

ВЛИЯНИЕ КУРЕНИЯ НА СОСТОЯНИЕ ТИОЛДИСУЛЬФИДНОЙ СИСТЕМЫ В ПЛАЗМЕ КРОВИ И ЧАСТОТУ TCR-МУТАНТНЫХ ЛИМФОЦИТОВ ЗДОРОВЫХ ЛИЦ И ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ

© 2025 г. Г.Ф. Иваненко*,#, И.А. Замулаева**, ***

*Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, ул. Косыгина, 4, Москва, 119334, Россия

**Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба — филиал Национального медицинского исследовательского центра радиологии Минздрава России,
ул. Маршала Жукова, 10, Обнинск, Калужская область, 249031, Россия

***Объединенный институт ядерных исследований, ул. Жолио-Кюри, 6, Дубна, Московская область, 141980, Россия

#E-mail: galiv03@rambler.ru

Поступила в редакцию 15.05.2024 г.

После доработки 18.11.2024 г.

Принята к публикации 15.01.2025 г.

Проведено сравнительное исследование показателей соматического мутагенеза и тиолдисульфидной системы в периферической крови онкологических больных до лечения и здоровых лиц с разным статусом курения ($n = 95$). В общей группе больных обнаружено статистически значимое повышение всех исследованных показателей в 1.5–2.7 раза по сравнению с таковыми в общей группе здоровых лиц ($p < 0.01$) для этих же показателей, включая содержание восстановленного и окисленного глутатиона и их отношение, частоту лимфоцитов с мутациями по локусу Т-клеточного рецептора. При этом после прекращения курения у больных наблюдалось снижение частоты мутантных лимфоцитов и отношения восстановленного и окисленного глутатиона ($p < 0.05$). На индивидуальном уровне обнаружены сильные корреляционные связи частоты мутантных клеток с содержанием восстановленного ($r = 0.82$, $p < 0.001$) и окисленного глутатиона ($r = 0.68$, $p < 0.01$) только в подгруппе курящих больных с высоким уровнем мутагенеза. Полученные результаты указывают на вклад тиолдисульфидной системы в формирование высокой частоты генных мутаций у части курящих лиц с онкологическими заболеваниями.

Ключевые слова: курение, онкологические больные, восстановленный и окисленный глутатион, частота TCR-мутантных лимфоцитов, плазма крови.

DOI: 10.31857/S0006302925020198, EDN: KYITWQ

Как известно, сигаретный дым содержит более 4 тысяч химических соединений, включая специфические для табака N-нитрозамины, полициклические ароматические углеводороды и ароматические амины, которые обладают прямым генотоксическим и канцерогенным действием, а также могут вызывать окислительный стресс, индуцируя образование активных форм кислорода (АФК), способных повреждать ДНК и другие биомолекулы [1–3]. Многие авторы отмечают, что окислительный стресс связан с патогенезом ряда заболеваний и состояний (старение, физическая слабость пожилых лиц, онкологические, сердечно-сосудистые и неврологические заболевания), если не в качестве основной причины бо-

лезни, то, по крайней мере, какотягчающий фактор [4–10]. Существенная роль окислительного стресса в развитии и прогрессировании многих заболеваний определяет возрастающий интерес исследователей к выяснению закономерностей и механизмов формирования окислительно-восстановительного баланса в организме при воздействии факторов различной природы, в том числе сложной смеси химических соединений сигаретного дыма. В последние годы стало понятно, что изучение молекулярных путей, вовлеченных в поддержание и нарушение окислительно-восстановительного баланса, является критически важным для идентификации молекулярных мишеней, полезных для разработки новых эффективных профилактических и терапевтических подходов [11, 12].

Сокращения: АФК — активные формы кислорода, GSH — восстановленный глутатион, GSSG — окисленный глутатион, TCR — Т-клеточный рецептор.

Окислительный стресс, который описывается как дисбаланс между оксидантной и антиоксидантной системами, может возникнуть либо из-за перепроизводства избыточного количества АФК, либо из-за недостаточности антиоксидантных механизмов. Тиоловые соединения и тиолдисульфидная система играют важную роль в сложном многокомпонентном механизме антиоксидантной защиты. Уникальные химические свойства тиолов обуславливают их высокую избирательную антиоксидантную активность и способность проявлять антирадикальное действие. В процессах цепных радикальных реакций образовавшиеся вторичные радикалы (супероксидный анион-радикал, пероксиды и активные тиольные радикалы) могут вызвать повреждение ДНК и инициировать процессы, приводящие к дестабилизации генома (в виде хромосомных aberrаций, генных мутаций) [13].

