



А. Ю. Белая,  
Н. В. Красносельский

«ГУ Институт  
медицинской радиологии  
им. С. П. Григорьева НАМН  
Украины», г. Харьков

© Белая А. Ю.,  
Красносельский Н. В.

## ОЦЕНКА ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ И СОСТОЯНИЕ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ У БОЛЬНЫХ С РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

**Резюме.** У пациенток всех групп с раком молочной железы по результатам изучения активности NO-синтазной окислительной системы выявило: повышение содержания в сыворотке крови нитритов, нитратов, S-нитрозотиолов и активности эндотелиальной и индуцибельной NO-синтазы. Показатели NO-синтазной окислительной системы составили: нитраты (37,2 мкмоль/л) для стадии Tis и (107,2 мкмоль/л, 149,3 мкмоль/л) при I, II стадиях развития заболевания соответственно. S-нитрозотиолы повышались на 87,3, 147,8 и 215,5 %. Индуцибельная NOS повышена на 48,4, 92,5 и 132,9 % соответственно при стадии Tis и I, II стадиях развития заболевания. Так, исследования показали увеличение в сыворотке крови содержания гликозаминогликанов на 84,1 и 175,2 % при дольковой и потоковой локализации опухолевого процесса соответственно, а также активности эластазы (58,2±1,4) пг/мл и (74,1±1,5) пг/мл соответственно. Колагенолитическая активность имела схожую тенденцию и была повышена на 48,5 и 73,4 %, соответственно при дольковой и потоковой локализации опухолевого процесса.

**Ключевые слова:** рак молочной железы, стадия Tis, эластаза, гликозаминогликаны, колагенолитическая активность, NO-синтаза.

### Введение

Рак молочной железы (РМЖ) занимает ведущее место в структуре онкопатологии у женского населения Соединенных Штатов Америки, Австралии, Европы и Украины [3, 4, 5, 8, 9]. Высокая чувствительность РМЖ к большинству современных цитостатиков обуславливает широкое применение различных режимов химиотерапии при данной патологии. Для первой линии полихимиотерапии опухолей молочной железы чаще всего используется комбинация циклофосфана, доксорубина и 5 фторурацила (схемы CAF, FAC), что обусловлено достаточной эффективностью (60–64 %) и экономической целесообразностью применения указанной схемы в широкой клинической практике [3, 4]. Эндотелиальную дисфункцию (ЭД) в целом можно определить как дисбаланс между сосудорасширяющими и сосудосуживающими субстанциями, которые вырабатываются и действуют в эндотелии [7].

Среди избытка биологически активных веществ, вырабатываемых эндотелием, важнейшим является оксид азота — NO. Открытие ключевой роли NO в сердечно-сосудистом гомеостазе было удостоено Нобелевской премии в 1998 году. Нормально функционирующий эндотелий отличает непрерывная выработка NO с помощью эндотелиальной NOS-синтазы (eNOS) из L-аргинина [10]. Это необходимо для поддержания нормального тонуса сосудов.

В то же время, NO подавляет пролиферацию гладкой мускулатуры сосудов, предотвращает патологическую перестройку сосудистой стенки, прогрессирование атеросклероза [11, 12].

В высоких концентрациях NO может оказывать на клетки токсический эффект, связанный с образованием сильного окислителя, очень реакционного и токсичного свободно-радикального соединения — пероксинитрита (ONOO<sup>-</sup>). Пероксинитрит образуется при взаимодействии NO с супероксидным анион-радикалом (O<sub>2</sub><sup>-</sup>). В клетках, подвергнутых действию высоких концентраций NO, нарушается энергетический обмен и синтез ДНК. В организме с опухолью эта способность оксида азота используется для уничтожения опухолевых клеток макрофагами, которые не только сами производят NO, но и секретируют фактор некроза опухолей, вызывающий индукцию NOS в опухолевых и других клетках [2, 13].

### Цель работы

Изучение динамики показателей NO-синтазной окислительной системы и соединительной ткани у больных раком молочной железы.

