

ПОВРЕЖДЕНИЕ ДНК И ПОКАЗАТЕЛИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТАТУСА В КРОВИ БОЛЬНЫХ РАКОМ ШЕЙКИ МАТКИ С НАЛИЧИЕМ И ОТСУТСТВИЕМ ХЛАМИДИЙНОЙ ИНФЕКЦИИ

Гуськова Н.К., Горошинская И.А., Сурикова Е.И., Тарнопольская О.В.,
Меньшенина А.П., Немашкалова Л.А., Чудилова А.В.

ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, Ростов-на-Дону, e-mail: iagor17@mail.ru

Изучены степень поврежденности ДНК, интенсивность ПОЛ, активность основных компонентов ферментативного звена антиоксидантной системы в клетках крови у больных раком шейки матки (РШМ) с сопутствующей инфекцией *Chlamydia trachomatis* (*Ch. tr.*) и у неинфицированных женщин, как больных РШМ, так и без онкологической патологии. Исследование повреждения ДНК проведено методом ДНК-комет, содержания малонового диальдегида и активности ферментов антиоксидантной системы – спектрофотометрическими методами. Впервые показано повреждение ДНК изолированных эритроцитов крови у больных РШМ. Наличие хламидийной инфекции способствует более чем двукратному увеличению степени повреждения ДНК, связанному с индуцируемой *Ch. tr.* интенсификацией окислительных процессов, что, по-видимому, обусловлено нарушением согласованности в работе основных антиоксидантных ферментов. Полученные данные подтверждают роль *Ch. tr.* в повреждении ДНК клеток крови, способствующем развитию злокачественного поражения органов женской половой системы.

Ключевые слова: рак шейки матки, *Chlamydia trachomatis*, повреждение ДНК, метод ДНК-комет, перекисное окисление липидов, антиоксидантные ферменты.

DNA DAMAGE AND INDICATORS OF OXIDATIVE STATUS IN BLOOD OF PATIENTS WITH CERVICAL CANCER WITH AND WITHOUT CHLAMYDIAL INFECTION

Guskova N.K., Goroshinskaya I.A., Surikova E.I., Tarnopolskaya O.V.,
Menshenina A.P., Nemashkalova L.A., Chudilova A.V.

Rostov Scientific Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, e-mail: iagor17@mail.ru

The degree of DNA damage, the intensity of lipid peroxidation and the activity of the main antioxidant enzymes were studied in blood cells of patients with cervical cancer and concomitant infection of chlamydia and in HIV-negative women, both with and without cancer. The study of DNA damage was carried out by Comet Assay, the content of malondialdehyde and activity of antioxidant enzymes were determined by spectrophotometric methods. DNA damage of isolated red blood cells was first shown for patients with cervical cancer. The presence of chlamydial infection contributes to a more than twofold increase in the degree of DNA damage. This is associated apparently with induced by *Chlamydia trachomatis* intensification of oxidative processes that may be due to a violation of consistency in the work of the major antioxidant enzymes. The findings support the role of chlamydia in the DNA damage in blood cells, which contributes to the development of malignancy of the female reproductive system.

Keywords: cervical cancer, *Chlamydia trachomatis*, DNA damage, Comet Assay, lipid peroxidation, antioxidant enzymes.

Исследования последнего десятилетия продемонстрировали роль вируса папилломы человека (ВПЧ) в развитии рака шейки матки (РШМ). Однако высокая инфицированность женщин ВПЧ и сравнительно редкие случаи возникновения РШМ среди инфицированных лиц указывают на то, что ВПЧ не является единственным фактором, необходимым для возникновения рака. В то же время данные литературы свидетельствуют, что в отсутствие ВПЧ-инфекции развитие РШМ ассоциируется с инфицированием хламидиями. Полагают, что связь хламидий со злокачественным ростом может быть обусловлена двумя

механизмами: индукцией хронического дефекта антигена и продукцией канцерогенных метаболитов.