Глутатион, наиболее распространенный трипептид (γ -L-глутамил-L-цистеин-глицин, GSH), является основным компонентом клеточной антиоксидантной системы, который выступает в качестве индикатора окислительно-восстановительного состояния клеток, хранения и транспорта цистеина. GSH регулирует тиол-дисульфидный статус белков, сохраняя свои сульфгидрильные группы в восстановленной форме [14]. Высокая концентрация GSH в клетках млекопитающих поддерживается с помощью конститутивного биосинтеза *de novo* с участием ферментов биосинтетического пути. Восполнение содержания GSH осуществляется не только за счет синтеза *de novo*, но и активности глутатионредуктазы, которая восстанавливает окисленный глутатион (GSSG) в присутствии НАДФН(H^+) до GSH [15]. Появляется все больше доказательств его участия в ключевых процессах жизнедеятельности клеток — пролиферации [16, 17], апоптотической гибели [18], репарации повреждений ДНК [19, 20] и т.д.

Учитывая биологическое значение тиолдисульфидной системы, неудивительно, что уже много лет внимание исследователей привлечено к изучению ее изменений в различных ситуациях, связанных с действием экзогенных факторов или протеканием патологических процессов в организме человека. Вместе с тем влияние курения на состояние тиолдисульфидной системы изучено недостаточно, а имеющиеся немногочисленные данные противоречивы [1, 21, 22]. Особый интерес представляет сравнительное исследование тиолдисульфидной системы у курящих и некурящих онкологических больных, т.е. при наличии в организме такого источника окислительного стресса, как злокачественное новообразование [6, 23, 24]. Также пока неясно, как влияет состояние тиолдисульфидной системы курильщиков на уровень соматического мутагенеза, повышение

которого является одной из основных причин канцерогенного действия табачного дыма.

Выяснение этих вопросов является целью данной работы, в которой проведена сравнительная оценка состояния тиолдисульфидной системы (по показателям содержания GSH, GSSG, GSH/GSSG) и уровня соматического мутагенеза (по частоте лимфоцитов с мутациями по локусу Т-клеточного рецептора (TCR — T-cell receptor)) у курящих и некурящих здоровых лиц и онкологических больных с тем же статусом курения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Группа исследования включала здоровых лиц ($n = 51$) и онкологических больных ($n = 44$) до лечения. Все обследованные были мужского пола. Здоровые лица являлись сотрудниками МРНЦ им. А.Ф. Цыба или постоянными донорами крови, зарегистрированными в отделении трансфузиологии этой же организации. Онкологические больные были госпитализированы в клинические отделения МРНЦ им. А.Ф. Цыба для лечения рака легкого, гортани, гортаноглотки или тканей ротовой полости. Диагноз всех больных был верифицирован гистологически.

Образцы периферической крови всех лиц были взяты после получения информированного согласия на участие в данном исследовании и анкетирования. Сведения о статусе курения для здоровых лиц и пациентов с онкологическими заболеваниями представлены в табл. 1.

Частота TCR-мутантных лимфоцитов определена с помощью метода, разработанного японскими исследователями [25] и усовершенствованного нами с целью повышения его точности [26]. Принцип метода заключается в следующем. На поверхности Т-лимфоцитов экспрессирован комплекс Т-клеточного рецептора и CD3-антигена. Так как TCR-гены функционально гемизиготны, на поверхности лимфоцитов представлены продукты только одного аллеля. Мутация в функционирующем аллеле приводит к тому, что CD3-комплекс не экспрессируется на поверхности Т-лимфоцита. Такие мутанты определяются с помощью проточной цитометрии как CD3-негативные среди CD4-позитивных Т-клеток. Для идентификации мутантных клеток используют моноклональные антитела, меченные разными флуорохромами, к CD3, CD4 и HLA-DR. Частоту мутантных клеток определяют как отношение количества вариантных CD4+CD3-HLA-DR-клеток к общему числу лимфоцитов CD4+CD3+ (подробное описание методики приведено в работе [26]).

Для оценки состояния тиолдисульфидной системы определяли содержание восстановленного и окисленного глутатиона в 20–100 мкл плазмы

Таблица 1. Средний возраст и статус курения обследованных лиц

Отсутствие/ наличие онкологичес- кого заболевания	Статус курения		Количество лиц	Средний возраст \pm SE, лет	Среднее число сигарет в день \pm SE	Средняя продолжите- льность курения \pm SE, лет	Среднее время после прекращения курения \pm SE, лет
	Текущие некурильщики	Никогда не курили					
Здоровые лица	Текущие некурильщики	Никогда не курили	13	51 ± 3	—	—	—
	Текущие курильщики	Курили в прошлом	18	50 ± 1	15 ± 2	21 ± 3	10 ± 3
		Курят на момент обследования	20	50 ± 1	19 ± 1	33 ± 1	—
Онкологи- ческие больные	Текущие некурильщики	Никогда не курили	6	51 ± 4	—	—	—
	Текущие курильщики	Курили в прошлом	8	56 ± 2	19 ± 1	36 ± 2	2 ± 1
		Курят на момент обследования	30	53 ± 1	19 ± 1	34 ± 1	—

