

УДК 618.19-006: 577.154.25 + 577.155.2

ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗНАЯ, АДЕНОЗИНДЕЗАМИНАЗНАЯ И ТИМИДИНФОСФОРИЛАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ КРОВИ И ТКАНЕЙ ПРИ ОПУХОЛЯХ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

О. П. ШАТОВА, Б. Г. БОРЗЕНКО, И. И. ЗИНКОВИЧ, И. Е. СЕДАКОВ

Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького, Украина;
e-mail: shatova.op@rambler.ru

Изучали активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ), аденозиндезаминазы и тимидинфосфорилазы в крови, а также в опухолевой и смежной тканях у 49 женщин с аденокарциномой и у 10 – с фиброаденомой молочной железы. Показано наличие гиперактивации ЛДГ как в опухолевых узлах, так и в смежной железистой ткани. Уровень сывороточной ЛДГ отражает состояние клеточных мембран не столько в клетках узла опухоли, сколько в немалигнизированных тканях. У больных с аденокарциномой молочной железы изменения активности энзимов катаболизма нуклеозидов коррелируют с активностью ЛДГ в сыворотке крови.

Ключевые слова: опухоли молочной железы, лактатдегидрогеназа, метаболизм нуклеозидов.

Известно, что неопластическая трансформация клеток сопровождается интенсификацией гликолиза в условиях достаточного кислородного обеспечения (эффект Варбурга–Кребтри) [1, 2]. Один из механизмов этого эффекта – активация лактатдегидрогеназы (ЛДГ) [2,3], в том числе и вследствие гиперэкспрессии ее гена [4,5]. С другой стороны, для опухолевого роста характерны также изменения состояния ключевых энзимов катаболизма нуклеозидов – тимидинфосфорилазы (ТФ) [6] и аденозиндезаминазы (АДА) [7].

Данные о биохимических процессах во время опухолевого роста, обобщенные в обзоре [8], свидетельствуют не только о том, что инициация мутагенеза и прогрессирование опухоли предполагают участие в метаболизме многих энзимов, прежде всего нуклеиновых кислот, но и о важной роли энзимов гликолиза, ответственных за обеспечение дополнительной энергией высоких потребностей злокачественно трансформированных клеток.

Цель исследования – изучение активности ЛДГ и энзимов катаболизма нуклеозидов в крови и тканях при опухолях молочной железы различного генеза.

Материалы и методы

Активность ЛДГ (ЕС 1.1.1.27), АДА (ЕС 3.5.4.4) и ТФ (ЕС 2.4.2.4) определяли в сыворотке крови, гомогенатах опухолевых узлов при аденокарциноме и смежных с ними железистых тканях (контроль) у 49 женщин в возрасте

40–70 лет с диагнозом рак молочной железы. Для сравнения использовали кровь и ткань доброкачественных опухолевых узлов 10 пациенток с фиброаденомой молочной железы.

Образцы тканей (5 г) тщательно промывали охлажденным физиологическим раствором, измельчали ножницами, гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе на льду в 0,25 М растворе сахарозы, содержащем 5 мМ трис-НСI-буфера (рН 8,1) и 0,15 М КСI. Полученный гомогенат центрифугировали на центрифуге ОПН-3 в течение 60 мин при $g = 1200$. К супернатанту добавляли раствор NH_4SO_2 до 40%-го насыщения, после чего его центрифугировали (60 мин, 1200 g). К надосадочной жидкости добавляли 5 мМ трис-НСI-буфер до рН 8,1, который содержал 0,001 М меркаптоэтанола. При определении АДА измеряли абсорбцию света реакционной смесью при длине волны 265 нм, обусловленную дезаминированием аденозина до инозина [9]. Активность ТФ рассчитывали по увеличению поглощения света тиминном при $\lambda = 300$ нм [10], а ЛДГ в крови и гомогенатах тестировали с помощью коммерческого набора «LDH-50» (Pliva-Lachema, Чехия). Активность энзимов выражали в нмолях/мин на 1 мг протеина, определяемого методом О. Н. Lowry [11].

