

УДК 001.5:616.-006.6
©Коллектив авторов

ИНТЕНСИВНОСТЬ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ И АКТИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ В ДИНАМИКЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО КАНЦЕРОГЕНЕЗА, СОЧЕТАННОГО С ХЛАМИДИЙНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ

Н.К. Гуськова, И.А. Горошинская, Т.А. Ровда

Ростовский научно-исследовательский онкологический институт МЗ РФ, 344037
Ростов-на-Дону, 14-я линия 63; тел.: (863-2) 51-82-44

В эксперименте на крысах с перевивным штаммом саркомы 45, сочетанной с хламидийной инфекцией, установлена активация процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) уже на начальном свободнорадикальном этапе ПОЛ, что приводит к сопряжённому увеличению активности ключевых антиоксидантных ферментов: супероксиддисмутазы и каталазы. По мере прогрессирования опухолевого процесса, развивающегося на фоне хламидийной инфекции, интенсивность увеличения активности ферментов снижается.

Ключевые слова: перевивная опухоль, хламидиоз, перекисное окисление липидов, антиоксиданты, хемилюминесценция.

ВВЕДЕНИЕ. Включение кислорода (как неотъемлемого компонента метаболических процессов) в жизнедеятельность организмов неизбежно ведет к образованию различных активных форм кислорода (АФК). Под действием последних может происходить окисление и разрушение макромолекул, повреждение ДНК, дезорганизация биологических мембран, снижение их проницаемости для неэлектролитов, ионов, кислорода [1-4]. С другой стороны, АФК, обладая широким спектром биологического действия, необходимы для функционирования живых клеток [2,5,6]. В физиологических условиях образование АФК, с последующей активацией перекисного окисления липидов (ПОЛ) в организме поддерживается на достаточно низком уровне антиоксидантной системой [7]. При патологических состояниях баланс между ПОЛ и антиоксидантами, как правило, нарушается [8]. Особый интерес вызывают данные об активации процессов ПОЛ при канцерогенезе и их роли в патогенезе злокачественного роста [9,10]. В настоящее время получены также данные, свидетельствующие о том, что при хроническом воспалении различной природы - вирусной, бактериальной (и в том числе хламидийной), отмечается генерация свободных радикалов кислорода ("респираторный взрыв"), приводящая к интенсификации процессов ПОЛ и, как следствие, к разрушению клеточных мембран, снижению обеспеченности тканей кислородом и активности антиоксидантных систем [11-14]. В связи с этим интересным представлялось изучить уровень свободнорадикальных процессов ПОЛ и активность основных антиоксидантных ферментов в динамике экспериментального канцерогенеза, сочетанного с хламидийной инфекцией.

МЕТОДИКА. Исследовали интенсивность хемилюминесценции (ХЛ) в системе пероксид водорода-люминол, позволяющую судить об уровне супероксидного анион-радикала и гидроксильного радикала. Динамику

ПОЛ И АОС ПРИ КАНЦЕРОГЕНЕЗЕ И ХЛАМИДИЙНОЙ ИНФЕКЦИИ

хемилюминесценции в плазме крови оценивали по следующим параметрам: светосумме - в количестве фотонов, излучённых за 6 секунд, и высоте быстрой вспышки, выраженной в миллиметрах (мм) [15]. Интенсивность ХЛ регистрировали при 37°C при непрерывном перемешивании на хемилюминометре, сконструированном на базе ядерного анализатора NC-482 В; в качестве детектора был использован ФЭУ-37.

Наряду с ХЛ исследована активность ключевых антиоксидантных ферментов: супероксиддисмутазы (СОД), инактивирующей супероксидный анион-радикал [16], и каталазы, разлагающей перекись водорода и работающей в комплексе с СОД [17].

Исследования выполнены на самцах белых беспородных крыс с исходной массой 170 - 200 г. Опухолевый процесс индуцировали путём введения клеток саркомы-45 под кожу спины (дозировано по общепринятой методике) гомогенной взвесью опухолевых клеток в физиологическом растворе.