крови методом [27] в нашей модификации [28]. Интенсивность флуоресценции продукта реакции 1% раствора ортофталативного деальдегида с глутатионом измеряли спектрофлуориметрически при $E_{\text{ex}}/E_{\text{em}} = 350/420$ нм. Содержание окисленного глутатиона определяли по разности между общим количеством SH-групп, образовавшихся после восстановления, и исходным, которое определяли до начала восстановления, с учетом слепых проб на реактивы и соответствующими калибровочными стандартами для окисленного и восстановленного глутатиона. Все результаты выражали в мкмоль/л как среднее из трех параллельных определений.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью компьютерных программ SigmaPlot 10.0 (Systat Software Inc., США) и Statistica 6.0 (Stat Soft., Inc., США). Для построения графиков использовали программу SigmaPlot 10.0. Групповое сравнение данных выполняли по критериям Стьюдента и Манна–Уитни, рассчитывали среднее значение и стандартную ошибку ($M \pm m$). Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В табл. 2 и на рис. 1–4 представлены средние показатели содержания GSH, GSSG и значения GSH/GSSG в плазме крови, а также средняя частота лимфоцитов, мутантных по генам Т-клеточного рецептора, в группах здоровых лиц и онкологических больных, разделенных по статусу курения.

У здоровых лиц не выявили значимых различий средних показателей состояния тиодисульфидной системы между курящими и некурящими лицами с одним исключением. Таковым является небольшое, но статистически значимое увеличение содержания GSH в плазме крови здоровых лиц, курящих на момент обследования, относительно курящих в прошлом здоровых лиц (69.5 ± 6.4 мкмоль/л vs 53.8 ± 5.0 мкмоль/л, $p < 0.05$). В подгруппах онкологических больных среднее содержание GSH было практически одинаково независимо от статуса курения, но статистически значимо выше, чем у здоровых лиц (рис. 1, табл. 2). Например, в общей группе онкологических больных содержание GSH в плазме крови превышало таковое в общей группе здоровых лиц более чем в 2 раза: 164.3 ± 14.3 и 61.1 ± 3.5 мкмоль/л соответственно, $p < 0.001$ (рис. 1, табл. 2).

Таблица 2. Средние показатели частоты TCR-мутантных лимфоцитов и тиолдисульфидной системы в плазме крови здоровых лиц и онкологических больных с разным статусом курения

Статус курения обследованных лиц		Показатели			
		TCR $\times 10^{-4}$	GSH, мкмоль/л	GSSG, мкмоль/л	GSH/GSSG, отн. ед.
Все здоровые ($n = 51$), в том числе:		$5.4 \pm 0.4^{**}$	$61.1 \pm 3.5^{**}$	$41.5 \pm 2.2^{**}$	$1.6 \pm 0.1^{**}$
Текущие некурильщики	Никогда не курили ($n = 13$)	4.7 ± 0.5	58.1 ± 6.2	40.0 ± 5.2	1.7 ± 0.2
	Курили в прошлом ($n = 18$)	5.5 ± 0.8	$53.8 \pm 5.0^*$	38.4 ± 3.1	1.4 ± 0.1
Текущие курильщики	Курили на момент обследования ($n = 20$)	6.2 ± 0.6	69.5 ± 6.4	45.2 ± 3.6	1.7 ± 0.2
Все больные ($n = 44$), в том числе:		8.7 ± 1.2	164.4 ± 14.3	72.4 ± 5.9	2.4 ± 0.1
Текущие некурильщики	Никогда не курили ($n = 6$)	6.7 ± 1.3	170.9 ± 41.4	63.5 ± 16.4	2.8 ± 0.5
	Курили в прошлом ($n = 8$)	$6.2 \pm 0.7^*$	130.3 ± 20.7	72.8 ± 14.2	$1.9 \pm 0.1^*$
Текущие курильщики	Курили на момент обследования ($n = 30$)	9.8 ± 1.8	172.1 ± 18.5	74.0 ± 7.3	2.5 ± 0.2

Примечание. * — $p < 0.05$ относительно лиц, куривших на момент обследования; ** — $p < 0.001$ относительно всех онкологических больных.

На рис. 1–4 указаны значения p по критерию Стьюдента при выявлении статистически значимых различий между соответствующими группами.

Сходная картина наблюдалась и для другого показателя состояния тиодисульфидной системы — содержания GSSG (рис. 2, табл. 2). В подгруппах здоровых лиц и онкологических больных независимо от статуса курения уровни окисленного глутатиона были примерно одинаковыми. Но в подгруппах онкологических больных, разделенных по статусу курения, содержание GSSG существенно выше, чем у здоровых лиц с соответствующим статусом курения. При этом в объединенной группе онкологических больных отмечалось значительно более высокое содержание GSSG в плазме крови, чем таковое в объединенной группе здоровых лиц (в среднем 72.4 ± 5.9 мкмоль/л vs 41.5 ± 2.2 мкмоль/л соответственно, $p < 0.001$) (рис. 2, табл. 2).

