

ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ МЕТАБОЛИЗМА ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ ДНК У БОЛЬНЫХ МАСТОПАТИЕЙ

Б.Г.БОРЗЕНКО, В.О.ПАМАЗАН, И.А.ГОРБАЧЕВ, О.А.ВЕРХОВА,
З.М.СКОРОБОГАТОВА, Т.А.ШВЕЦ

Донецкий государственный медицинский университет им.М.Горького, пр.Ильича, 16, Донецк, 340003,
Украина, факс: 35-11-07

Ключевые слова: мастопатия, метаболизм, тимидин, аденазин, диагностика

Введение. Одной из наиболее часто встречающихся форм злокачественного новообразования у женщин является рак молочной железы. К заболеваниям молочной железы, на фоне которых рак возникает в несколько раз чаще, чем в популяции, относят прежде всего дистормональные дисплазии (фиброаденоматоз), доброкачественные опухоли (фиброаденомы), хронический мастит, различные формы мастопатии [1,2,3].

Неопластическая трансформация связана с нарушением таких фундаментальных биологических процессов как рост, пролиферия, наследование клеточных признаков в потомстве, в основе которых лежит метаболизм нуклеиновых кислот и их предшественников. Экспериментально установлено, что влияя на метаболизм тимидилата, можно влиять на обмен ДНК и органически связанный с ним процесс деления [4]. Тимидилат образуется в тканях различными путями, соотношение и интенсивность которых изменяется при неопластической трансформации. Именно для неоплазмы характерно увеличение синтеза тимидинмонофосфата по "запасному" пути для продуктов незавершенного катаболизма нуклеотидов ДНК. Этот путь энергетически более выгоден и намного быстрее основного пути. Ключевым ферментом биосинтеза тимидилата в этом случае является тимилинкиназа. Этот фермент принято считать маркером клеточной пролиферации [5], активность его резко увеличена в быстрорастущих тканях. Нам представляется, что более точную информацию дает изучение не только активности тимидинкиназы, но и фермента, конкурирующего с ним за один субстрат — тимидинфосфорилазы. Кооперативная работа этих ферментов обеспечивает регуляцию биосинтеза ДНК по "запасному" пути на уровне фосфорилирования. Сравнительное исследование активности данных ферментов, возможно, позволит выявить особенности возникновения пролиферативных процессов у человека. Опухолевому росту присущ вторичный иммунодефицит, обусловленный, в частности, состоянием адениннуклеотидного обмена клеток иммунной системы. Это, возможно, связано с участием пуриновых нуклеотидов в репликации ДНК, образовании иммуноглобулиновых "областей" в плазматической мембране и др. [6]. Ключевыми ферментами метаболизма аденозина являются аденозиндезаминаза и 5'-нуклеотидаза АМФ, сопряженная активность которых в известной мере является характеристикой иммунного статуса организма.

Таким образом, сравнительное исследование ферментов метаболизма тимидина и аденозина в организме здоровых людей и больших групп людей повышенного онкологического риска поможет выявить некоторые метаболические нарушения, приводящие к возможности неопластической трансформации. Целью данного исследования было определение активности ферментов метаболизма тимидина и аденозина в

тканях, сыворотке и лимфоцитах здоровых женщин и больных фиброзно-кистозной мастопатией различного возраста.

Методика. Исследована сыворотка крови 60 практически здоровых женщин и 50 больных фиброзно-кистозной мастопатией в возрасте от 23 до 70 лет. Исследуемые ферменты определяли одновременно в сыворотке крови и лимфоцитах.

Лимфоциты выделяли в градиенте фиколл-верографина [7].

Активность сывороточной тимидинкиназы определяли по общеизвестному методу [8] в некоторой модификации, используя в качестве субстрата (^{14}C) тимидин отечественного производства. Радиактивность дисков (диски DEAE целлюлозной бумаги Лимбо, Великобритания) подсчитывали в сцинтиляционной жидкости ЖС-8 на счетчике отечественного производства СВС-2. Удельную активность тимидинкиназы выражали в наномолях тимидинфосфата, образованного за 2 час в пересчете на 1 мг сывороточного белка.