Инфицирование животных осуществляли очищенной хламидийной взвесью *Chlamydia trachomatis*, штамм Е с титром 10^5 IFU/мл. Хламидии были выращены роллерным культивированием в клеточных линиях McCoу. Объём вводимой дозы инокулята определялся из расчёта - 1 мкл на 1 г массы тела. Инфицирование проводили двукратно, чередуя способ введения: интраназально и интрауретрально. С учётом поставленных задач сформированы следующие группы: I интактные животные; II животные-опухоленосители; III животные, которым перевивка опухолей осуществлялась одновременно с инфицированием; IV животные, которым перевивка опухолей производилась после предварительного инфицирования возбудителем хламидиоза.

В сроки, отражающие динамику опухолевого роста, а именно: при массе опухоли 0,5 - 2,0 г, 6,0 - 9,0 г, 13,0 г и выше, часть животных (по 16 особей) каждой группы декапитировали. Данные сопоставляли с группой (I) интактных животных того же пола и возраста в количестве 18 крыс. Результаты исследований представлены в таблицах 1 и 2 и на рисунке 1. Рисунок отражает значения изучаемых показателей в процентах у животных с массой опухоли 13 г и выше.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Величина светосуммы ХЛ у интактных животных (гр. I) составила 8721 ± 930 импульсов за 6 секунд, а высота быстрой вспышки ХЛ - $79,2 \pm 10,2$ мм. У животных-опухоленосителей (гр. II) на начальной стадии роста опухоли (с массой опухоли 0,5 - 2,0 г) достоверных изменений параметров ХЛ не выявлено. При массе опухоли 6,0 - 9,0 г имело место выраженное увеличение интенсивности хемилюминесценции. Величина светосуммы увеличилась на 114%, а высота быстрой вспышки - на 87% по сравнению с интактными животными. При этом значения показателей превышали их уровень в предыдущий срок исследования (масса опухоли 0,5 - 2,0 г) на 182% и 142% соответственно. На фоне прогрессирования опухолевого процесса (масса опухоли 13 г и выше) наблюдалось дальнейшее увеличение интенсивности хемилюминесценции. Величина светосуммы при этом превышала уровень у интактных животных на 131%, значения у животных-опухоленосителей с массой опухоли 0,5 - 2,0 г на 205%, величина быстрой вспышки - на 156% и 231% соответственно.

Следовательно, полученные нами данные подтверждают интенсификацию перекисного окисления при развитии в организме животных опухолевого процесса и демонстрируют, что это усиление имеет место уже на начальном свободнорадикальном этапе ПОЛ.

Сходные, но ещё более выраженные изменения ХЛ мы наблюдали при сочетанном воздействии на организм опухолевого и инфекционного факторов.

В III группе животных (перевивка опухоли осуществлялась одновременно с введением культуры хламидий) интенсивность хемилюминесценции на начальном этапе опухолевого роста (у животных с массой опухоли 0,5 - 2,0 г) также достоверно не отличалась от уровня показателя у интактных животных, хотя

СВЕТСУММА (ХЛ)