Не обнаружено влияния курения и на средние показатели тиол/дисульфидного отношения у здоровых лиц независимо от статуса курения. В то

же время в общей группе онкологических больных ($n = 44$) наблюдалось повышение в 1.5 раза средних значений GSH/GSSG относительно группы здоровых лиц ($n = 51$): 2.4 ± 0.1 отн. ед. vs 1.6 ± 0.1 отн. ед. соответственно, $p < 0.01$, причем независимо от статуса курения, как описано выше для GSH и GSSG. В подгруппе онкологических больных, куривших на момент обследования, средние значения GSH/GSSG были выше в 1.3 раза, чем у пациентов, куривших в прошлом: 2.5 ± 0.2 отн. ед. vs 1.9 ± 0.1 отн. ед. соответственно, $p < 0.01$ (рис. 3, табл. 2).

Данные о частоте TCR-мутантных клеток в подгруппах обследованных лиц представлены на рис. 4 и в табл. 2. У здоровых лиц, курящих на момент обследования, наблюдается тенденция к увеличению частоты TCR-мутантных клеток до $6.2 \cdot 10^{-4}$ по сравнению с остальными здоровыми лицами: $4.7 \cdot 10^{-4}$ никогда не куривших или $5.5 \cdot 10^{-4}$ у бросивших курить ($p > 0.05$ в обоих случаях). В общей группе онкологических больных показатель соматического мутагенеза был статистически значимо выше, чем в группе здоровых

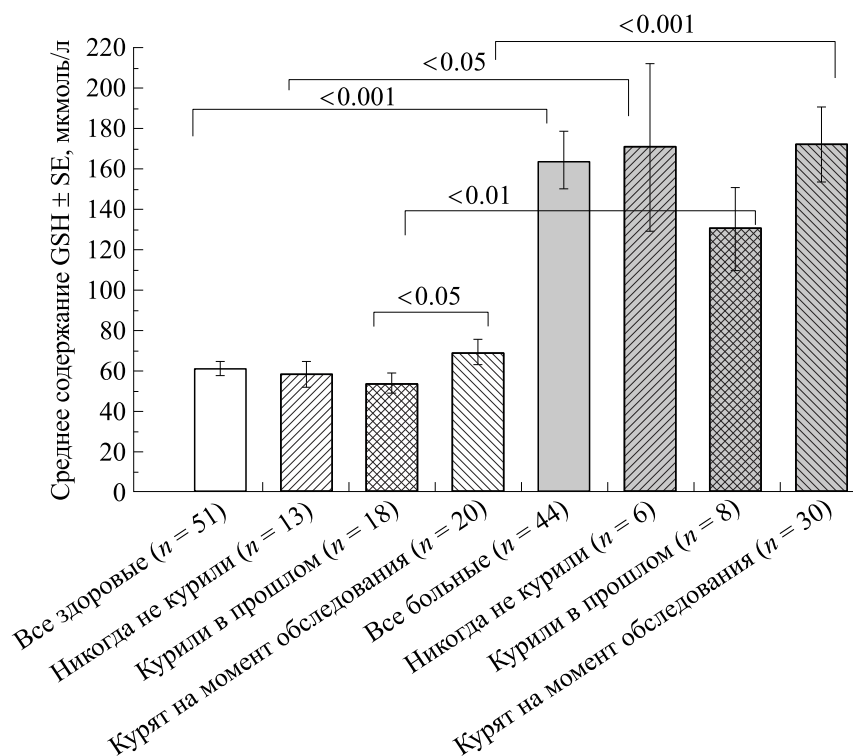


Рис. 1. Содержание GSH в плазме крови здоровых лиц и онкологических больных с разным статусом курения.

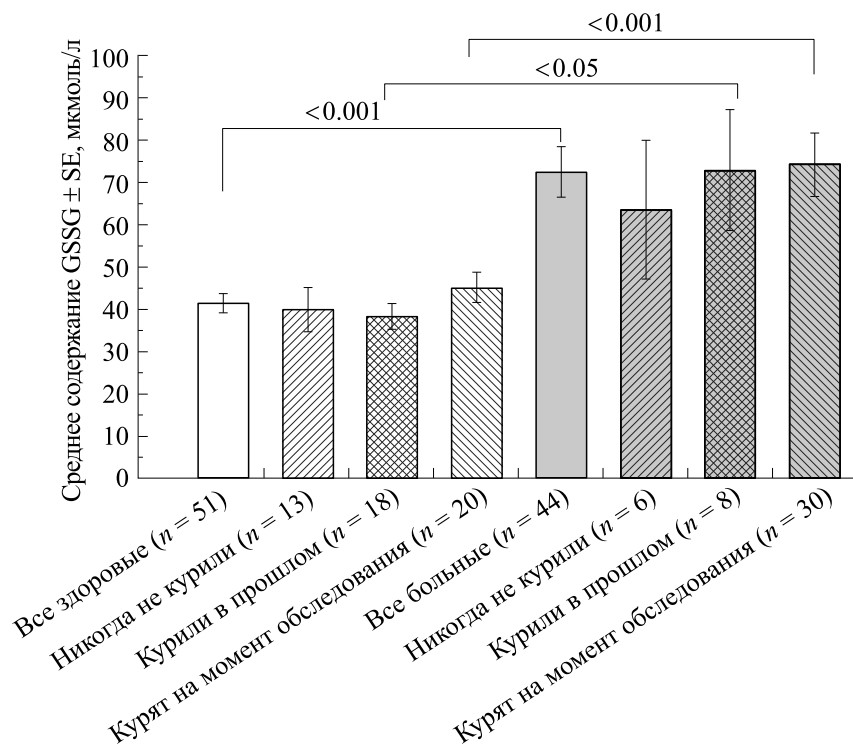


Рис. 2. Содержание GSSG в плазме крови здоровых лиц и онкологических больных с разным статусом курения.