Активность тимидинфосфорилазы определяли спектрофотометически [9] на спектрофотометре СФ-26 при длине волны 300 нм по увеличению оптической плотности тимина в 0,01 н. NaOH. Удельную активность фермента выражали в наномолях на 1 мг белка в течение 30 мин инкубации.

Активность лимфоцитарной и сывороточной аденозиндезаминазы определяли спектрофотометрическим методом [10] по начальной скорости реакции. Удельную активность выражали в наномолях аденозина, превращенного в 1 минуту в расчете на 1 мг белка или 10^6 клеток.

Активность лимфоцитарной и сывороточной 5'-нуклеотилазы АМФ определяли по количеству неорганического фосфата [11] в цветной реакции с двухлористым оловом, используя в качестве субстрата неспецифической фосфатазы Na-глицерофосфат (в контрольных пробах). Удельную активность выражали в наномолях неорганического фосфата, отщепившегося за 120 минут инкубации в пересчете на 1 мг белка.

Белок определяли по Лоури с соавт. [12]. Полученный материал обработан статистически с использованием метода корреляционного анализа.

Результаты и обсуждение. Одним из наиболее доступных биологических объектов для изучения процессов, протекающих в организме человека, является сыворотка крови. Однако часто возникают сомнения, насколько точно активность сывороточного фермента отражает метаболические процессы, протекающие в тканях. Поэтому в первой серии исследований, на наш взгляд, было необходимо изучить возрастную динамику сравнительной активности сывороточной и тканевой тимидинкиназы. Установлено, что активность тканевой тимидинкиназы на порядок выше активности фермента сыворотки. Однако возрастные изменения тимидинкиназы в тканях и сыворотке крови здоровых женщин аналогичны, поэтому в дальнейшем исследовали активность тимидинкиназы сыворотки крови здоровых женщин и больных мастопатией различного возраста. Изучена активность ферментов метаболизма тимидина и аденозина в сыворотке крови здоровых женщин в возрасте от 23 до 60 лет. Полученные данные обработаны также методами корреляционного анализа на ЭВМ. Анализ матрицы коэффициентов парных корреляций показал выраженную парную прямую зависимость активности тимидинкиназы и тимидинфосфорилазы от возраста обследуемых. Однако, интенсивность увеличения активности тимидинкиназы на порядок превышает таковую для тимидинфосфорилазы ($K_{\text{тк}} = 0,062$; $K_{\text{тф}} = 0,001$). Достоверное увеличение активности тимидинкиназы после 45 лет вызвано, возможно, гормональной перестройкой в организме женщины этого возраста. В экспериментальных исследованиях установлено, что фермент индуцируется под действием эстроге-

нов. При овариоэктомии активность тимидинкиназы резко изменяется [13]. Это может быть причиной более интенсивного включения тимидилата в ДНК, а значит, и увеличения биосинтеза ДНК и скорости клеточной пролиферации.

При изучении активности ферментов метаболизма аденозина в сыворотке крови здоровых женщин установлено достоверное в 2,5 раза увеличение активности аденозиндезаминазы и в 1,2 раза увеличение активности 5'-нуклеотидазы АМФ. У обследуемых старше 46 лет активность ферментов снижалась соответственно в 2 и в 1,2 раза.

При исследовании активности ферментов метаболизма предшественников ДНК в сыворотке крови больных мастопатией установлено возрастное увеличение активности тимидинкиназы у больных 46-60 лет. Абсолютные величины активности у больных фиброзно-кистозной мастопатией не отличаются от нормы. Активность тимидинфосфорилазы в 23-45 лет колеблется в пределах нормы. У больных мастопатией в возрасте 46-60 лет активность фермента достоверно снижается в 1,2 раза. Определение активности ферментов метаболизма аденозина выявило увеличение активности аденозиндезаминазы в сыворотке крови больных мастопатией, особенно в возрасте 23-35 лет (в 4,8 раза) и 46-60 лет (в 4 раза). Активность 5'-нуклеотидазы колеблется в пределах нормы у больных в возрасте 23-45 лет. В возрастной группе 46-60 лет активность фермента достоверно снижается.