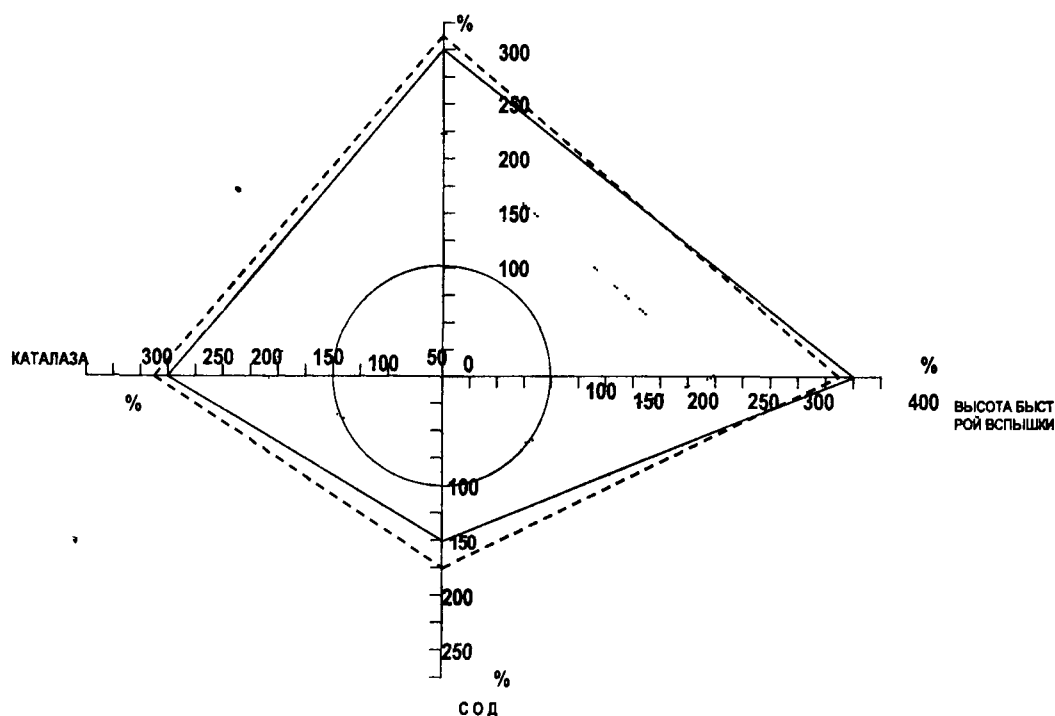


Рисунок 1

Изменение (в % к контролю) показателей ХЛ и активности антиоксидантных ферментов у животных с массой опухоли 13 г и выше при различных экспериментальных воздействиях
 О - интактные животные, — животные-опухоленосители, - - - животные, которым перевивка опухоли проводилась одновременно с инфицированием, — животные, которым перевивка опухоли проводилась после предварительного инфицирования

несколько и превышала уровень последнего во II группе у животных-опухоленосителей без хламидийного компонента. У крыс с массой опухоли 6,0 - 9,0 г величина светосуммы увеличилась на 164%, а величина быстрой вспышки - на 215% по сравнению с интактными животными. При этом величина хемилюминесценции в данной группе (III) была статистически достоверно выше, чем у животных во II группе (с опухолевым процессом, но без инфекционного компонента): величина светосуммы - на 23%, высота быстрой вспышки - на 68%.

При дальнейшем росте опухоли (при массе свыше 13 г) скорость нарастания показателей хемилюминесценции была не такой выраженной. Величина светосуммы превышала уровень у интактных животных на 212%, а высота быстрой вспышки - на 233%. Однако и в данном случае показатели ХЛ были достоверно выше, чем у животных II группы: величина светосуммы на 35%, величина быстрой вспышки - на 30% (табл.1).

Не выявлено существенных отличий в значениях показателей хемилюминесценции у животных III группы и IV группы, в которой перевивка опухоли проводилась после предварительного инфицирования. Так, у животных IV группы при массе опухоли 0,5 - 2,0 г, как и в предыдущем случае, не выявлены достоверно значимые отличия в величине светосуммы и высоте быстрой вспышки от данных интактных животных и крыс-опухоленосителей. Но при массе опухоли 6,0 - 9,0 г величина светосуммы превысила уровень показателя у интактных животных на 168%, а высота быстрой вспышки - на 170%, при массе опухоли 13 г и выше - на 205% и 239% соответственно (табл. 1, рис. 1).