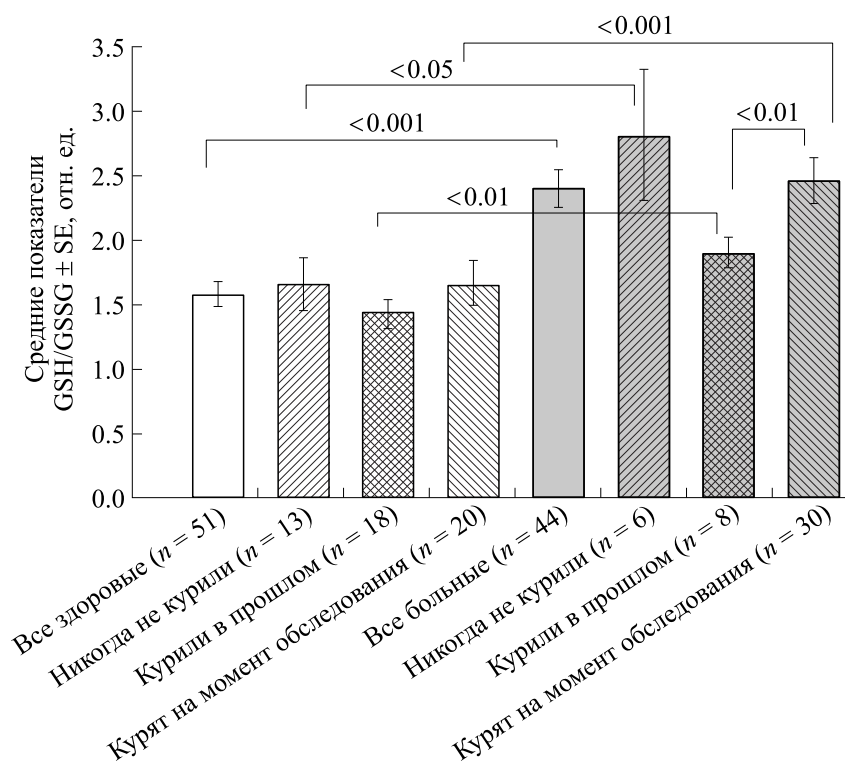


Рис. 3. Показатели GSH/GSSG в плазме крови здоровых лиц и онкологических больных с разным статусом курения.

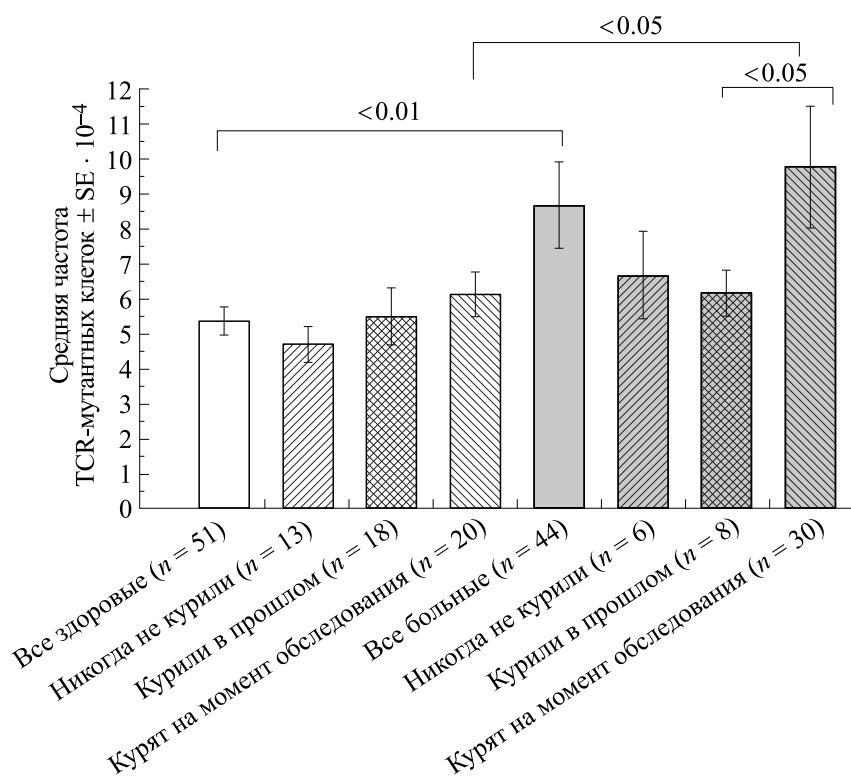


Рис. 4. Частота TCR-мутантных лимфоцитов в группах здоровых лиц и онкологических больных с разным статусом курения.