Известно, что изменение активности аденозиндезаминазы и 5'-нуклеотидазы в лимфоцитах может привести к накоплению в них аденозина и его фосфорилированных производных, что может вызвать нарушение пролиферации, дифференцировки и функциональных способностей лимфоцитов [14,15]. Поэтому нами проведено определение активности аденозиндезаминазы не только в сыворотке крови, но и в лимфоцитах здоровых женщин различного возраста. Проведенный корреляционный анализ полученных результатов позволил выявить снижение активности лимфоцитарного фермента с увеличением возраста обследуемого, описываемое уравнением: $\text{активность аденозиндезаминазы} = 2,67 - 0,012 \times \text{возраст}$.

В последующей серии исследований мы провели сравнение активности ферментов метаболизма аденозина в сыворотке крови и лимфоцитах здоровых женщин и больных мастопатией в возрасте 46-60 лет табл 3. Именно в этой возрастной группе у обследуемых были обнаружены наиболее резкие сдвиги ферментативной активности. Одновременно определялась активность некоторых иммунологических показателей, в частности, реакция бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ). Установлено, что изменение активности исследуемых ферментов в сыворотке крови обратно коррелирует с изменением их активности в лимфоцитах. У больных мастопатией активность аденозиндезаминазы и 5'-нуклеотидазы, превышающая в сыворотке крови норму, снижена в лимфоцитах. Одновременно снижается и индекс бласттрансформации лимфоцитов, указывающий на снижение иммунной реактивности организма у больных данного возраста.

Полученные результаты указывают на особенности изменения активности ферментов метаболизма тимидина и аденозина в сыворотке крови здоровых женщин в возрасте 23-70 лет. Установлено, что активность тимидинкиназы у обследуемых 46-60 лет практически вдвое выше, чем у женщин в других возрастных группах. Тимидинкиназная активность регулируется стероидными гормонами, в частности, эстрогенами, и изменение фона половых гормонов у женщин 46-60 лет (а это женщины, находящиеся в менопаузе от 1 года до 20 лет) может привести к увеличению активности фермента. Установлена четкая прямая корреляция между активностью тимидинкиназы и интенсивностью пролиферативных процессов, позволявшая назвать

фермент индексом клеточной пролиферации [16]. В последние годы к факторам онкологического риска многие исследователи относят и возраст [17]. Показано, что больные в возрасте до 20 лет составляют 0,095%, 20-25 лет — 2,6-7,5%, а наиболее часто рак молочной железы встречается в возрасте 46-60 лет [18]. Возможно, что увеличение активности тимидинкиназы у женщин этого возраста является одной из причин возникновения опухолевой патологии. В связи с этим, особый интерес представляет сравнительный анализ возрастной динамики исследуемых ферментов у женщин 46-60 лет, больных мастопатиями. В этой группе обследуемых на фоне самой высокой возрастной активности тимидинкиназы наблюдается снижение активности фермента деградации тимидина — тимидинфосфорилазы. Эти изменения в метаболизме пиримидиновых нуклеотидов могут привести как к усилению их биосинтеза, так и к усилению биосинтеза ДНК в целом. Необходимо отметить, что степень онкологического риска усугубляется обнаруженным в лимфоцитах больных мастопатиями резким снижением активности аденозиндезаминазы, что отрицательно влияет на иммунологический статус организма.