ПОЛ И АОС ПРИ КАНЦЕРОГЕНЕЗЕ И ХЛАМИДИЙНОЙ ИНФЕКЦИИ

Таблица 1. Показатели хемилюминесценции (ХЛ) в динамике опухолевого роста у животных при различных экспериментальных воздействиях

Исследуемые показатели		Светосумма ХЛ (имп. за 6 сек.)			Высота быстрой вспышки (мм)		
Группы животных	Масса опухоли (г)	0,5 – 2,0	6,0 – 9,0	13 и выше	0,5 – 2,0	6,0 – 9,0	13 и выше
II – животные-опухоленосители		6620±642	18692±1011	20159±1759	61,2±5,62	148,4±14,1	202,5±17,8
III – инфекция+опухоль (одновременное воздействие)		8 091±807	22994±1206	27203±2064	72,4±6,90	249,3±20,42	264,1±21,90
IV – инфекция+опухоль (воздействие с интервалом во времени)		7451±701	23386±1470	26599±1819	68,1±6,24	214,2±19,0	268,3±22,76

Примечание: Значения в группе I - интактные животные: светосумма ХЛ - 8721±930 имп. за 6 сек.; высота быстрой вспышки - 79,2±10,2 мм. * - достоверность различий в сравнении с II группой (животные-опухоленосители); ** - достоверность различий в сравнении с животными, имеющими массу опухоли 0,5-2,0 г; *** - достоверность различий в сравнении с животными, имеющими массу опухоли 6,0-9,0 г

Результаты исследования свидетельствуют, что активность СОД у интактных животных составила 13,16±1,32 усл. ед. / мг Нб. У крыс-опухоленосителей (II гр.) с массой опухоли, не превышающей 9,0 г, активность этого фермента достоверно ниже, чем у интактных животных: снижение составляет 68% при массе опухоли 0,5 - 2,0 г и 62% при массе опухоли 6,0 - 9,0 г. При дальнейшем росте опухоли наблюдается увеличение активности фермента, и при массе опухоли выше 13 г она на 177% превышает значения у животных с массой опухоли 0,5 - 2,0 г, однако и в данном случае активность СОД несколько ниже, чем у интактных животных (табл. 2).

В случаях, когда развитие опухолевого процесса протекает на фоне хламидийной инфекции (III и IV группы), активность СОД в обеих группах на всех этапах опухолевого роста значительно превышает значения у животных II группы (без инфекционного компонента). Так, при массе опухоли 0,5 - 2,0 г активность

Таблица 2. Активность антиоксидантных ферментов в динамике опухолевого роста у животных при различных экспериментальных воздействиях

Исследуемые показатели		СОД (усл. ед. / мг Нб)			Каталаза (мкмоль H ₂ O ₂ /мин. · мг Нб)		
Группы животных	Масса опухоли (г)	0,5 – 2,0	6,0 – 9,0	13 и выше	0,5 – 2,0	6,0 – 9,0	13 и выше
II – животные-опухоленосители		4,16±0,51	4,96±0,43	11,54±1,07	56,67±4,93	66,87±5,93	62,24±5,78
III – инфекция+опухоль (одновременное воздействие)		12,63±1,09	16,16±1,23	23,78±2,21	89,52±8,14	89,67±7,08	103,34±9,86
IV – инфекция+опухоль (воздействие с интервалом во времени)		14,89±1,24	18,4±1,38	20,20±1,82	61,73±5,82	88,94±8,23	97,89±8,37

Примечание: Значения в группе I - интактные животные: активность СОД - 13,16±1,32 усл. ед./ мг Нб; активность каталазы - 39,21±2,45 мкмоль H₂O₂ / мин. · мг Нб * - достоверность различий в сравнении с II группой (животные-опухоленосители); ** - достоверность различий в сравнении с животными, имеющими массу опухоли 0,5-2,0 г; *** - достоверность различий в сравнении с животными, имеющими массу опухоли 6,0-9,0 г

