



ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ И ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В ВОССТАНОВИТЕЛЬНОЙ МЕДИЦИНЕ

МОДУЛИРУЮЩАЯ РОЛЬ БИОГЕННЫХ ЭЛЕМЕНТОВ И АМИНОКИСЛОТ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЖЕНЩИН С ДОБРОКАЧЕСТВЕННЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ МОЛОЧНЫХ ЖЕЛЁЗ

УДК 616-07

^{1,2} **Тарханов А.А.:** врач-онколог, аспирант;

^{1,2} **Дорофеев А.В.:** врач-онколог, д.м.н.;

^{3,4} **Ковальчук Л.А.:** ведущий научный сотрудник, д.б.н.

¹ГОУ ВПО «Уральская государственная медицинская академия Росздрава»;

²ГУЗ «Свердловский областной онкологический диспансер», г. Свердловск, Россия;

³Институт экологии РИЖ УрО РАН;

⁴Лаборатория проблем адаптации СУНЦ РАМН и ПСО, г. Екатеринбург, Россия

Введение. Актуальнейшей проблемой клинической маммологии и хирургии является диагностика и лечение больных с заболеваниями молочных желёз, что связано с высокими темпами нарастания распространённости данного заболевания (различными формами мастопатии страдают от 20 до 60% женщин) [1]. Внимание онкологов к мастопатии определяется и тем, что она зачастую является фоном для последующего возникновения рака молочной железы (РМЖ). Так риск развития РМЖ у женщин с мастопатией в 3-5 раз выше, чем в общей популяции.

По данным Всемирной Организации Здравоохранения в 2002 году в мире диагностировано 1 млн.150 тыс. новых случаев рака молочной железы (23% от всех опухолей), причём 55% больных с РМЖ регистрируется в развитых странах, а 45% - в развивающихся. В России I и II стадии РМЖ диагностируются в 61,4%. Рак молочной железы – главная причина онкологической смертности у женщин.

Пятилетняя выживаемость от РМЖ в развитых странах – 75%, а в развивающихся – 57%. Соотношение умерших к заболевшим неблагоприятно для нашей страны. Оно в 2 раза больше, чем в США. Смертность от РМЖ в нашей стране увеличилась на 13% за 8 лет, в США уменьшилась на 23%, а в Англии снизилась – на 20%. До 20 лет женщины заболевают РМЖ очень редко, до 30 лет – редко, затем до менопаузы каждое десятилетие частота удваивается. 2/3 случаев рака молочной железы проявляется в период постменопаузы. Всего в России среди заболевших менструирующие составляют 35%, остальное приходится на пациенток в менопаузе. В США ежегодно диагностируются 56000 больных с предраком молочной железы, в России такой статистики нет [2].

Известно, что функционирование молочной железы регулируется множеством эндокринных и метаболических процессов, что предполагает возможность использовать в лечении не только цитостатики, но и более физиологичные лекарственные препараты [3, 4]. На фоне многочисленных морфологических изменений, свидетельствующих об инициации роста, опухолевый рост тканей сопровождается развитием целого ряда нарушений в метаболических процессах, в регуляции активности которых значительная роль принадлежит

аминокислотам (АК) и их производным, определяющим интеграцию основных метаболических потоков в организме [5]. Аминокислоты, обладающие разносторонней биологической активностью и входящие в состав цитокинов и пептидов в качестве структурных элементов, осуществляют регуляцию репаративных процессов в тканях организма за счёт стимуляции клеточной пролиферации или её торможения при апоптозе [6].

Вместе с тем и проблема специфичности микроэлементного (МЭ) обмена тканей опухолей представляет определённый интерес, поскольку биогенные элементы участвуют в процессах пролиферации, апоптоза клеток, формирования структуры белков и нуклеиновых кислот, в процессах тканевого дыхания, кроветворения, иммунных реакциях, присутствуют в активных центрах ферментов гормонов. Микроэлементы выступают в роли катализаторов или ингибиторов биохимических процессов, присутствуя в организме как в ионной форме, так и в виде комплексных соединений с биополимерами.

