

Жуков В.И., *Винник Ю.А., Баранников К.В., Моисеенко А.С.,

Зайцева О.В., Гордиенко Н.А., Бондаренко М.А.

Харьковский национальный медицинский университет

**Харьковская медицинская академия последипломного образования*

Изучение состояния окислительной NO-синтазной системы у больных колоректальным раком

В последние годы в научной литературе появилось большое количество работ, свидетельствующих о важной роли оксида азота (NO) как полифункционального регулятора структурно-метаболических процессов [1]. Согласно современным представлениям, газообразный химический медиатор NO играет универсальную роль модулятора физиологических функций сердечно-сосудистой, нервной, иммунной, мышечной, дыхательной, пищеварительной и других систем организма.

Оксид азота отвечает за состояние тонуса сосудов, межклеточную коммуникацию, модуляцию нейротрансмиссии, уровень иммунной цитотоксичности, секрецию медиаторов и гормонов. Оксид азота, вместе с тем, потенциально токсическая молекула, которая широко представлена при гипертензии, сахарном диабете, новообразованиях, нейродегенеративных процессах, атеросклерозе, циррозе печени, заболеваниях почек и других патологических состояниях организма. Эта молекула может быть губительной как для клеток, включая раковые, так и для внутриклеточных патогенных микроорганизмов. Установлено, что цитотоксичность NO является результатом образования большого количества этих молекул и инициацией апоптоза [1, 2]. Двойственность действия NO проявляется в его способности защищать клетку от апоптозных сигналов и вызывать апоптоз. Будет ли молекула NO обладать цитотоксическими функциями или проявится её цитотоксичность, зависит от типа клетки, фазы её развития, биоэлектрического потенциала, локальной концентрации NO и других активных форм кислорода. Получено много новых данных о метаболизме NO в живой клетке и структуре NO-синтазы. В

организме NO синтезируется из аминокислоты L-аргинина. Этот процесс представляет собой комплексную окислительную реакцию, катализируемую ферментом NO-синтазой (NOS), который является полифункциональной оксидоредуктазой, напоминающей по ряду свойств систему цитохром P₄₅₀-редуктазу [3]. В настоящее время идентифицированы три изофермента NOS, которые названы в соответствии с тем типом клеток, где они были впервые обнаружены [1-3]: нейрональная (nNOS), индуцибельная (iNOS), или макрофагальная (mNOS), и эндотелиальная (eNOS). Все изоформы NOS катализируют образование NO в ответ на рецепторную, химическую, биологическую или физическую стимуляцию.

Свободный радикал NO в клетке быстро взаимодействует с молекулярным кислородом, супероксидным анион-радикалом и металлами гемсодержащих и негемовых белков. В результате в клетке образуются нитрозильные комплексы гемового и негемового железа. Непосредственно с SH-группами белков взаимодействует NO⁺, который образуется из NO[·] после восстановления или взаимодействия с металлами. В результате в клетке при достаточном количестве тиолов под влиянием NO происходит нитрозилирование и изменение активности металлосодержащих белков, а также белков, имеющих активные цистеиновые центры. Регуляция активности белков нитрозилированием - один из способов контроля функции белков в клетке. В случае образования больших количеств NO последний под действием NOS может реагировать с супероксидным анионом, образуя другую активную форму кислорода - пероксинитрит (ONOO⁻). Последний может вступать в реакцию восстановления с глутатионом и углекислым газом. В этом случае образуется нитрозопероксикарбонат (ONO₂CO₂⁻), который может вызывать химическую модификацию реактивных остатков тирозина в белках, что сопровождается изменением их активности. Кроме этого, токсичный пероксинитрит способен неэнзиматически продуцировать высоко реакционноспособные гидроксильные радикалы (OH[·]), включая таким образом молекулу NO в образование новых активных форм кислорода. Последние (OH[·],

NO[•], ONOO⁻) могут окислять белки и липиды, разрушать структуру биологических мембран [3-6]. В основе широкого разнообразия NO-эффектов в клетке лежат изменение редокс-формы молекулы NO, а также дополнительные реакции с металлами, тиолами и остатками тирозина в составе белков. Увеличение количества активных форм кислорода (АФК) в клетке может трансформировать эффекты NO из защитных в цитотоксические. Последние могут возникнуть не только при индукции NOS эндотоксинами, но и при истощении в клетке резерва тиолов и увеличении концентрации АФК, что приводит к уменьшению скорости нитрозилирования белков.

Учитывая вышесказанное, **целью работы** явилось изучение состояния NO-синтазной окислительной медиаторной системы у больных колоректальным раком (КРР) и определение содержания в сыворотке крови токсичного продукта окислительного дезаминирования - аммиака.

Материалы и методы исследования. Клинически обследовано 239 больных КРР в возрасте от 35 до 76 лет (146 мужчин и 93 женщины). В зависимости от формы развития рака толстого кишечника больные распределились следующим образом: рак прямой кишки (РПК) выявлен у 29 мужчин и 25 женщин; сигмовидной (РСК) - у 35 мужчин и 25 женщин; слепой (РСЛК) - у 15 мужчин и 12 женщин; поперечно-ободочной (РПОК) - у 48 мужчин и 18 женщин; толстой (РТК) - у 17 мужчин и 13 женщин. Первая (I) стадия опухолевого процесса определена у 6 пациентов (4 мужчин и 2 женщины); вторая (II) - у 34 (18 мужчин и 16 женщин); третья (III) - у 161 (104 мужчины и 57 женщин) и четвертая (IV) - у 38 пациентов (20 мужчин и 18 женщин) с неоперабельным течением новообразования. Группа сравнения (контрольная группа) включала 43 условно здоровых пациента в возрасте от 40 до 65 лет (23 мужчины и 20 женщин).