Протокол исследования был одобрен Комитетом по вопросам биоэтики Донецкого национального медицинского университета им. М. Горького. Было получено также согласие больных на взятие проб для исследования их крови и тканей.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью лицензионного пакета программ STATISTICA-6.0 (StatSoft, Inc). Различия между средними считали достоверными при $P \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Средние показатели активности ЛДГ в сыворотке крови больных раком молочной железы (РМЖ) составляют $3,08 \pm 0,23$ мккат/л, (допускаемые границы 0,6–2,6 мккат/л), что статистически достоверно превышает значения не только у здоровых женщин сопоставимого возраста, но и у пациенток с доброкачественными новообразованиями в грудной железе ($2,69 \pm 0,09$ мккат/л, $P < 0,001$). Следует отметить, что не все исследователи считают увеличение активности сывороточной ЛДГ характерным признаком заболевания раком молочной железы [3, 12]. Более того, в «Руководстве по лабораторной клинической практике» (Национальная академия клинической биохимии, Великобритания, 2008) рекомендуется определять активность ЛДГ для диагностики, стадии и прогнозирования клинического течения болезни, а также контроля за терапией и выздоровлением, но только у пациентов с раком яичек [13].

Повышение активности ЛДГ в исследуемых тканях отмечено и нами, причем в аденокарциноме ее активность была в 3 раза больше ($73,9 \pm 14,5$ нмоль/мин на 1 мг), чем в смежной железистой (контрольной) ткани ($27,4 \pm 3,5$ нмоль/мин на 1 мг). В узле фиброаденомы активность энзима имела промежуточное значение ($36,5 \pm 1,2$ нмоль/мин на 1 мг), которое статистически достоверно ($P < 0,001$) отличалось от такового в тканях больных раком молочной железы. При этом следует подчеркнуть, что, как было показано нами ранее, в ткани фиброаденомы активируется не только ЛДГ, но и ключевой энзим пентозофосфатного пути окисления глюкозы – глюкозо-6-фосфат дегидрогеназа, а также энзимы метаболизма нуклеозидов – АДА и ТФ [14].

Другой важной статистически достоверной характеристикой состояния ЛДГ у пациенток контрольной группы является низкая индивидуальная вариабельность: коэффициент вариации активности ЛДГ в узлах фиброаденомы оказался в 6 раз ниже, чем в аденокарциноме – 3,2 и 19,6% соответственно (рис. 1). Эти различия отражают неоднородность больных раком молочной железы не только по возрасту, продолжительности и стадии заболевания, но и по интенсивности катаболизма глюкозы.

Отмеченная во всех исследованных тканях гиперактивация ЛДГ свидетельствует о ее системном характере и отражает закономерные, а возможно и приспособительные изменения катаболизма углеводов у онкологических больных. Это предположение подтверждается тесной корреляционной связью между показателями активности ЛДГ в опухолевой и смежной с ней тканью (рис. 2), а также данными литературы. Так, установлен достоверный рост активности ЛДГ в эритроцитах больных раком желудка [14]. В окружающих опухоль немалигнизированных тканях наблюдаются аналогичные и характерные для опухолевого узла изменения спектра изоэнзимов ЛДГ: преобладание экспрессии субъединицы энзима А (М) [15]. Авторы интерпретируют полученные ими результаты как проявления «предопухоловой подготовки» окружающих тканей к индукции заболевания. Вместе с тем, очевидно, что одинаковая направленность изменения активности изоэнзимов ЛДГ в опухоли и в окружающих ее тканях является еще одним подтверждением системного, а не ограниченного только злокачественно трансформированными клетками, характера экспрессии ЛДГ, как, возможно, и других энзимов.

У больных раком молочной железы активность сывороточной ЛДГ тесно связана с таковой в тканях – парные коэффициенты корреляции показателей активности энзима в крови составляют +0,77 с опухолевой тканью и +0,92 со смежной. Более тесная корреляция энзима ($P = 0,008$) между показателями в сыворотке крови и смежной с опухолью тканью свидетельствует, что характерное для неоплазий повышение активности сывороточной ЛДГ [2,16] отражает, вероятно, не только состояние