Успехи в лечении доброкачественных и злокачественных новообразований связаны с одной стороны с более ранним выявлением заболевания, а с другой - с комплексным подходом к лечению и поиском его новых эффективных методов. Восстановительное лечение больных, получивших радикальную терапию доброкачественных и злокачественных новообразований, представляет достаточно трудную задачу, о чем свидетельствует множество предложенных как оперативных, так и консервативных методов. Сегодня востребован поиск принципиально новых подходов, так как экстенсивное наращивание мощности молекулярно-эпидемиологических исследований в последние годы не принесло ожидаемых результатов. Поиск специфических, активных веществ, направленных как на активацию или инактивацию ключевых биохимических компонентов опухолевой трансформации, так и на поддержание метаболического гомеостаза организма, в том числе и эффекторов врождённого противоопухолевого иммунитета, обращает наше внимание к исследованию аминокислот и микроэлементов и их противоопухолевых свойств.

Исследование биогенных элементов и аминокислотного фонда сыворотки крови женщин может способ-

ствовать пониманию механизмов патогенеза доброкачественных заболеваний молочной железы, что может быть использовано в терапии и реабилитации данных больных.

Материалы и методы. В основу работы положены клинические наблюдения за больными и соматически здоровыми женщинами. Возрастной диапазон пациентов - от 23 до 41 года. Для проведения исследований были сформированы две группы. В контрольную группу (n=12) включены соматически здоровые пациентки, не обращавшиеся в лечебные учреждения в течение последнего года, не имеющие онкологической патологии в анамнезе. Вторую группу (n=11) составили женщины с доброкачественным заболеванием молочных желёз, классифицируемым согласно гистологической классификации доброкачественных опухолей (ВОЗ,1984) как фиброаденома молочной железы (ФАМ). При пальпации определяется плотный узел с чёткими границами, подвижный, безболезненный, без кожных симптомов. Рентгенологическая и ультразвуковая диагностика во всех случаях позволяют подтвердить диагноз. Тактика лечения – секторальная резекция со срочными гистологическими исследованиями. Все диагнозы подтверждены гистологически.

Всем женщинам проведено полное исследование сыворотки крови на свободные аминокислоты. Забор крови и ее анализ проводился по стандартной методике. Аминокислотный спектр крови определяли методом ионообменной хроматографии на автоматическом анализаторе ("AAA – 339M", Чехия). Кровь центрифугировали 15 минут в рефрижераторной ультрацентрифуге "K-23D" при 8000 об/мин. Вторичное центрифугирование супернатанта проводили с осаждением белков 30 минут при 15000 об/мин. Для каждого исследуемого образца на хроматограмме прописывался весь спектр свободных аминокислот и определялась концентрация каждой из них в мкмоль/л.

Пробоподготовку образцов для определения микроэлементов проводили в соответствии с требованиями и методическими рекомендациями, утверждёнными МЗ РФ в 1999 году. Содержание МЭ в сыворотке крови пациенток исследовали методом атомно-абсорбционной спектроскопии на спектрофотометре ("AAS-3", Германия) и на приборе «Analyst 100» (фирмы Perkin Elmer, США) [7, 8]. Концентрацию МЭ в сыворотке крови определяли в мкг/мл.

В качестве интегрального показателя метаболического гомеостаза как в физиологических условиях, так и при различных нарушениях, отражающих определённые патологические состояния, использовали метод определения уровня молекул средней массы (МСМ) в крови [9]. МСМ – маркер эндогенной интоксикации, распространённого неспецифического синдрома. Степень эндотоксикоза оценивали биохимическим методом Н.И.Габриэлян [10]. Уровень эндогенной интоксикации исследовали путём определения МСМ при длине волны 280 нм на спектрофотометре ("Specord M-40" фирмы Carl Zeiss, Jena).

Математическая обработка полученных результатов проведена с использованием прикладных программ MS Excel 2003 и Statistica (версия 6.0). При оценке однородности групп и достоверности различий средних между группами использовали параметрический t-критерий Стьюдента и непараметрический U-тест Манна-Уитни. Взаимозависимость между рядами оценивали с помощью рангового анализа сопряжённости по Спирмену. Различия между сравниваемыми выборками считали достоверными при $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$, $p < 0,0001$.