Программа исследования NO-синтазной окислительной системы предусматривала определение в сыворотке крови как больных, так и условно здоровых пациентов продуктов окисления оксида азота - нитритов (NO₂), нитратов (NO₃), S-нитрозотиола, активности эндотелиальной (eNOS) и

индуцибельной NO-синтазы (iNOS), а также одного из токсичных субстратов окислительного дезаминирования аминокислот, биогенных моноаминов, амидов аминокислот (L-глутамина и L-аспарагина), пуриновых, азотистых оснований и др. - аммиака (NH₃). Содержание NO₂, NO₃, S-нитрозотиола, активности eNOS и iNOS определялись в соответствии с методическими рекомендациями [6].

Аммиак в сыворотке крови исследовался методом ионообменной хроматографии на ионитах. После разделения аминокислот на ионитах, регистрация их количества и NH₃ осуществлялась на автоматическом анализаторе аминокислот Т-339 (Чехословакия). Статистическая обработка полученных результатов проводилась с использованием критерия Стьюдента-Фишера по программе «Биостатистика».

Результаты исследования и их обсуждение. Изучение состояния NO-синтазной окислительной системы у больных при I стадии развития КРР обнаружило повышение содержания в сыворотке крови метаболитов обмена оксида азота - нитритов, нитратов, S-нитрозотиола и активности эндотелиальной и индуцибельной NOS (табл. 1). Учитывая, что I стадия КРР была установлена только у 6 пациентов (4 мужчины и 2 женщины), средние значения анализируемых показателей были представлены совместно без разделения по полам. Обнаружены достоверные различия в активности NO-синтазной окислительной системы у больных и условно здоровых пациентов.

При II и III стадиях развития опухолевого процесса отмечалось значительное увеличение содержания в сыворотке крови аммиака, нитритов, нитратов и активности ферментов eNOS и iNOS.

Таблица 1

Состояние NO-синтазной окислительной системы у больных КРР при первой стадии опухолевого процесса

Группа Наблюдения (n)	Показатели, M±m					
	NH ₃ (нмоль/л)	NO ₂ (мкм/л)	NO ₃ (мкм/л)	S-нитрозотиол (ммоль/л)	eNOS (пмоль/мин·мг белка)	iNOS (пмоль/мин·мг белка)

Больные (n=6)	32,5±1,83*	18,43±1,26*	30,4±1,6*	0,29±0,04	0,88±0,07	0,32±0,05
Мужчины условно здоровые (n=23)	21,6±1,38	14,20±1,35	25,6±1,7	0,26±0,05	0,81±0,05	0,23±0,06
Женщины условно здоровые (n=20)	24,2±1,96	15,65±1,43	24,2±1,6	0,27±0,04	0,83±0,036	0,27±0,05

Примечание: * - различия с группой “условно здоровые” достоверные, $p < 0,05$.

Комплексная оценка окислительной системы оксида азота свидетельствовала о повышении уровня его депонирования в зависимости от стадии формирования патологического процесса и степени тяжести болезни. Так, уровни S-нитрозотиола превышали таковые условно здоровых групп пациентов более, чем в 3-4 раза. Результаты оценки состояния NOS-окислительной медиаторной системы указывают на развитие при КРР эндотоксии, степень которой тесно сопряжена со стадией болезни, тяжестью течения патологического процесса и уровнем накопления в сыворотке крови основного продукта окислительного дезаминирования - аммиака. Особенно, высокие уровни его обнаруживались при III и IV стадиях болезни, что может свидетельствовать о нарушении как пищеварения, так и процессов, связанных с его обезвреживанием в организме при развитии онкопатологии.

При IV стадии опухолевого процесса, в условиях неоперабельности патологического процесса, наблюдалось значительное увеличение в сыворотке крови содержания аммиака, нитритов, нитратов и S-нитрозотиола на фоне существенного снижения активности ферментов eNOS и iNOS, что может служить прогностически неблагоприятным показателем выздоровления пациентов.

Таким образом, анализ содержания оксида азота и состояния динамики окислительной NO-синтазной системы выявил сопряженность активации свободнорадикальных процессов на фоне развития эндогенной интоксикации организма, которые сопровождались значительным повышением в сыворотке крови содержания аммиака, NO_2 , NO_3 , S-нитрозотиола, что может быть

использовано при разработке и обосновании комплекса лечебно-оздоровительных и реабилитационных мероприятий для каждой стадии КРР.

Литература

1. Гуревич К.Г., Шимановский Н.Л. Оксид азота: биосинтез, механизмы действия, функции// Вопросы биологии медицины и фармакологической химии. - 2000. - №4. - С. 16-21.
2. Киселик І.О., Луцик М.Д., Шевченко Л.Ю. Особливості визначення нітратів та нітритів у хворих на вірусні гепатити та жовтяниці іншої етіології// Лабораторна діагностика - 2001. - №3. - С.43-45.
3. Малышев И.Ю. Введение в биохимию оксида азота. Роль оксида азота в регуляции основных систем организма// Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии - 1997. - №1. -С.49-56.
4. Невзорова В.А., Зуга М.В., Гельцер Б.И. Роль оксида азота в регуляции легочных функций// Терапевтический архив - 1997. - Т.69,№3: - С.68-73.
5. Метельська В.А., Гуманова Н.Г. Клінічна лабораторна діагностика// 2005. - Т.6.-С.15-18.
6. Ковальова О.М., Демиденко Г.В., Горбач Т.В. Діагностика ендотеліальної функції - оцінка вазоактивного пулу оксиду азота// Методичні рекомендації МОЗ України. - Київ. - 2007. - 20с.