### Материалы и методы исследования

В работе клиническому обследованию подверглись 127 пациентов больных раком молочной железы в возрасте от 21 до 73 лет,



которые находились на лечении в ГУ «Институт медицинской радиологии им. С. П. Григорьева НАМН Украины». Лабораторно-инструментальными и гистоморфологическими методами у 9 пациентов диагностирована стадия Tis, у 42 — первая стадия и у 76 — вторая стадия заболевания. У 62 пациенток гистологически был диагностирован лобулярный рак молочной железы и у 55 — протоковый. Группа сравнения была представлена пациентами, не имеющих онкологической патологии в возрасте от 25 до 65 лет.

Забор материала и исследования проводились в первые сутки после госпитализации, до оперативного вмешательства и патогенетической терапии. Для изучения состояния NO-синтазной окислительной системы в сыворотке крови определялось содержание продуктов окисления оксида азота — нитритов (NO<sub>2</sub>), нитратов (NO<sub>3</sub>), S-нитрозотиола и активность эндотелиальной (э NOS) и индуцибельной (и NOS) NO-синтазы в соответствии с методическими рекомендациями [1]. Для оценки состояния соединительной ткани в плазме крови определяли содержание гликозаминогликанов, активность ферментов эластазы и коллагенолитическую активность (КЛА) сыворотки крови [5, 6]. Оценку КЛА плазмы крови осуществляли по суммарному количеству (при ферментативном гидролизе) свободного и пептидно-связанного оксипролина в диагностируемой пробе, используя для этого калибровочную кривую и соответствующее значение количества оксипролина при длине волны λ=570 мкм. Величину КЛА сыворотки крови выражали в микромолях оксипролина на 1 л плазмы крови за 1 час (мкмоль/(л·ч)) [4]. Сумарные гликозаминогликаны (кислые мукополисахариды) определяли в сыворотке крови с использованием ТХУ в карбазольной реакции, которая обеспечивает фиолетово-розовое окрашивание, фотометрирование проб осуществляли при длине волны λ=530 нм. Содержание ГАГ выражали через гексуроновые кислоты в мкмоль/л [5]. Эластазу в сыворотке крови исследовали иммуноферментным методом с использованием моноклональных

антител и тест-системы (Human PMN-Elastase Platinum ELISA, BMS269CE) по прилагаемой инструкции фирмы «eBioscience», США.

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием t-Критерия Стьюдента-Фишера.

**Результаты исследований и их обсуждение**

У пациенток всех групп с раком молочной железы по результатам изучения активности NO-синтазной окислительной системы выявило повышение содержания в сыворотке крови нитритов, нитратов, S-нитрозотиолов и активность эндотелиальной и индуцибельной NO-синтазы (табл. 1), однако они имели достоверные отличия между группами.

Так, нитриты повышались на 43,5, 60,8 и 91,3 % соответственно при стадиях Tis и I, II стадиях развития заболевания. Данный показатель является маркером эндотелиальной дисфункции, а так как рак молочной железы протекает с повышенной воспалительной реакцией, мы можем его использовать для прогноза течения заболевания т. к. по нашим данным его повышение наблюдается уже на ранних стадиях у пациенток с раком молочной железы.

Остальные показатели NO-синтазной окислительной системы имели схожую динамику и составили: нитраты (37,2±2,5) мкмоль/л для стадии Tis и (107,2±3,3) мкмоль/л и (149,3±3,8) мкмоль/л при I, II стадиях развития заболевания соответственно. При изучении динамики показателей S-нитрозотиолы повышались на 87,3; 147,8 и 215,5 %; эндотелиальная NOS имела схожую динамику, однако при стадии Tis не имела достоверной разницы с контрольными значениями и составила (0,77±0,06) пмоль/мин·мг белка в остальных группах она достоверно (p≤0,05) превышала показатели условно-здоровых пациентов; индуцибельная NOS на 48,4; 92,5 и 132,9 % соответственно при стадиях Tis и I, II стадиях развития заболевания.