Результаты и обсуждение. Анализ МЭ в сыворотке крови у женщин с фиброаденомой молочной желе-

зы показал повышенное содержание эссенциальных Zn ($p=0,035$), Ca ($p=0,014$), Fe ($p=0,013$), Mn ($p=0,015$) по сравнению со здоровыми. У больных женщин (ФАМ) средний уровень цинка возрастает до $7,20 \pm 1,08$ мкг/мл при тенденции к снижению поступления в кровь меди - $0,96 \pm 0,16$ мкг/мл ($p=0,035$) Взаимодействие обоих элементов имеет клиническое значение.

Поступление цинка в кровь возросло на 72%, железа – на 66%, кальция – на 53% и марганца – на 140%. Отмечено повышенное содержание ксенобиотиков в сыворотке крови у здоровых женщин и их нарастающее содержание у больных ФАМ: кадмия ($0,01 \pm 0,003$ и $0,02 \pm 0,002$ мкг/мл) и свинца ($0,1 \pm 0,012$ и $0,17 \pm 0,046$ мкг/мл)

Исследования показали, что развитие ФАМ сопровождается нарушениями обмена цинка, железа, кальция, марганца, меди, магния, кадмия, свинца, что свидетельствует о возможной роли дисбаланса этих микроэлементов в развитии патогенеза мастопатии ($p < 0,05$).

У практически здоровых женщин уровень молекул средней массы (МСМ) в сыворотке крови не превышал $0,245 \pm 0,01$ ед.опт.пл. А с увеличением стадии опухолевого процесса у всех обследованных больных ФАМ наблюдается активация протеолиза: содержание МСМ ($0,302 \pm 0,005$ ед.опт.пл.) статистически достоверно повышено ($p < 0,05$), что свидетельствует о выраженных метаболических нарушениях у данного контингента больных. Исследования МСМ в крови женщин ФАМ показали нарастающий уровень эндогенной интоксикации, вызванной интенсивный процессом деградации белковых молекул, а также физиологически активных соединений.

Аминокислотный спектр сыворотки крови у всех женщин обладает постоянством и представлен 25 свободными аминокислотами. Установлено, что изменения по суммарному содержанию аминокислот в сыворотке крови между группой соматически здоровых ($2222,1 \pm 59,636$ мкмоль/л) и группой женщин с доброкачественными новообразованиями молочных желёз ($2178,72 \pm 136,026$ мкмоль/л) были незначительными и статистически недостоверными ($p > 0,05$). Однако, в группе женщин с доброкачественными новообразованиями наблюдали снижение суммарной концентрации незаменимых АК на 14%. Это, вероятно обусловлено развитием белкового дефицита алиментарного генеза, на который указывает снижение соотношения незаменимых АК к заменимым (Кнез/зам = 0,4) (табл.1.). Развитие гипоаминоацидемии связано и с активным участием АК в ликвидации энергодефицита и избирательным использованием их на пластические нужды [5, 11].

Таблица 1. Фонд незаменимых аминокислот в сыворотке крови

АК (мкм/л)	Здоровые женщины	Женщины с ФАМ
THR	141,88 ± 6,350	179,71 ± 16,846
VAL	198,66 ± 29,294	108,71 ± 10,928*
MET	16,73 ± 2,256	14,09 ± 1,229
ILE	36,22 ± 6,575	29,95 ± 3,307
LEU	82,07 ± 4,398	65,54 ± 6,287
PHE	41,15 ± 5,244	32,82 ± 3,126
TRP	20,61 ± 2,567	16,58 ± 2,507
LYS	87,63 ± 6,799	79,99 ± 4,286
HIS	41,82 ± 2,617	50,43 ± 3,280*
ARG	22,55 ± 2,990	15,07 ± 1,413
Фонд свободных АК	2222,11 ± 59,636	2178,72 ± 136,026
Кнез/зам	0,5	0,4

Примечание: * - показатели достоверно отличаются от контроля при $p < 0,05$.