лиц, составляя в среднем $(8.7 \pm 1.2) \cdot 10^{-4}$ vs $(5.4 \pm 0.4) \cdot 10^{-4}$ соответственно ($p < 0.01$), как описано выше для показателей GSH, GSSG и GSH/GSSG. При этом в группе онкологических больных, куривших на момент обследования, средняя частота TCR-мутантных клеток была выше и статистически значимо отличалась от показателей больных, куривших в прошлом: $(9.8 \pm 1.8) \cdot 10^{-4}$ vs $(6.2 \pm 0.7) \cdot 10^{-4}$ соответственно ($p < 0.05$) (рис. 4, табл. 2). Повышение частоты TCR-мутантных клеток у онкологических больных, куривших на момент обследования, относительно больных, куривших в прошлом, согласуется с повышением показателей GSH/GSSG у тех же больных с соответствующим статусом курения. Таким образом, у куривших в прошлом лиц прекращение курения приводит к уменьшению частоты TCR-мутантных клеток и снижению GSH/GSSG только в группе лиц с онкологическими заболеваниями (рис. 3 и 4, табл. 2).

Таким образом, прослеживается определенное соответствие в изменении средней частоты TCR-мутантных клеток и средних показателей состояния тиолдисульфидной системы на групповом уровне. Наблюдается не только повышение средней частоты TCR-мутантных лимфоцитов, но и увеличение среднего содержания GSH, GSSG в плазме крови, а также величины их отношения GSH/GSSG в общей группе онкологических больных относительно здоровых лиц независимо от статуса курения. Кроме того, у куривших в прошлом онкологических больных наблюдается снижение и средней частоты TCR-мутантных клеток, и средних значений GSH/GSSG относительно больных, куривших на момент обследования (рис. 3 и 4, табл. 2).

Анализ экспериментальных данных на индивидуальном уровне между частотой TCR-мутантных лимфоцитов и состоянием тиолдисульфидной системы здоровых лиц и пациентов с онкологическими заболеваниями независимо от статуса курения не выявил четкой зависимости. Исходя из представленных нами данных, можно говорить лишь о тенденции к повышению частоты TCR-мутантных лимфоцитов с повышением тиол/дисульфидного отношения (GSH/GSSG) ($r = 0.26$, $p > 0.05$, $n = 44$) (рис. 5в) в общей группе онкологических больных.

При рассмотрении индивидуальных экспериментальных данных обнаружено увеличение вариабельности не только показателей глутатионового статуса (GSH, GSSG и GSH/GSSG) в плазме крови, но и частоты TCR-мутантных клеток в лимфоцитах онкологических больных относительно показателей здоровых лиц независимо от статуса курения. Необходимо обратить внимание на группу больных с онкологическими заболеваниями, у которых частота TCR-мутантных лим-

фоцитов и содержание глутатиона в плазме крови совпадают с показателями здоровых лиц независимо от статуса курения. Таких больных обнаружено приблизительно 20% от всех обследованных (рис. 5).

Корреляционные связи между частотой TCR-мутантных лимфоцитов и показателями состояния тиолдисульфидной системы не были обнаружены ни в группе здоровых, ни в группе больных лиц, за исключением подгруппы курящих онкологических больных с относительно высокой частотой мутантных клеток (более $8.0 \cdot 10^{-4}$), превышающей возрастную норму. Среди курящих онкологических больных было обнаружено 12 лиц с повышенной частотой TCR-мутантных лимфоцитов. В этой подгруппе содержание GSH ($r = 0.82$, $p < 0.001$) и GSSG ($r = 0.67$, $p < 0.01$) коррелировало с уровнем соматического мутагенеза.

Подобные результаты были получены нами ранее при обследовании сотрудников атомной промышленности, подвергшихся радиационному воздействию в средней дозе 10.1 сЗв, накопленной суммарно за 26 лет профессиональной деятельности [29]. Объединение экспериментальных данных, полученных нами для пациентов с онкологическими заболеваниями ($n = 44$) независимо от статуса курения, и лиц, подвергшихся воздействию радиации в относительно небольших дозах при профессиональном облучении ($n = 50$), показало повышение статистической значимости зависимости частоты TCR-мутантных клеток от показателей GSH/GSSG ($r = 0.26$, $n = 94$, $p > 0.001$) (рис. 6).