Роль *Chlamydia trachomatis* (*Ch. tr.*) как фактора риска развития цервикальной неоплазии широко обсуждается. Однако молекулярные механизмы, с помощью которых *Ch. tr.* может внести свой вклад в канцерогенез, до конца не установлены. Известно, что *Ch. tr.* инициирует активацию компонентов онкоген проводящих путей Ras-Raf-MEK-ERK и производство активных форм кислорода для поддержания своего развития [7].

Ранее нами в экспериментальных исследованиях было показано, что инфицирование штаммом E *Chlamydia trachomatis* крыс с перевивной саркомой-45 способствует еще большему усилению интенсивности хемилюминесценции, повышенный уровень которой наблюдался и при опухолевом росте у неинфицированных животных [3].

Одним из методов, позволяющих оценить повреждение ДНК, является гель-электрофорез изолированных клеток – метод ДНК-комет (CometAssay). С использованием этого метода показана в частности роль вируса папилломы человека в вирус-индуцированном мутагенезе, приводящем к клеточной трансформации [9], а также генотоксичность *Helicobacter pylori*, инфицирование которым увеличивает риск развития рака желудка [1].

Целью данной работы явилась сравнительная оценка уровня поврежденности ДНК, интенсивности перекисного окисления липидов, активности ферментативного звена антиоксидантной системы в клетках крови у больных раком шейки матки с сопутствующей хламидийной инфекцией и у неинфицированных женщин, как больных РШМ, так и без онкопатологии.

Материалы и методы

Уровень окислительного повреждения ДНК в лейкоцитах крови оценивали методом ДНК-комет в щелочной версии. Метод основан на регистрации различной подвижности поврежденной ДНК лизированных клеток, заключенных в агарозный гель, под действием постоянного электрического поля. При этом ДНК мигрирует к аноду, формируя электрофоретический след, напоминающий хвост кометы, параметры которого позволяют оценить степень поврежденности исследуемой ДНК. Использовали цельную кровь в соотношении 1:20 с 1% легкоплавкой агарозой, условия электрофореза – 4 °С, 20 мин., 300мА, 20В. Полученные препараты фиксировали в 70 ° этаноле и окрашивали в растворе этидиум бромид (2 мкг/мл). Микроскопирование окрашенных препаратов производили на люминесцентном микроскопе AxioImagerM2, Zeiss при длине волны возбуждения 520 нм, волны эмиссии – 640 нм. В каждой пробе измеряли не менее 200 комет. Уровень повреждения ДНК выражали как процент ДНК хвоста кометы (%TDNA), который

рассчитывали по формуле, учитывающей соотношение пяти визуальных типов комет и их общего количества в пробе [6].

О накоплении молекулярных продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) судили по уровню наиболее стабильного соединения – малонового диальдегида (МДА), определяемом общепринятым спектрофотометрическим способом. Состояние антиоксидантной системы оценивали по активности ферментов первой линии антиоксидантной защиты – супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы, содержанию восстановленного глутатиона, активности глутатионзависимых ферментов (глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза и глутатионтрансфераза), которые определяли общепринятыми спектрофотометрическими методами [2].

Перечисленные показатели были определены у 19 больных РШМ St., из которых инфицирование *Chlamydia trachomatis* было выявлено у 7 пациенток. Инфицированность хламидиями подтверждалась обнаружением IgG и IgA к Ch. tr. или антигена/ДНК Ch. tr. с использованием стандартных методов ИФА и ПЦР. В качестве группы сравнения использованы результаты исследования уровня повреждения ДНК у 13 женщин без онкопатологии (доноры), для остальных показателей группу доноров составили 30 женщин, сопоставимых по возрасту с обследованными больными.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакета статистических программ “Statistica 6.0”. Для оценки значимости различий использовали непараметрический U-критерий Манна – Уитни и параметрический t-критерий Стьюдента. Наблюдаемые различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$ – $p = 0,000000$.