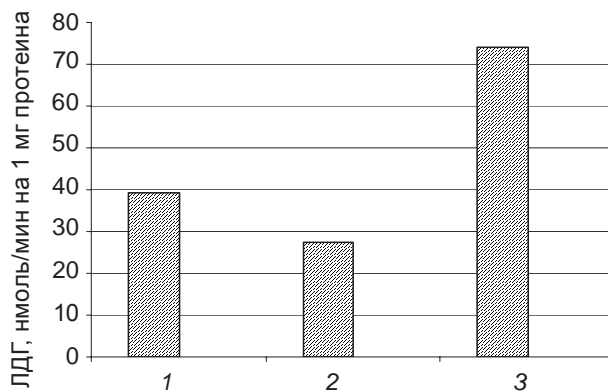


Рис. 1. Активность ЛДГ в опухолевых узлах фиброаденомы (1) и аденокарциномы (2), а также в смежных железистых тканях (3)

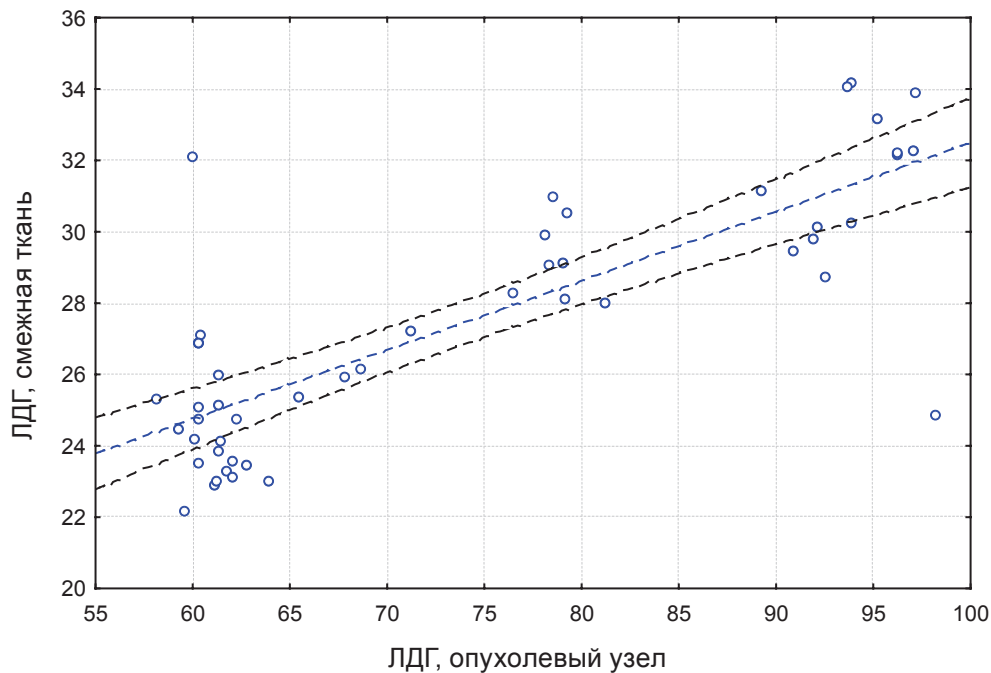


Рис. 2. Взаимозависимость показателей активности ЛДГ в опухолевом узле аденокарциномы и в окружающей опухоль смежной ткани

клеточных мембран опухолевой ткани, как общепринято интерпретировать результаты этого теста [17,18]. Косвенным подтверждением такого вывода являются недавно опубликованные результаты сопоставления активности ЛДГ в сыворотке крови и в опухолевых тканях [3]. Авторы установили, что характерное для аденокарциномы повышение активности энзима в опухоли не всегда сопровождается соответствующим увеличением ее в сыворотке крови. В других исследованиях, проведенных на образцах ткани легких 59 больных со злокачественными новообразованиями, также показано, что, несмотря на почти 20-кратное повышение уровня ЛДГ в бронхоальвеолярных смывах, корреляционные связи с активностью энзима в сыворотке крови отсутствуют. К аналогичным выводам пришли и авторы, изучавшие активность АДА в ткани опухоли и в сыворотке крови больных раком молочной железы. Сопоставление показателей привело их к мысли, что сывороточная АДА имеет иное, чем в опухолевом узле, происхождение [13]. Примечательно также, что у больных с фибroadеномой молочной железы практически отсутствует связь между сывороточной ЛДГ и активностью энзима в узле опухоли: коэффициент корреляции составляет всего $-0,03$.

В исследованиях, проведенных нами ранее [14], было показано, что распределение

больных по показателю активности ЛДГ в тканях и в сыворотке крови имеет бимодальный характер. Такое же распределение описано в литературе и для лимфоцитов больных лейкемией [19].