фермента у животных III и IV групп превосходит соответствующий показатель во II группе на 204% и на 258% соответственно и не имеет достоверно значимых отличий от уровня СОД у интактных животных. При дальнейшем росте опухоли наблюдается прогрессирующее увеличение активности фермента в описываемых группах. В группе III увеличение активности СОД при массе опухоли 6,0-9,0 г составляет 28%, при массе опухоли 13 г и выше - 47% по сравнению с предыдущим сроком наблюдения. Аналогичная картина наблюдается в IV группе: здесь процент увеличения активности фермента составил 24% и 10% соответственно. В эти сроки сохраняется разница в уровне СОД у животных с двойным воздействием и у животных-опухоленосителей без инфекционного компонента (II гр.): при массе опухоли 6,0 - 9,0 г эта разница у крыс III группы составила 226%, у животных IV группы - 271%; при массе опухоли, превышающей 13 г - 106% и 75% соответственно.

По сравнению с интактными животными достоверное увеличение активности СОД наблюдается: в III группе при массе опухоли выше 13 г (на 81%), в IV группе - как при массе опухоли 6,0 - 9,0 г, так и при массе опухоли, превышающей 13 г (на 40% и 53% соответственно).

Обращает внимание более выраженная степень увеличения активности СОД в ранние сроки развития опухолевого процесса у животных IV группы, у которых развитие инфекционного процесса предшествовало опухолевому росту.

Результаты исследования активности каталазы, представленные в таблице 2, свидетельствуют о том, что во всех экспериментальных группах и во все сроки наблюдения активность фермента была достоверно выше, чем у интактных животных. Активность каталазы в группе интактных крыс составила $39,21 \pm 2,45$ мкмоль H_2O_2 / мин·мг Нв. Мы наблюдали изменения активности данного фермента в динамике исследований. В группе животных-опухоленосителей (II) активность каталазы превышала уровень у интактных крыс при массе опухоли 0,5 - 2,0 г на 45%, при массе 6,0 - 9,0 г - на 71% и при массе опухоли выше 13 г - на 59%.

Повышение активности каталазы наблюдалось и у животных с сочетанным воздействием: у крыс III группы с массой опухоли 0,5 - 2,0 г она превысила уровень у интактных животных на 128%, с массой опухоли 6,0 - 9,0 г - на 129%, с массой опухоли свыше 13 г - на 164%. Сходное увеличение активности фермента на этапах исследования отмечалось и в IV группе экспериментальных животных: на 57%, на 127% и на 150% соответственно.

Достоверно более высокая активность каталазы отмечена у животных с сочетанным поражением по сравнению с контрольной группой крыс-опухоленосителей во всех наблюдениях за исключением животных IV группы с массой опухоли 0,5 - 2,0 г, когда увеличение показателя хотя и имело место, но оказалось статистически недостоверным (табл. 2). При этом, как и в случаях с СОД, более высокая степень увеличения активности каталазы отмечалась на ранних стадиях процесса, особенно выраженная у животных с поэтапным воздействием двух агентов.

Большая скорость нарастания свободнорадикальных процессов и активности СОД и каталазы на начальных этапах у крыс с сочетанным поэтапным воздействием хорошо согласуется с выявленными нами именно у этой категории животных максимальным угнетением Т-клеточного звена и некоторых других иммунологических показателей [18].

Можно думать, что сопряжённое увеличение активности изученных нами важнейших антиоксидантных ферментов у животных является ответной реакцией на усиление свободнорадикальных процессов ПОЛ при хламидийной инфекции, что показано в наших исследованиях.

Отмеченная в процессе наблюдений тенденция к снижению интенсивности нарастания активности изученных антиоксидантных ферментов по мере прогрессирования опухолевого процесса, возможно, свидетельствует об истощении адаптационных возможностей организма, подвергнутого сочетанному воздействию двух факторов - опухолевого и хламидийного.