Результаты исследования и их обсуждение

Как видно из таблицы 1, уровень повреждения ДНК, определенный с помощью метода ДНК-комет, в лейкоцитах крови 19 больных РШМ был значительно выше, чем у женщин без онкологической патологии. При этом у 12 больных РШМ без инфекционного компонента среднее значение T%DNA превышало данный показатель в лейкоцитах здоровых женщин на 53,7 %. Значительно более высокий уровень %TDNA был зафиксирован у всех больных РШМ, инфицированных *Ch. tr.* У пациенток данной группы среднее значение %TDNA с максимальным уровнем статистической значимости превосходило величину показателя у больных РШМ, неинфицированных хламидиями, в 2,4 раза и было в 3,7 раза выше, чем у здоровых женщин.

Таблица 1

Уровень поврежденности ДНК лейкоцитов крови, содержание малонового диальдегида, активность супероксиддисмутазы и каталазы в эритроцитах крови больных РШМ, неинфицированных и инфицированных *Chlamydia trachomatis*

Группы	%ДНК хвоста	МДА нМ/мл 1% гемолизата	СОД у.е./мг Hb	Каталаза мкМН ₂ O ₂ /мин.×мгHb	Коэффициент СОД/каталаза
Доноры (n=30)	2,83±0,20 (n=13)	1,495±0,08	500,8±16,4	135,5±4,12	3,75±0,12
Больные РШМ (n=12)	4,35±0,43 P=0,003373	1,07±0,048 P=0,000637	366,6±9,26 P=0,000012	129,9±3,91	2,842±0,092 P=0,000048
Больные РШМ, инфицированные Ch.tr. (n=7)	10,44±0,25 P=0,000000 P ₁ =0,000000	1,572±0,087 P ₁ =0,000038	481,5±25,2 P ₁ =0,000086	107,0±5,31 P=0,003093 P ₁ =0,002737	4,539±0,245 P=0,006857 P ₁ =0,000001

Примечание. Здесь и в таблице 2: p – уровень статистической значимости различий относительно группы доноров, p₁ – уровень статистической значимости различий между больными РШМ, инфицированными и неинфицированными хламидиями. Приведены значения p только для статистически значимых различий.

По данным литературы, изменения, наблюдаемые при инфицировании хламидиями, нередко связывают с усилением свободнорадикальных окислительных процессов и снижением антиоксидантного потенциала в организме хозяина. В этой связи мы посчитали необходимым у тех же больных, у которых проведено изучение состояния ДНК, исследовать в клетках крови ряд показателей, характеризующих интенсивность ПОЛ и активность основных ферментативных компонентов антиоксидантной системы.

Согласно полученным данным у обследованных нами больных РШМ, неинфицированных хламидиями, уровень МДА и активность СОД были статистически значимо (p<0,001–0,0001) снижены относительно уровня у женщин без онкопатологии на 28,4 % и 26,8 % соответственно. При этом активность каталазы, фермента, сопряженного с СОД, значимо не изменялась, что привело к нарушению согласованной работы этих ферментов первой линии антиоксидантной защиты. Коэффициент СОД/каталаза был значимо ниже, чем в группе доноров, на 24,2 % (таблица 1).

У больных РШМ, инфицированных хламидиями, интенсивность ПОЛ в эритроцитах была более выражена, чем в группе больных без инфекции, о чем свидетельствовало увеличение содержания МДА на 46,9 %. Это сопровождалось увеличением активности СОД на 31,3 %. Однако происходящее у этих больных снижение активности каталазы (на 17,6 % относительно неинфицированных больных РШМ и на 21 % относительно доноров, p<0,01), привело к противоположно направленным, еще более выраженным нарушениям скоординированной работы системы СОД – каталаза. На это указывает увеличение коэффициента СОД/каталаза на 59,7 % относительно группы неинфицированных Ch. tr. больных РШМ (на 21 % выше среднего значения в группе доноров).

