxyribose-1-phosphate triggers nuclear factor kappa B-dependent angiogenesis. Antioxid Redox Signal 2018;28(2):110–30. DOI: 10.1089/ars.2016.6869
5. Kumari S., Badana A.K., G M.M. et al. Reactive oxygen species: a key constituent in cancer survival. Biomark Insights 2018;13:1–9. DOI: 10.1177/1177271918755391
6. Tabata S., Yamamoto M., Goto H. et al. Thymidine catabolism promotes NADPH oxidase-derived reactive oxygen species

- (ROS) signalling in KB and Yumoto cells. *Sci Rep* 2018;8(1):6760. DOI: 10.1038/s41598-018-25189-y
7. Snezhkina A.V., Kudryavtseva A.V., Kardymon O.L. et al. ROS generation and antioxidant defense systems in normal and malignant cells. *Oxid Med Cell Longev* 2019;6175804. DOI: 10.1155/2019/6175804
8. Furukawa T., Tabata S., Yamamoto M. et al. Thymidine phosphorylase in cancer aggressiveness and chemoresistance. *Pharmacol Res* 2018;132:15–20. DOI: 10.1016/j.phrs.2018.03.019
9. Борзенко Б.Г., Федорова А.А., Бакурова Е.М., Богатырева Е.В. Свойства и функции белка TP/PD-ECGF – фермента и фактора ангиогенеза в норме и при неопластической патологии. *Вопросы онкологии* 2021;67(6):746–54. DOI: 10.37469/0507-3758-2021-67-6-746-754
- Borzenko B.G., Fedorova A.A., Bakurova E.M., Bogatyreva E.V. Properties and functions of TP/PD-ECGF – enzyme and angiogenic factor in norm and in neoplastic pathology. *Voprosy onkologii = Problems in Oncology* 2021;67(6):746–54. (In Russ.). DOI: 10.37469/0507-3758-2021-67-6-746-754
10. Zuiikov S.A., Borzenko B.G., Shatova O.P. et al. Correlation of nucleotides and carbohydrates metabolism with pro-oxidant and antioxidant systems of erythrocytes depending on age in patients with colorectal cancer. *Exp Oncol* 2014;36(2):117–20.
11. Бакурова Е.М. Взаимосвязь активности тимидинфосфоорилазы с индивидуальными особенностями пролиферации и ангиогенеза опухолей основных локализаций. *Новообразование* 2017;16(1):69–72.
- Bakurova E.M. Interaction of thymidine phosphorylase activity with individual features of proliferation and angiogenesis of tumors of the main localizations. *Novoobrazovanie = Neoplasm* 2017;16(1):69–72. (In Russ.).
12. Li W., Cao L., Han L. et al. Superoxide dismutase promotes the epithelial-mesenchymal transition of pancreatic cancer cells via activation of the H₂O₂/ERK/NF-κB axis. *Int J Oncol* 2015;46(6):2613–20. DOI: 10.3892/ijo.2015.2938
13. Волкова Л.В., Шушвал М.С. Морфологическая характеристика выявленных фоновых патологических процессов в слизистой оболочке, прилежащей к опухолевому узлу, при раке желудка кишечного типа. *Клиническая и экспериментальная морфология* 2022;11(1):5–15. DOI: 10.31088/CEM2022.11.1.5-15.
- Volkova L.V., Shushval M.S. Morphological characteristics of background pathological processes in the mucous membrane adjacent to the tumor in gastric cancer of the intestinal type. *Klinicheskaya i eksperimentalnaya morfologiya = Clinical and experimental morphology* 2022;11(1):5–15. (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2022.11.1.5-15
14. Кондратьев Р.Б., Греков И.С., Ярков А.М. и др. Роль эпителиально-мезенхимальной трансформации в раках различной локализации (часть 1). *Новообразование* 2021;13(2):91–5. Kondratyuk R.B., Grekov I.S., Yarkov A.M. et al. The role of epithelial-mesenchymal transition in carcinomas by different localizations (Part 1). *Novoobrazovanie = Neoplasm* 2021;13(2):91–5. (In Russ.).

Вклад авторов

Е.М. Бакурова: разработка концепции и дизайна исследования, проведение биохимических исследований, обработка их результатов с учетом опухолевой патоморфологии, написание и редактирование текста статьи;

И.В. Василенко: разработка концепции работы, проведение, описание и анализ патоморфологических исследований, критический анализ статьи;

Ю.Д. Турсунова: обработка, анализ и интерпретация данных, редактирование статьи;

Н.М. Добаева: анализ и интерпретация данных, сопоставление с данными литературы, редактирование статьи;

Б.Г. Борзенко: разработка концепции и дизайна исследования, анализ выявленных корреляций, редактирование и утверждение окончательного варианта статьи;

В.Н. Ельский: анализ рукописи и литературы с внесением ценного интеллектуального содержания.

Authors contributions

E.M. Bakurova: development of the concept and design of the study, biochemical part of the experiment realization, the results processing according to tumor pathomorphology, article writing and editing;

I.V. Vasilenko: conception of the work, realization, description and analysis of pathomorphological studies, article critical revision;

Yu.D. Tursunova: the results processing, its analysis and interpretation, article editing;

N.M. Dobaeva: the results analysis and interpretation in comparison with literature sources, article editing;

B.G. Borzenko: development of the concept and design of the study, analysis of relationships between biochemical and pathomorphological features of tumors, article editing, approval of the final version of the article;

B.N. Yelsky: the results analysis, its integration with other authors results, the valuable intellectual content implementation.

ORCID авторов / ORCID of authors

Е.М. Бакурова / E.M. Bakurova: <https://orcid.org/0000-0002-9004-8838>

Б.Г. Борзенко / B.G. Borzenko: <https://orcid.org/0000-0002-8380-6733>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Funding. The work was performed without external funding.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики. Пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании. Работа не нарушает интересы пациентов и не вредит их здоровью, одобрена комиссией по биоэтике ГОО ВПО «ДонНМУ им. М. Горького».

Compliance with patient rights and principles of bioethics. The patients gave written informed consent to participate in the study. The work does not harm their health, approved by the bioethics committee of the M. Gorky DonNMU.

Статья поступила: 05.05.2022. **Принята к публикации:** 31.05.2022.

Article submitted: 05.05.2022. **Accepted for publication:** 31.05.2022.