ПОЛ И АОС ПРИ КАНЦЕРОГЕНЕЗЕ И ХЛАМИДИЙНОЙ ИНФЕКЦИИ

Согласно данным литературы, активные формы кислорода и азота, образующиеся при воспалительном процессе, способствуют повреждению ДНК, белков и клеточных мембран. Воспаление вызывает усиленное повреждение клеток, клеточную смерть и компенсаторно пролиферацию клеток, что может привести к мутагенезу [19, 20]. Процессам образования оксида азота и свободных радикалов кислорода придают значение как в механизмах канцерогенеза, так и при хламидийном инфицировании [2, 21]. Одним из механизмов индуцирования хламидиями канцерогенеза может быть повреждение ДНК в результате окислительного стресса, возникающего при хламидийной инфекции [21, 22]. Как известно, апоптоз является активным процессом, ограничивающим накопление потенциально вредных клеток, таких как инфицированные вирусами или бактериями и раковые клетки [23]. Клетки организма хозяина могут отвечать на внутриклеточную бактериальную инвазию апоптозом [24, 25]. Однако хламидии обладают антиапоптотической активностью, поскольку для облигатных внутриклеточных микроорганизмов, таких как хламидии, полезно ингибировать апоптоз в клетках хозяина для обеспечения внутриклеточного цикла роста и установления впоследствии благоприятных условий для длительной персистенции в макроорганизме [26]. Нарушение баланса между процессами апоптоза и деления при хронической хламидийной инфекции может приводить к неограниченной клеточной пролиферации и тем самым инициировать или способствовать канцерогенезу. Хроническое воспаление прямой кишки, вызванное *Chlamydia trachomatis*, связывают с развитием ректального рака [27]. Специфическая ДНК *Chlamydia trachomatis* была недавно обнаружена в цервикальных тканях, пораженных карциномой [28]. Таким образом, хронические хламидийные инфекции могут способствовать злокачественной трансформации.

Показанная в данной работе достоверно более высокая интенсивность свободнорадикальных процессов у животных, у которых злокачественный рост проходил на фоне хламидийной инфекции, является не только подтверждением роли свободных радикалов в механизме хламидийной инфекции, но и свидетельствует об усугублении тяжести состояния организма при сочетанном действии хламидиоза и опухолевого поражения. Результаты, полученные нами на экспериментальной модели канцерогенеза, сочетанного с хламидийной инфекцией, позволяют оценить ее роль в развитии опухолевого процесса. Независимо от того, является хламидиоз сопутствующим заболеванием или вносит определенный вклад в механизм канцерогенеза, лечение больных со злокачественными новообразованиями и наличием хламидийной инфекции требует комплексного подхода и применения наряду с противоопухолевой и противохламидийной терапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Владимиров Ю.А., Азизова О.А., Деев А.И. и др. (1991) Итоги науки и техники. Сер. Биофизика. **29**, 252 с.
2. Зенков Н.И., Меньшикова Е.Б., Шергин С.М. (1993) Окислительный стресс. Новосибирск, 181с.
3. Dean R.T., Fu S., Stocker R., Davies M.J. (1997) Biochem. J., **324**, 1-18.
4. Henle E.S., Linn S. J. (1997) Biol. Chem., **272**, 19095-19098.
5. Владимиров Ю.А. (1987) Биофизика, **32** (5), 830-844.
6. Kendler B.S. (1995) The Nurse Practitioner, **20** (7), 29-36.
7. Pippenger C.E., Browne R.W., Armstrong D. (1998) Methods Mol. Biol., **108**, 299-313.
8. Ariota O.I. J. (1998) Amer. Oil Chem. Soc., **75**, 199-212.
9. Сидорик Е.П., Баглей Е.А., Данко М.И. (1989) Биохемилюминесценция клеток при опухолевых процессах. Киев. Наукова думка, 216с.
10. Барабой В.А., Бездробная Л.К. (1992) Экспер. онкол., **14** (1), 40-43.