При исследовании показателей, отражающих функционирование глутатионовой системы, у всех обследованных больных РШМ было установлено снижение в эритроцитах активности глутатионредуктазы, участвующей в биорегенерации окисленного глутатиона, при отсутствии статистически значимых изменений содержания восстановленного глутатиона (таблица 2). При этом степень снижения активности глутатионредуктазы у инфицированных хламидиями больных РШМ была значимо ниже, чем у неинфицированных больных: соответственно 17,1 % и 46,6 % относительно активности фермента у здоровых женщин. Только в группе неинфицированных больных наблюдалось снижение активности глутатион-S-трансферазы – на 19,9 % относительно доноров. Основным отличием инфицированных *Ch. tr.* больных РШМ было увеличение активности глутатиопероксидазы (ГПО) – на 63,1 % относительно группы неинфицированных пациентов и на 46,5 % относительно здоровых женщин. Двукратное снижение величины коэффициентов СОД/ГПО и каталаза/ГПО указывает на возрастание роли ГПО в деградации перекиси водорода у инфицированных хламидиями больных.

Таблица 2

Содержание восстановленного глутатиона и активность глутатионзависимых ферментов в крови больных РШМ

Группы	Глутатион мкМ/мг Нб	ГПО МЕ/мг Нб	ГР МЕ/мг Нб	ГТ МЕ/мг Нб	СОД/ГПО	Каталаза/ ГПО
Доноры (n=30)	31,49±1,1	251,2±22,6	7,70±0,29	62,0±1,81	2,502±0,233	0,635±0,049
Больные РШМ (n=12)	32,59±0,95	225,6±13,0	4,11±0,15 P=0,000000	49,69±1,47 P=0,000181	1,682±0,102 P=0,021008	0,601±0,044
Больные РШМ,инфи- цированные <i>Ch.tr.</i> (n=7)	35,31±3,68	368,0±4,7 P=0,010212 P ₁ =0,000000	6,38±0,43 P=0,038219 P ₁ =0,000014	64,91±2,26 P ₁ =0,000017	1,305±0,052 P=0,010376 P ₁ =0,015458	0,291±0,013 P=0,000766 P ₁ =0,000067

Таким образом, согласно полученным результатам, у больных РШМ имеет место повреждение ДНК клеток крови, впервые показанное нами методом ДНК-комет. Данные литературы также свидетельствуют об увеличении повреждения лейкоцитарной ДНК, оцениваемом по % ДНК хвоста, при ряде других локализаций злокачественного роста [5].

Наличие хламидийной инфекции способствует более чем двукратному увеличению степени повреждения ДНК у онкогинекологических больных. Представленные результаты согласуются с данными, полученными ранее при исследованиях, проведенных на культурах клеток, согласно которым инфицирование хламидиями вызывает модификацию гистонов и двунитевые разрывы ДНК [8].

Высказано предположение, что повреждение ДНК может быть вызвано индуцируемым *Ch. tr.* снижением антиоксидантного потенциала, приводящим к образованию свободных

радикалов [10]. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что ингибирование ключевого антиоксидантного фермента – супероксиддисмутазы характерно для большинства больных РШМ. А наличие хламидийной инфекции у больных РШМ приводит к выраженному дисбалансу в работе ключевых антиоксидантных ферментов. В данной группе больных наблюдается статистически значимое ($p < 0,01$) снижение активности каталазы в эритроцитах крови, что на фоне повышенной относительно значений у больных РШМ, не инфицированных *Ch. tr.*, активности СОД может способствовать интенсификации свободнорадикальных процессов. Об этом, в частности, свидетельствует полуторное повышение у инфицированных больных эритроцитарного уровня МДА – основного молекулярного продукта ПОЛ (таблица 1), а также показанное нами ранее повышение интенсивности перекись-индуцированной хемилюминесценции, отражающее активацию начальных звеньев свободно-радикальных процессов, при экспериментальном канцерогенезе, сочетанном с хламидийной инфекцией [3]. Увеличение активности СОД у инфицированных хламидиями больных РШМ, возможно, является ответной реакцией на усиление ПОЛ. При этом в условиях снижения активности каталазы, приводящего к накоплению перекиси водорода, СОД может взаимодействовать с H_2O_2 и выступать в качестве прооксиданта, инициируя образование супероксидного анион-радикала и гидроксильного радикала. Кроме того, высокая активность СОД при сниженной активности каталазы способствует усилению цитотоксического действия H_2O_2 [4].