В соответствии с уровнем активности сывороточной ЛДГ обследованных пациентов со злокачественными опухолями молочной железы мы разделили на 2 подгруппы. К первой отнесли 30 больных с активностью энзима, не превышающего $3,1$ мккат/л (средние значения $- 2,92 \pm 0,10$ мккат/л), ко второй — 18 пациенток с повышенной его активностью ($3,35 \pm 0,08$ мккат/л). Сопоставление активности энзимов у женщин этих подгрупп свидетельствует о статистически достоверных отличиях в данном показателе метаболизма нуклеозидов как в сыворотке крови, так и в опухолевых и смежных тканях. Причем было установлено, что активность катаболического энзима пуриновых нуклеозидов АДА — прямо связана с активностью сывороточной ЛДГ, а катаболического энзима пиримидиновых нуклеозидов ТФ — обратно.

Активность сывороточной АДА во второй подгруппе больных в 1,5 раза выше, чем в первой — $13,43 \pm 2,20$ и $8,73 \pm 3,36$ нмоль/мин на 1 мг соответственно ($P < 0,001$). В целом во всей выборке ($n = 49$) коэффициент парной корреляции между активностью ЛДГ и АДА в

сыворотке крови составляет $+0,69$ ($P < 0,05$), тогда как при фиброаденоме активность АДА равна всего $3,82 \pm 6,23$ нмоль/мин на 1 мг, а корреляционная связь с сывороточной ЛДГ статистически незначима.

В узле аденокарциномы активность АДА также достоверно выше у пациенток с высоким уровнем сывороточной ЛДГ (в нмоль/мин на 1 мг): $27,5 \pm 3,6$ по сравнению с $21,2 \pm 3,4$ в первой подгруппе ($P < 0,001$). У этих же больных активность АДА в смежной с опухолевым узлом ткани молочной железы составляет $18,2 \pm 3,4$ нмоль/мин на 1 мг, что почти на 30% выше, чем у первой подгруппы пациенток ($14,0 \pm 2,8$ нмоль/мин на 1 мг, $P < 0,001$). С учетом данных М. Aghaei et al. [8] можно предположить, что все приведенные нами показатели тканевой активности энзима существенно больше, чем в молочной железе здоровых женщин. В ткани фиброаденомы активность АДА ниже, чем при раке молочной железы — $13,0 \pm 1,8$ нмоль/мин на 1 мг ($P < 0,001$).

Как указывалось выше, при аденокарциноме активность энзима катаболизма пиримидиновых нуклеозидов ТФ находится в обратной зависимости с активностью сывороточной ЛДГ: коэффициенты парной корреляции в сыворотке крови, узле опухоли и окружающих ее тканях составляли соответственно $-0,56$, $-0,55$ и $-0,54$. Во всех случаях значения этих показателей были статистически достоверными ($P < 0,05$). Соответственно у пациенток первой подгруппы активность ТФ в крови ($19,9 \pm 7,0$ нмоль/мин на 1 мг протеина) более чем на 50% превышает таковую при аденокарциноме и сопровождается высокой активностью сывороточной ЛДГ ($13,2 \pm 3,1$ нмоль/мин на 1 мг). Активность ТФ в сыворотке крови больных с фиброаденомой была значительно выше — $54,2 \pm 2,0$ нмоль/мин на 1 мг протеина — при отсутствии достоверной корреляции с показателем активности ЛДГ в крови.

Аналогичные закономерности у больных этих подгрупп установлены и при сопостав-

лении активности ТФ в анализируемых гомогенатах тканей (таблица). Примечательно, что в смежной с опухолью ткани отмечена более высокая по сравнению с узлами аденокарциномы активность этого катаболического энзима, которая является характерным признаком пролиферирующих клеток [20]. Как в узле аденокарциномы, так и в окружающих ее железистых тканях наблюдается угнетение (примерно на 11–14%) исследуемых энзимов катаболизма нуклеозидов у пациенток с высоким уровнем сывороточной ЛДГ. Причем в каждом случае степень ингибирования их в узле и в окружающих его тканях не всегда равнозначны — коэффициент парной корреляции для всего массива больных с аденокарциномой, хотя и статистически достоверен ($P < 0,05$), но характеризуется достаточно низкими значениями: $+0,42$. Активность ТФ в фиброаденоме занимает промежуточные значения ($-32,2 \pm 3,2$ нмоль/мин на 1 мг).