Таким образом, выявленные возрастные изменения метаболизма тимидина и аденозина в организме здоровых женщин и больных мастопатией в возрасте 46-60 лет еще раз свидетельствуют о необходимости проведения скрининга рака молочной железы у женщин данного возраста. Возможно использование с этой целью, в качестве ферментативного теста, активности тимидинкиназы, тимидинфосфорилазы и аденозиндезаминазы в сыворотке крови обследуемых.

ЛИТЕРАТУРА

1. Березкин Д.П., Филатов В.И.//Вопросы онкологии. -1989. -Т.35. -N 5. -583-585
2. Beunett J., Baher C., McCaffrey J. e.a.//The Breast. -1996. -Vol.5., P.67-74
3. Brinton L.A., Politichmen N.A., Swanson C.A. e.a.//Cancer Causes and Control. -1995. -Vol.6. N 3. -P.199-208
4. Shiotoni F., Hashimoto V., Tanahe T.//Cancer Res., -1989. -Vol.49. N 5. -P.1090-1054
5. O'Naill K.L., Grigsby R.V., Fairbairn D.W.//The Breast. -1995. -Vol.4. N 2. -P.79-94
6. Duan D.S., Sadee W.//Cancer Res. -1987. -Vol.47. N 8. -P.4077-4051
7. Owen M.J., Crumpton M.Y.//Cell population. -London, 1979. -P.203-211
8. Bresnick E., Pursson S.//Cancer Research. -1970. -30. N 4. -P.1060-1065
9. Борзенко В.Г., Горбачев А.А., Думанский Ю.В. и др.//Вопр. мед. химии. -1986. -32. N 6. -стр.52-54
10. Tritsch G.L.//Anal.Biochem. -1983. V.-129. N 1. -P.207-209
11. Edwafds N.E., Cassidy J.T., Fox J.H.//Clin. Immunol. and Immunopathol., -1980. -17. N 1. -P.76-88
12. Lowry C.H., Rosebroug N.J., Farr A.L., Randall B.J.//J.Biol Chem. -1951. -293. N 1. -P.265-267
13. Герштейн Е.С., Бассалык Н.С.//Вести АМН СССР. -1985. -41-44
14. Дмитренко И.П., Горошникова Т.В.//Биохимия. -1987. -Т.52. N 6. -750-757
15. Mandai M., Konishi J., Koshiyama M. e.a.//Cancer. -1995. -Vol.75. N 5. -P.2523-2529
16. Борзенко В.Г.//Укр. биох. ж. -1990. -Т.12. N 1. -13-43
17. Tabar L., Fagerberg G., Chan H.//Cancer. -1995. -Vol.75 N 10. -P.2507-2517
18. Stoll B.A.//Annals of Oncology. -1995. -Vol.6 N 3. -P.245-248

AGE-RELATED CHANGES IN DNA PRECURSORS METABOLISM IN PATIENTS WITH MASTOPATHY

B.G.Borzenko, V.O.Pomazan, I.A.Gorbachev, O.A.Verkhova, Z.M.Skorobogatova, T.A.Shvetz.

The activity of thymidine kinase, thymidine phosphorylase, adenosine deaminase and 5'-nucleotidase of AMP was studied in tissues, blood serum and lymphocytes of 60 healthy females and 50 females with fibrocavernous mastopathy aged 23-70. It was revealed that age-related changes in the activity of thymidine kinase in blood serum reflect the analogous changes in enzyme activity in tissues of healthy women.

A direct correlation was established between thymidine kinase activity and age both in healthy females and those with mastopathy. A significant decrease in activity of thymidine phosphorylase was demonstrated in blood serum of patients with mastopathy aged 46-60. Determined 4-fold increase in activity of adenosine deaminase in serum was accompanied by decreased enzyme activity in lymphocytes and decreased Lymphocyte Blast Transformation Index in the same age range.

The revealed metabolic changes in DNA-precursors' metabolism in patients with mastopathy aged 46-60 might be one of the reasons of increased risk of oncological diseases in this age group.

Key words: mastopathy, enzymes of thymidine metabolism, blood serum, lymphocytes.