Выявленный в данной работе повышенный уровень СОД у больных РШМ, инфицированных *Ch. tr.*, относительно неинфицированных женщин с РШМ (на 31,3 %, $p < 0,0001$) согласуется с нашими экспериментальными данными, согласно которым у животных с развитием воспалительного процесса хламидийной природы, предшествовавшего опухолевому росту, наблюдалось более выраженное увеличение активности СОД на ранних сроках развития опухолевого процесса [3].

Обращает на себя внимание, что у больных РШМ, инфицированных хламидиями, антиоксидантная система «ГПО-глутатион-глутатиоредуктаза», играющая ключевую роль в защите эритроцитов, находится функционально в более активном состоянии по сравнению с неинфицированными больными, что позволяет предполагать определенные различия в течение злокачественного процесса у инфицированных и неинфицированных хламидиями больных.

Заключение

Анализ результатов позволяет прийти к заключению о том, что выявленное повреждение ДНК при инфицировании *Ch. tr.* может быть связано с интенсификацией окислительных процессов, обусловленной нарушением согласованности в работе основных

антиоксидантных ферментов. Данные, полученные нами при исследовании клеток крови больных РШМ, являются подтверждением роли хламидийной инфекции в повреждении ДНК, способствующем развитию злокачественного поражения органов женской половой системы.

Список литературы

1. Аникеенок М.О., Ильинская О.Н. Обнаружение генотоксичности *HelicobacterPylori* ДРАI методом ДНК-комет // Цитология. – 2008. – Т. 50, № 11. – С. 1005-1008.
2. Арутюнян А.В., Дубинина Е.Е., Зыбина Н.Н. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма: методические рекомендации. – СПб.: ИКФ «Фолиант», 2000. – 104 с.
3. Гуськова Н.К., Горошинская И.А., Ровда Т.А. Интенсивность хемилюминесценции и активность антиоксидантной системы в динамике экспериментального канцерогенеза, сочетанного с хламидийной инфекцией // Биомедицинская химия. – 2004. – Т. 50, вып.3. – С. 277-283.
4. Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К., Бондарь И.А., Круговых Н.Ф., Труфакин В.А. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты. – М.: Фирма «Слово», 2006. – 553 с.
5. Сирота Н.П., Кузнецова Е.А., Гуляева Н.А., Попкова М.А., Захарова И.Г., Кочменева Л.Н., Брусков В.И., Газиев А.И. Индивидуальные различия ответа на радиационное воздействие, выявляемые в клетках крови пациентов в ходе химиотерапии // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2005. – Т. 45, № 6. – С. 645-652.
6. Тарнопольская О.В., Сурикова Е.И., Горошинская И.А., Тихановская Н.М. Способы оценки повреждения ДНК в лейкоцитах крови пациенток с раком молочной железы методом ДНК-комет // Клиническая и экспериментальная морфология. – 2016. – № 2. – С. 60-64.
7. Abdul-Sater A.A., Saïd-Sadier N., Lam V.M., Singh B., Pettengill M.A., Soares F., Tattoli I., Lipinski S., Girardin S.E., Rosenstiel P. and Ojcius D.M. Enhancement of reactive oxygen species production and chlamydial infection by the mitochondrial nod-like family member NLRX1 // J. Biol. Chem. – 2010. – Vol. 285, № 53. – P. 41637-41645.
8. Chumduri C., Gurumurthy R.K., Zadora P.K., MiYa., Meyer T.F. Chlamydia infection promotes host DNA damage and proliferation but impairs the DNA damage response // Cell Host & Microbe. – 2013, June 12. – Vol. 13. – P. 746-758.

9. Williams V.M. HPV16 E6* Induces oxidative stress and DNA damage: Doctor of Philosophy in Biochemistry. – Loma Linda University Electronic Theses & Dissertations. – 2014. – 171 p.
10. Zhu H., Shen Z., Luo H., Zhang W., Zhu X. Chlamydia trachomatis infection-associated risk of cervical cancer: A Meta-analysis // *Medicine (Baltimore)*. – March 2016. – V. 95, № 13. e3077. doi: 10.1097/MD.0000000000003077.