ПОЛ И АОС ПРИ КАНЦЕРОГЕНЕЗЕ И ХЛАМИДИЙНОЙ ИНФЕКЦИИ

11. Гладкова Л.К. (1992) Совершенствование методов терапии женщин, больных урогенитальным хламидиозом, на основании изучения патологической роли нарушений в универсальных системах регуляции. Дис. на соиск. уч. ст. д. м. н. Москва.
12. Igietseme J.U., Uriri I.M., Chow M., A be E, Rank R.G. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **232** (3), 595-601.
13. Раменская Н.П., Романова Л.А., Гашикова Н.В., Петрова З.А., Данилова Л.А., Ярославский В.Н. (1993) *Акт. вопр. дермат. и венер.*, **5**, 77-82.
14. Тимошенко А.В., Травялко Т.Д., Резников А.Г. (1980) *Акушерство и гинекология*, **8**, 14-17.
15. Шестаков В.А., Бойчевская Н.О., Шерстнев М.П. (1979) *Вопр. мед. химии*, **25**, (2), 132-137.
16. Winterburn C.C., Haurins R.E., Bian M., Carrel R. W. (1975) *J. Lab. Clin. Meth.*, **85** (2), 337-341.
17. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. (1988) *Лаб. дело*, N1, 16-19.
18. Гуськова Н.К., Златник Е.Ю., Смирнова Л.А., Закора Г.И., Попович О.А. (2000) *Аллергол. Иммунол.*, **1** (2), 215-221.
19. Parsonnet J. (1999) *Microbes and malignancy. Infection as a cause of human cancers.* Oxford University Press, New York, pp. 372-408.
20. Rosin M., Hofseth L. (1999) *Microbes and malignancy. Infection as a cause of human cancers.* Oxford University Press, New York, pp. 313-445.
21. Mayer J.M., Woods M.L., Vavrin Z. and Hibbs J.B. (1993) *Infect. Immun.* **61**, 491-497.
22. Ramsey K.H., Miranpuri G.S., Sigar I.M., Ouellette S., Byrne G.I. (2001) *Infect. Immun.*, **69**, 5131-5137.
23. Reed J.C. (1995) *Curr. Opin. Oncol.*, **7**, 541-546.
24. Finlay B.B. and Cossart P. (1997) *Science* **276**, 718-725.
25. Zychlinsky A. and Sansonetti P.J. (1997) *Trends Microbiol.*, **5**, 201-204.
26. Fan B., Lu H., Hu H., Shi L., McClarty G., Nance D., Greenberg A., Zhong G. (1998) *J. Exp. Med.*, **187**, 487-496.
27. Levin I., Romano S., Steinberg M. and Welsh R.A. (1964) *Dis. Colon. Rectum*, **7**, 129-134.
28. Schlott T., Ruda G., Hoppert M., Nagel H., Reimer S., Schumacher-Lutge I., Droese M. (1998) *J. Histochem. Cytochem.*, **46**, 1017-1023.

Поступила 21.11.2001

INTENSITY OF CHEMOLUMINESCENCE AND ACTIVITY OF ANTIOXIDANT SYSTEM IN DYNAMICS OF EXPERIMENTAL CARCINOGENESIS COMBINED WITH CHLAMYDIAL INFECTION

N.K. Guskova, I.A. Goroshinskaya, T.A. Rovda

Rostov Research Oncology Institute 14th line 63, Rostov-on-Don, 344037 Russia.
tel.: (863 2) 51-82-44

Experiments on rats with inoculated sarcoma-45 combined with chlamydial infection showed activation of processes of lipid peroxidation already at early free radical stage of lipid peroxidation, that resulted in subsequent increase of activity of key antioxidant enzymes: superoxide dismutase and catalase. With progression of the tumour process developing under conditions of chlamydial infection the intensity of the increase of enzyme activity decreased.

Key words: inoculated tumour, chlamydiosis, lipid peroxidation, antioxidants, chemoluminescence.