Оксид азота, участвует в проведении сигнала от мембранных рецепторов к молекулам внутриклеточных структур, в том числе, и по гуанилатциклазному пути; как паракринный

Таблица 1

**Активность NO-синтазной окислительной системы у больных гастроинтестинальным раком**

Показатели	Группа наблюдения, M±m, стадия рака			
	Условно-здоровые (n=20)	Tis-стадия (n=9)	I-стадия (n=42)	II-стадия (n=76)
NO <sub>2</sub> , мкмоль/л	20,7±1,6	186,3±1,9*	260,5±2,4*	375,5±2,9*
NO <sub>3</sub> , мкмоль/л	25,9±2,6	37,2±2,5*	107,2±3,3*	149,3±3,8*
S-нитрозотиол, ммоль/л	0,31±0,04	0,49±0,05*	0,68±0,06*	0,91±0,06*
эNOS, пмоль/мин·мг белка	0,75±0,06	0,77±0,06	1,12±0,07*	1,33±0,08*
иNOS, пмоль/мин·мг белка	0,42±0,03	0,63±0,04*	0,79±0,05*	1,04±0,05*

Примечание. \* различия достоверные, p<0,05

эфектор, NO вносит вклад в согласованную работу близлежащих клеток, участвуя в образовании молекулярных систем межклеточной сигнализации [6, 7]. Оксид азота, вместе с тем, потенциально токсичная молекула, которая широко представлена не только при гипертензии, сахарном диабете, атеросклерозе и циррозе печени, но и при новообразованиях различной локализации. Установлено, что цитотоксичность NO является результатом образования большого количества этих молекул и инициацией апоптоза. Результаты исследования свидетельствуют, что при раке молочной железы, отмечается значительное накопление оксида азота и его метаболитов обмена — нитритов, нитратов, S-нитрозотиолов, которые сопряжены с накоплением возможно и других активных форм кислорода. Согласно данным литературы, заболевание с выраженной воспалительной реакцией характеризуется повышением уровня оксида азота, а так как патология молочной железы относится к заболеваниям с повышенной воспалительной реакцией — это нашло свое отражение в результатах нашего исследования. Установлено, что оксид азота действует как важный регулятор таких общих клеточных процессов как экспрессия генов и функциональная активность митохондрий. Известно, что в организме NO синтезируется из аминокислоты L-аргинина. Этот процесс представляет собой комплексную окислительную систему катализируемую ферментом NOS.

Косвенно наши данные подтверждаются увеличением активности эндотелиальной и индуцибельной NO-синтазы, что свидетельствует о повышении оксида азота, который быстро взаимодействует с молекулярным кислородом, супероксидным анион-радикалом и металлами гемсодержащих и негемовых белков. Непосредственно с SH-группами белков взаимодействует NO<sup>+</sup>, который образуется из NO<sup>°</sup> после восстановления или взаимодействия с металлами. В результате в клетке при достаточном количестве тиолов под влиянием NO происходит нитрозилирование и изменение активности металлсодержащих 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), который способен вступать в реакцию восстановления с глутатионом и углекислым газом. В этом случае образуется нитрозопероксикарбонат (ONO<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>), который может вызывать химическую модификацию реактив-

ных остатков тирозина в белках, что сопровождается изменением их активности. Кроме этого, токсичный пероксинитрит способен неинзиматически продуцировать высокие реакционноспособные гидроксильные радикалы (OH), включая, таким образом, NO в образование новых активных форм кислорода, которые способны окислять белки, липиды, разрушать структуру биологических мембран [6]. В основе широкого разнообразия NO-эффектов в клетке лежат изменения редокс-формы молекулы NO, а также дополнительные реакции с металлами, тиолами и остатками тирозина в составе белков. Анализ полученных результатов свидетельствует, что канцерогенез сопровождается увеличением количества активных форм кислорода (АФК), способных в клетке трансформировать эффекты NO из защитных в цитотоксические. Последние могут возникать не только при индукции NOS эндотоксинами, но и при истощении в клетке резерва тиолов, увеличении концентрации АФК, что приводит к уменьшению скорости нитрозилирования белков.

В результате изучения состояния соединительной ткани у больных раком молочной железы нами было установлено повышение активности в сыворотке крови эластазы, колагенолитической активности, что свидетельствует о структурно-метаболических нарушениях в соединительной ткани данных пациентов.