Среди курящих онкологических больных обнаружены 12 лиц, а среди профессионалов-атомщиков — 18 сотрудников с относительно высокой частотой TCR-мутантных клеток (более $8.0 \cdot 10^{-4}$), превышающей возрастную норму. В качестве верхней границы нормы была принята верхняя граница 95% доверительного интервала частоты TCR-мутантных лимфоцитов в группе здоровых никогда не куривших лиц ($8.0 \cdot 10^{-4}$). Таким образом, именно в объединенной группе лиц ($n = 30$) содержание и GSH ($r = 0.74$, $p < 0.001$), и GSSG ($r = 0.44$, $p < 0.01$) в плазме крови коррелировало с уровнем соматического мутагенеза (рис. 7а,б).

ОБСУЖДЕНИЕ

Нами обнаружено нарушение окислительно-восстановительного баланса у онкологических больных до лечения, заключающееся в повышенном содержании GSH, GSSG и увеличении тиол/дисульфидного отношения в плазме крови по сравнению со здоровыми лицами. Тип ответной реакции адаптационного механизма на стресс (активация или угнетение функции) зависит от силы и продолжительности воздействия.

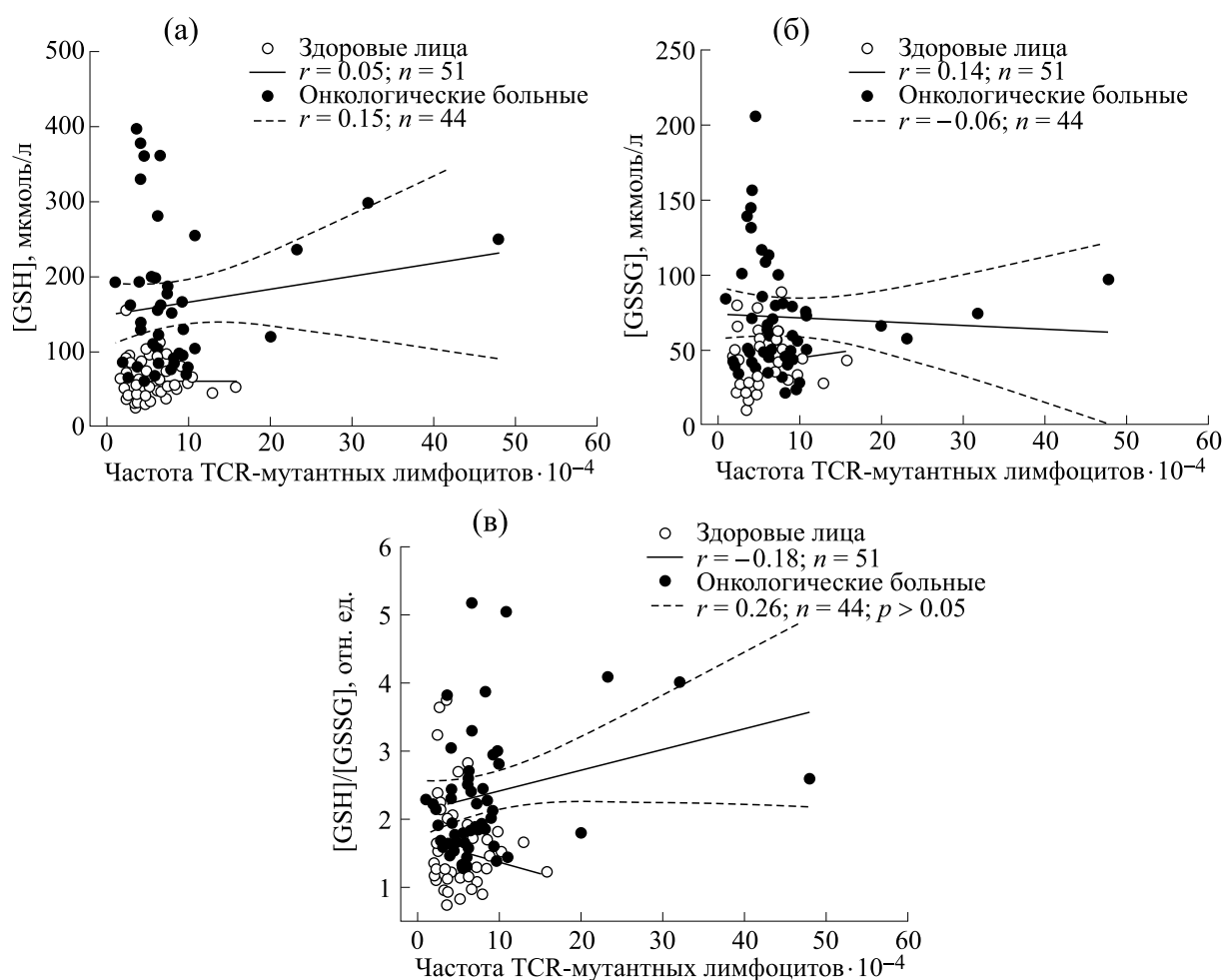


Рис. 5. Результаты анализа возможных корреляций между частотой TCR-мутантных лимфоцитов и содержанием GSH (а), GSSG (б), GSH/GSSG (в) в плазме крови здоровых лиц и пациентов с онкологическими заболеваниями независимо от статуса курения. Пунктирные линии показывают границы 95%-го доверительного интервала для линейной регрессии.