Таблица 2. Корреляционные связи между спектром МЭ и АК у женщин с ФАМ
(Ранговый анализ сопряженности по Спирмену)

Корреляционные пары	R (Spearman)	p-level
Zn Isoleucine	0,900000	0,037
Fe Serine	0,900000	0,037
Mg Alanine	0,900000	0,037
Fe Phenylalanine	0,900000	0,037
Fe Tryptophan	0,900000	0,037
Mn Ornithine	0,900000	0,037
Mn Histidine	0,900000	0,037
Mg Arginine	0,900000	0,037
Cd Lysine	0,894427	0,041
Cd Tyrosine	-0,894427	0,041
Cu Glycine	-0,900000	0,037
Zn Serine	-0,900000	0,037
Fe Proline	-0,900000	0,037
Fe Cysteine	-0,900000	0,037
Fe Leucine	-0,900000	0,037
Co Phenilalanine	-0,900000	0,037
Co Tryptophan	-0,900000	0,037
Zn Asparagine	-0,974679	0,005

Таблица 2. Корреляционные связи между спектром МЭ и АК у женщин с ФАМ
(Ранговый анализ сопряженности по Спирмену)

Корреляционные пары	R (Spearman)	p-level
Zn Isoleucine	0,900000	0,037
Fe Serine	0,900000	0,037
Mg Alanine	0,900000	0,037
Fe Phenylalanine	0,900000	0,037
Fe Tryptophan	0,900000	0,037
Mn Ornithine	0,900000	0,037
Mn Histidine	0,900000	0,037
Mg Arginine	0,900000	0,037
Cd Lysine	0,894427	0,041
Cd Tyrosine	-0,894427	0,041
Cu Glycine	-0,900000	0,037
Zn Serine	-0,900000	0,037
Fe Proline	-0,900000	0,037
Fe Cysteine	-0,900000	0,037

У женщин с ФАМ наблюдали достоверное падение уровня незаменимых АК на фоне возрастания высокомолекулярных аминокислот: глутаминовой – в 5,1 раза ($p=0,0000$), и аспарагиновой – на 29,8% ($p=0,035$).

Блокирование катаболизма АК в опухолях обуславливает их накопление и последующее включение на синтез ферментов, необходимых для поддержания высокой интенсивности роста и деления опухоли [5]. Следует отметить обеднение пула серусодержащих АК и значительное снижение концентрации таурина (в 2,2 раза), участвующего в подавлении возросших перекисных процессов, ($p=0,034$), валина на 45,3%, аминокислоты необходимой для восстановления повреждённых тканей и поддержания азотистого обмена ($p=0,004$), (табл.1.) Содержание пролина – заменимой АК возросло на 42,5% ($p=0,001$), глицина – на 17% ($p=0,05$).

Исследования показали достоверное повышение концентрации аминокислот, повышающих энергообеспечение, стимулирующих иммунную систему и участвующих в синтезе белков: гистидина на 21% ($p=0,05$), цитрулина на 198% ($p=0,019$). Развитие опухолевого процесса сопровождается прогрессирующим аминокислотным дисбалансом. Уровни аминокислот сыворотки крови коррелируют с содержанием исследованных биогенных элементов (табл. 2.). Ранговый корреляционный анализ выявил в плазме крови женщин с мастопатией статистически достоверную сильную положительную связь между содержаниями цинка и изолейцина ($R = 0,900$; $p=0,037$) и сильные отрицательные связи между уровнями цинка и аспарагина ($R = - 0,975$; $p=0,005$), цинка и серина ($R = - 0,900$; $p=0,037$), что, несомненно, свидетельствует о значимой сопряженности цинка с этими аминокислотами.

Установлено, что содержание Fe находится в прямой корреляционной зависимости с содержаниями серина, фенилаланина и триптофана ($R = 0,900$; $p=0,037$). В то же время уровень содержания Fe в сыворотке крови не лимитирован метаболизмом заменимых АК – пролина и цистеина, что подтверждает отрицательная корреляция между ними ($R = - 0,900$; $p=0,037$). Положительные корреляционные связи отмечены для Mn и орнитина, Mn и гистидина ($R = 0,900$; $p=0,037$) Mg и аргинина, Mg и аланина ($R = 0,900$; $p=0,037$).