Важно отметить, что более существенные отличия в состоянии соединительной ткани мы наблюдали при разделении пациентов на группы по морфологическому признаку локализации заболевания [12]. По мнению многих авторов, рак не может развиваться в организме, в котором система соединительной ткани сохранила свою реактивность, при этом формирование и рост опухолевого процесса происходит всегда на фоне ее угнетения [6, 7]. Так, исследования показали увеличение в сыворотке крови содержания гликозаминогликанов на 84,1 и 175,2 % при дольковой и потоковой локализации опухолевого процесса соответственно, а также активности эластазы (58,2±1,4) и (74,1±1,5) пг/мл соответственно. Колагенолитическая активность имела схожую тенденцию и была повышена на 48,5 и 73,4 %, соответственно при дольковой и потоковой локализации опухолевого процесса (табл. 2). Наиболее высокие уровни активности показателей соединительной ткани нами отмечались у больных с протоковым раком молочной железы, что может свидетельствовать о более интенсивном развитии онко-процесса, что связано с накоплением значительных концентраций в сыворотке крови гликозаминогликанов.



Таблица 2

Показатели соединительной ткани у больных раком молочной железы в зависимости от локализации

Показатели	Условно-здоровые (n=20)	Дольковый (n=62)	Протоковый (n=55)
Гликозаминогликаны, мкмоль/л	32,6±1,7	48,3±1,5*	56,1±1,4*
Коллагенолитическая активность, мкмоль оксипролина/(л·час)	6,8±0,55	24,7±0,8*	35,5±1,4*
Эластаза, пг/мл	22,1±1,3	58,2±1,4*	74,1±1,5*

Примечание. \* различия достоверные,  $p < 0,05$

В результате нашего исследования было установлено, что рак молочной железы сопровождается глубокими нарушениями обмена соединительной ткани, которые сопряжены с активацией протеиназ и накоплением в сыворотке крови гликозаминогликанов, о чем свидетельствуют полученные нами данные.

**Выводы**

Высокие уровни активности эластазы и коллагенолитической активности сыворотки крови у пациенток с протоковым раком молочной железы, позволяет использовать эти по-

казатели в качестве прогностически значимых в трансформации онкогенеза и мониторинге проводимой патогенетической терапии. Изменение динамики показателей содержания оксида азота и активности NO-синтазной окислительной системы у пациенток в стадии Tis и I, могут служить ранними маркерами диагностики рака молочной железы, что имеет патогенетическое значение.

**Перспективы исследования.** Изучение факторов апоптоза и количества активных форм кислорода у пациентов с раком молочной железы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ковальова О. М. Діагностика ендотеліальної функції — оцінка вазоактивного пулу оксида азота (методичні рекомендації) / О. М. Ковальова, Г. В. Демиденко, Т. В. Горбач. — К. : СПД ФО Тарасенко В. П., 2007. — С. 12–16.
2. Шараев П. Н. Метод определения гликозаминогликанов в биологических жидкостях / П. Н. Шараев, В. Н. Пышков, Н. И. Соловьева [и др.] // Лабораторное дело. — 1987. — № 5. — С. 330–332.
3. Andrade S. P. Inhibitors of nitric oxide synthase selectively reduce flow in tumor-associated neovasculature / S. P. Andrade, I. R. Hart, P. J. Piper // Br. J. Pharmacology — 1992. — Vol. — 107. — P. 1092–1095.
4. Chirco R. Novel functions of TIMPs in cell signaling / R. Chirco, X. W. Liu, K. K. Jung, H. R. Choi Kim // Cancer Met. Rev. — 2006. — Vol. 25. — P. 99–113.
5. Jung K. K. Identification of CD63 as a tissue inhibitor of metalloproteinase-1 interacting cell surface protein / K. K. Jung, X. W. Liu, R. Chirco, R. Fridman, H. R. Kim // J EMBO — 2006. — Vol. 25. — P. 3934–3942.
6. Lackner M. R. Prospects for personalized medicine with inhibitors targeting the RAS and PI3K pathways / M. R. Lackner // Expert Rev Mol Diagn — 2010. — Vol. 10. — P. 75–87.
7. Lambert E. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 signaling pathway leading to erythroid cell survival / E. Lambert, C. Boudot, Z. Kadri [et al.] // Biochem. J. — 2003. — Vol. 32. — P. 767–74.
8. Lis S. FAK expression regulation and therapeutic potential / S. Lis, Z. C. Hua // Adv. Cancer Res. — 2008. — Vol. 101. — P. 45–61.
9. Pérez-Tenorio G. Activation of AKT/PKB in breast cancer predicts a worse outcome among endocrine treated patients / G. Pérez-Tenorio, O. Stål // Br. J. Cancer — 2002. — Vol. 86. — P. 540–548.
10. Steelman L. S. Akt as a therapeutic target in cancer / L. S. Steelman, K. M. Stadelman, W. H. Chappell [et al.] // Expert Opin Ther Targets — 2008. — Vol. 12. — P. 1139–65.
11. Zhou X. Activation of the Akt/mammalian target of rapamycin / 4E-BP1 pathway by ErbB2 overexpression predicts tumor progression in breast cancers / X. Zhou, M. Tan, V. Stone Hawthorne [et al.] // Clin Cancer Res — 2004. — Vol. 10. — P. 6779–88.
12. Zhao J. Signal transduction by focal adhesion kinase in cancer / J. Zhao, J. L. Guan // Cancer Met Rev — 2009. — Vol. — 28. — P. 35–49.
13. Würtz S. O. TIMP-1 as a tumor marker in breast cancer—an update. / S. O. Würtz, A. S. Schroll, H. Mouridsen, N. Brünnner // Acta. Oncology. — 2008. — Vol. 47. — P. 580–590.