Обнаруженные в сравниваемых подгруппах больных раком молочной железы особенности активности энзимов обмена нуклеозидов могут указывать на существенную роль ЛДГ (равно как и других энзимов гликолиза или его продуктов) в регуляции метаболизма нуклеиновых кислот, выходящую возможно, за пределы лишь одного энергообеспечения организма.

Последнее предположение не кажется излишне смелым, если вспомнить доказанный для многих энзимов факт работы «по совместительству» [21]. Такие свойства их подтверждаются результатами рентгеноструктурного анализа, свидетельствующими о наличии на поверхности протеинов нескольких участков, выполняющих различные функции.

Предположение о плейотропных эффектах ЛДГ косвенно подтверждается также установленными в настоящей работе статистически значимыми тесными корреляционными взаимозависимостями между показателями активности изученных энзимов у пациенток

Активность ТФ (нмоль/мин на 1 мг протеина) в тканях больных раком молочной железы, отличающихся по активности сывороточной ЛДГ ($M \pm m$, $n = 30$ и 18 — группы 1 и 2 соответственно)

Анализируемая ткань	Подгруппы больных	
	С низкой активностью сывороточной ЛДГ (группа 1)	С высокой активностью сывороточной ЛДГ (группа 2)
Узел аденокарциномы	$24,8 \pm 3,2$	$21,1 \pm 2,4^*$
Ткани, окружающие опухоль	$60,5 \pm 3,5$	$54,5 \pm 5,6^*$

* Различия между сравниваемыми подгруппами больных достоверны, $P < 0,001$.

с аденокарциномой. Коэффициенты парной корреляции внутритканевой активности ЛДГ и АДА составляют +0,66 в злокачественном узле и +0,55 – в смежных с опухолью железистых тканях. Для пары ферментов ЛДГ–ТФ корреляции носят обратный характер: -0,46 для ткани аденокарциномы и -0,55 – для нетрансформированной молочной железы. В гомогенатах фиброаденомы молочной железы не обнаружено статистически достоверных связей между значениями активности ЛДГ, с одной стороны, и ТФ и АДА, с другой.

Таким образом, характерная для злокачественных новообразований активация ЛДГ свойственна не только опухолевым клеткам, но и смежной с узлом опухоли нетрансформированной железистой ткани. Уровень сывороточной ЛДГ отражает состояние клеточных мембран не столько в узле опухоли, сколько в немалигнизированных тканях молочной железы. У больных с аденокарциномой изменения активности тканевых ферментов катаболизма нуклеозидов коррелируют с активностью ЛДГ как в тканях, так и в сыворотке крови.

**ЛАКТАТДЕГІДРОГЕНАЗНА,
АДЕНОЗИНДЕЗАМІНАЗНА
І ТИМІДИНФОСФОРИЛАЗНА
АКТИВНІСТЬ КРОВІ ТА ТКАНИН
ПРИ ПУХЛИНАХ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ**

*О. П. Шатова, Б. Г. Борзенко,
І. І. Зінкович, І. Є. Сєдаков*

Донецький національний медичний
університет ім. М. Горького, Україна;
e-mail: shatova.op@rambler.ru

Вивчено активність лактатдегідрогенази (ЛДГ), аденозиндезамінази і тимідинфосфорилази у крові, пухлинній та суміжній з нею тканинах у 49 жінок з аденокарциномою і в 10 – з фібroadеномою молочної залози. Виявлено гіперактивацію ЛДГ як у пухлинних вузлах, так і в суміжній з ними залозистій тканині. Рівень сироваткової ЛДГ відзеркалює стан клітинних мембран не стільки у вузлі пухлини, як у немалігнізованих тканинах. У хворих з аденокарциномою грудної залози зміни активності ферментів катаболізму нуклеозидів узгоджуються з даними щодо активності ЛДГ у досліджуваних тканинах і у сироватці крові.

Ключові слова: пухлини молочної залози, лактатдегідрогеназа, метаболізм нуклеозидів.