У больных с ФАМ имеют место нарушения гомеостаза в виде дефицита фонда незаменимых аминокислот, дисбаланса биогенных элементов, повышения уровня эндотоксинов в крови.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Давыдов М.И., Летягин В.П. Семинар по клинической маммологии – М.: АБВ-пресс - 2006. – 104 с.
2. Гарин А.М., Базин И.С. Десять наиболее распространённых злокачественных опухолей – М.: - 2006 - 99 с.
3. Семиглазов В.Ф., Семиглазов В.В., Дашян Г.А. Гормонотерапия рака молочной железы. (руководство). – М.: ООО «Инсайт полиграфик» - 2009 - 69 с.
4. Моисеенко В.М., Семиглазов В.Ф., Тюляндин С.А. Современное лекарственное лечение местно-распространённого и метастатического рака молочной железы. СПб.: Грифон - 1997.
5. Нефёдов Л.И. Формирование фонда свободных аминокислот и их производных в условиях метаболического дисбаланса. Автореф. дис. ... докт. мед. наук – Минск. – 1993.
6. Чалисова Н.И., Пенниайнен В.А., Ноздрачёв А.Д. Регулирующее действие аминокислот в органотипической культуре лимфоидных тканей с различной степенью иммунологической зрелости. // Доклады АН – 2003. - Т.389. №5. – С.714 – 717.
7. Майстренко В.Н., Хамитов Р.З., Будников Г.К. Эколого-аналитический мониторинг супертоксикантов. – М.: Химия - 1996. – 319 с.
8. Оберлис Д., Харланд Б., Скальный А. Биологическая роль макро- и микроэлементов у человека и животных. – СПб.: Наука - 2008. – 543с.
9. Иванова В.Н. Оценка эффективности лечения и прогнозирования течения синдрома эндогенной интоксикации у хирургически больных с гнойно-септическими осложнениями: Автореф. дис. канд. мед. наук. – Ставрополь, 2001.
10. Габриэлян Н.И., Дмитриев А.А., Кулаков Г.П., Мекирян А.М., Щербанёва О.И. Диагностическая ценность определения средних молекул в плазме крови при нефрологических заболеваниях // Клиническая медицина - 1981. – Т. LIX - №10. – С.38-42.
11. Тарханова А.Э. Ковальчук Л.А. Состояние аминокислотного обмена у беременных женщин и их новорожденных // Росс. физиолог. журнал. им. И. М. Сеченова – 2004 - №90 (8). - С. 454 – 455.

Резюме. Диагностика и лечение больных с заболеваниями молочных желёз в настоящее время являются актуальнейшей проблемой клинической маммологии и хирургии. Различными формами мастопатии страдают от 20 до 60% женщин. Интерес онкологов к мастопатии связан с тем, что она является фоном для последующего возникновения рака молочной железы.

Проведено скрининговое исследование содержания биогенных элементов и аминокислот в плазме крови женщин соматически здоровых и страдающих доброкачественным заболеванием молочной железы. Все диагнозы подтверждены гистологически. Оценка содержания МЭ в сыворотке крови у женщин с фибroadеномой молочной железы показала достоверное увеличение уровней цинка и кальция, железа и марганца, что свидетельствует о возможной роли этих эссенциальных микроэлементов в развитии мастопатии. Обнаруженные у больных женщин изменения концентраций МЭ в сыворотке крови и их взаимосвязи с содержанием АК указывают на их прямое или косвенное участие в развитии фибroadеномы молочной железы и служат основанием для дальнейших исследований с целью использования отдельных МЭ и АК в патогенетической терапии.

Ключевые слова: биогенные элемент, аминокислоты, доброкачественные заболевания молочной железы.

Abstract. Diagnostics and treating lactic gland diseases is presently an urgent problem. Mammary gland benign tumor is a widespread disease. 20 to 60% women have various forms of mastopathy. Mastopathy is the background for the possible development of mammary gland cancer. We estimated the contents of macro- and microelements and amino acids in the blood serum of somatically healthy women and cases of various mastopathy forms. All diagnoses were histologically supported. In cases of mammary gland phybroadenoma the levels of Zn and Ca, Fe and Mn were significantly higher in the blood serum – an evidence of a possible role of these essential microelements in the mastopathy development ($p < 0,05$).

The results obtained conclude of a relationship between biogenic elements and a number of amino acids in the blood of ill women. Estimation of correlations between the contents of amino acids and biogenic elements in the blood serum of patients with benign tumors of mammary gland may be used in diagnostics and prognosis.

Key words: biogenic elements, amino acids, benign tumo.

КОНТАКТЫ

Тарханов Андрей Андреевич. E-mail: andrey.tarkhanov@gmail.com
Ковальчук Людмила Ахметовна. E-mail: kovalchuk@ipae.uran.ru