ОЦІНКА ЕНДОТЕЛІАЛЬНОЇ  
ДИСФУНКЦІЇ І СТАН  
СПОЛУЧНОЇ ТКАНИНИ  
У ХВОРИХ З РАКОМ  
МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ

*А. Ю. Біла,  
М. В. Красносельський*

**Резюме.** У пацієнток усіх груп з раком молочної залози за результатами вивчення активності NO-сінтазної окисної системи виявило: підвищення вмісту в сироватці крові нітритів, нітратів, S-нітрозотіолів та активності ендотеліальної та індукцйбельної NO-сінтази. Показники NO-сінтазної окисної системи склали: нітрати (37,2 мкмоль/л) для стадії Tis і (107,2 мкмоль/л, 149,3 мкмоль/л) за I, II стадіях розвитку захворювання відповідно. S-нітрозотіоли підвищувалися на 87,3; 147,8 та 215,5 %. Індукцйбельна NOS підвищена на 48,4; 92,5 і 132,9 % відповідно за стадії Tis і I, II стадіях розвитку захворювання. Так, дослідження показали збільшення в сироватці крові вмісту глікозаміногліканів на 84,1 і 175,2 % за долькової та потокової локалізації пухлинного процесу відповідно, а також активності еластази ( $58,2 \pm 1,4$ ) пг / мл і ( $74,1 \pm 1,5$ ) пг/мл відповідно. Колагенолітична активність мала схожу тенденцію і була підвищена на 48,5 і 73,4 %, відповідно при долькової та протокової локалізації пухлинного процесу.

**Ключові слова:** *рак молочної залози, стадія Tis, еластаза, глікозаміноглікани, колагенолітична активність, NO-сінтаза.*

DIAGNOSTIC MARKERS  
OF ENDOTHELIAL  
DYSFUNCTION AND  
CONDITION OF THE  
CONNECTING TISSUE  
IN PATIENTS WITH BREAST  
CANCER

*A. Yu. Bila, N. V. Krasnoselskey*

**Summary.** Over past decades, NO has emerged as a molecule of interest in carcinogenesis and tumor growth progression. However, there is considerable controversy and confusion in understanding its role in cancer biology. It is said to have both tumor as well as tumor promoting effects which depend on its timing, location, and concentration. NO has been suggested to modulate different cancer-related events including angiogenesis, apoptosis, cell cycle, invasion, and metastasis. Indicators of NO synthase oxidizing system were: nitrates (37,2 mmol/l) and for Tis stage (107,2 mmol/l, 149,3 mol/l) at I, II stages of the disease, respectively. S-nitrosothiols rose to 87,3; 147,8, and 215,5 %. Inducible NOS increased by 48,4; 92,5 and 132,9 %, respectively, and at the stage Tis I, II stages of the disease. For example, studies have shown an increase in the serum content of glycosaminoglycans in the 84,1 and 175,2 % for lobular and streaming localization of tumor, respectively, and the elastase activity ( $58,2 \pm 1,4$ ) pg/ml and ( $74,1 \pm 1,5$ ) pg/ml, respectively. Activity had a similar trend, and was increased by 48,5 and 73,4 %, respectively, for lobular and streaming localization of tumor process.

**Key words:** *breast cancer, stage Tis, elastase, glycosaminoglycans, collagenolytic activity, NO-synthase.*