**LACTATE DEHYDROGENASE,
ADENOSINE DEAMINASE
AND THYMIDINE PHOSPHORYLASE
ACTIVITY OF BLOOD AND TISSUES
IN BREAST TUMOR PATIENTS**

*O. Shatova, B. Borzenko, I. Zinkovych,
I. Sedakov*

Gorky National Medical University, Donetsk, Ukraine;
e-mail: shatova.op@rambler.ru

S u m m a r y

Lactate dehydrogenase (LDH), adenosine deaminase and thymidine phosphorylase activity was analyzed in the blood serum, primary tumor and adjacent uninvolved breast tissues from 49 women with adenocarcinoma and from 10 ones with benign adenofibroma. The LDH activity was increased in both cancerous and adjacent tissues. Serum LDH level reflects cell membrane alterations not only in the tumor node cells but also to a greater extent – in the surrounding unimalignant tissues. The discovered changes in nucleosides catabolic enzyme's activity in patients with breast cancer are correlated with LDH activity and its level in the blood serum.

Key words: breast cancer, lactate dehydrogenase, nucleosides metabolism.

1. *Crabtree H. G.* // *Biochem. J.* – 1929. – **23**, N 3. – P. 536–545.
2. *Walenta S., Mueller-Klieser W. F.* // *Semin. Radiat. Oncol.* – 2004. – **14**, N 3. – P. 267–274.
3. *Koukourakis M. I., Kontomanolis E., Giatromanolaki A. et al.* // *Gynecol. Obstet. Invest.* – 2008. – **67**, N 3. – P. 162–168.
4. *Dang C. V., Lewis B. C., Dolde C. et al.* // *J. Bioenerg. Biomembr.* – 1997. – **29**, N 4. – P. 345–354.
5. *Liu Z. J., Peng W. C., Yang X. Et al.* // *J. Chromatogr. B.* – 2003. – **793**. – P. 405–412.
6. *Ioachim E.* // *Histol. Histopathol.* – 2008. – **23**, N 2. – P. 187–196.
7. *Aghaei M., Karami-Tehrani F., Salami S., Atri M.* // *Clin. Biochem.* – 2005. – **38**, N 10. – P. 887–891.
8. *Singh P., Bhardwaj A.* // *Mini. Rev. Med. Chem.* – 2008. – **8**, N 4. – P. 388–398.
9. *Борзенко Б. Г., Бакурова Е. М., Кухнина Т. Н., Дудин А. М.* // *Лікар. справа.* – 2003. – № 1. – С. 67–71.
10. *Борзенко Б. Г., Кульчицкий О. К., Бакурова Е. М.* // *Пробл. старения и долголетия.* – 2002. – **11**, № 4. – С. 363–369.

11. Lowry O. H., Rosebrouhg N. J., Farr A. L., Randall R. J. // *J. Biol. Chem.* – 1951. – **193**, N 1. – P. 265–275.
12. Duffy M. J., Crown J. // *Clin. Chem.* – 2008. – **54**, N 11. – P. 1770–1779.
13. Sturgeon C. M., Duffy M. J., Stenman U. H. et al. // *Ibid.* – 2008. – **54**, N 12. – P. 11–79.
14. Шатова О. П., Хилько Д. А., Хомутов Е. В., Зинкович И. И. // Бюл. VII читань ім. В. В. Підвисоцького, 22–23 травня, 2008 р. Одеський держ. мед. ун-т, 2008. – С. 100–101.
15. Augoff K., Grabowski K. // *Pol. Merkuriusz. Lek.* – 2004. – **17**, N 102. – P. 644–647.
16. Шатова О. П., Борзенко Б. Г., Хилько Д. А. та ін. // *Питання експеримент. та клін. мед.* – 2008. – **12**, № 1. – С. 197–203.
17. An D., Kewalramani G., Chan J. K. et al. // *Diabetologia.* – 2006. – **49**, N 9. – P. 2174–2184.
18. Konjevic G., Jurisic V., Jakovljevic B., Spuzic I. // *Glas. Srp. Akad. Nauka [Med.].* – 2002. – N 47. – P. 137–47.
19. Van de Griend R. J., van der Reijden H. J., Bolhuis R. L. et al. // *Blood.* – 1983. – **62**, N 3. – P. 669–676.
20. Sivridis E., Giatromanolaki A., Koukourakis M. I. // *J. Clin. Pathol.* – 2005. – **58**, N 10. – P. 1033–1038.
21. Funasaka T., Yanagawa T., Hogan V., Raz A. // *FASEB J.* – 2005. – **19**, N 11. – P. 1422–1430.

Отримано 23.01.2009