Реакция тиолдисульфидной системы тканей организма на воздействие проявляется в сдвигах окислительно-восстановительного равновесия в сторону восстановления или окисления. Признаки дисбаланса между процессами восстановления и окисления у онкологических больных были обнаружены в многочисленных исследованиях [5, 6, 12, 30, 31].

Известно, что опухолевые клетки (по сравнению с нормальными) характеризуются повышенной продукцией АФК, но способны выживать и пролиферировать в проокислительных условиях, активируя экспрессию генов антиоксидантных ферментов [31]. В частности, вследствие такой активации происходит повышение внутриклеточного уровня GSH, в то время как GSSG быстро удаляется из опухолевых клеток через MRP/ABCC транспортеры или ресинтезируется в GSH через глутатионредуктазу. Гиперэкспрессия транспортеров MRP/ABCC в опухолевых клетках

увеличивает доступность аминокислот для биосинтеза GSH и, следовательно, повышает внутриклеточный пул GSH.

При онкологических заболеваниях резко повышается уровень супероксидных радикалов ($O_2^{\cdot -}$), что определяет повышение уровня GSH как агента, защищающего организм от оксидативного стресса, характерного для онкологических больных [2, 13, 15]. В свою очередь, высокий уровень GSH, обычно регистрируемый в опухолевых клетках, предотвращает повреждение ядерных структур и обеспечивают пролиферацию клеток [17]. В итоге изменение окислительно-восстановительного баланса, включая отношение GSH/GSSG в опухолевых клетках, происходит при их более высоких уровнях по сравнению с нормальными клетками [24]. По-видимому, описанные процессы могут объяснить изменения в состоянии тиолдисульфидной системы, обнаруженные нами

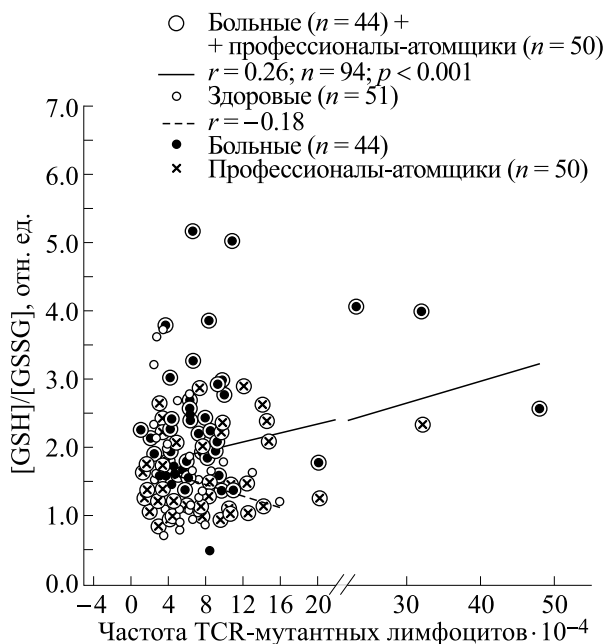


Рис. 6. Зависимость между частотой TCR-мутантных лимфоцитов и величиной GSH/GSSG в плазме крови здоровых лиц, пациентов с онкологическими заболеваниями и сотрудников атомной промышленности, подвергшихся облучению в относительно небольших дозах.

в плазме крови онкологических больных, и сходные данные литературы об изменении GSH/GSSG в крови больных раком желудка [33].

Результаты сравнения частоты TCR-мутантных клеток в смешанной группе больных раком легкого, орофарингеальной зоны, гортани до лечения и в группе здоровых лиц подтвердили ранее

полученные данные о статистически значимом повышении показателя соматического мутагенеза у пациентов со злокачественными опухолями различных локализаций, включая лимфому Ходжкина, рак верхних дыхательных путей, орофарингеальной зоны, щитовидной железы, шейки матки, кишечника [34, 35]. Более того, в проспективном исследовании нами было доказано на примере сотрудников атомной промышленности, что повышенная частота TCR-мутантных клеток является маркером высокого канцерогенного риска [36]. Аналогичные данные были получены и в отношении хромосомных aberrаций в лимфоцитах периферической крови, высокая частота которых также является биомаркером канцерогенного риска [36, 37].

Наиболее высокая частота TCR-мутантных клеток зарегистрирована нами в группе курящих онкологических больных, в то время как у здоровых курящих лиц наблюдалась лишь тенденция к повышению частоты TCR-мутантных клеток. Влияние курения на частоту TCR-мутантных клеток ранее не изучалось, хотя известно немало работ, посвященных сравнению частоты генных мутаций по другим локусам и хромосомных aberrаций в лимфоцитах крови курящих и некурящих лиц, но результаты оказались противоречивыми. Так, в ряде работ было продемонстрировано значимое повышение числа мутантных клеток у курильщиков, в некоторых исследованиях не удалось показать никаких различий по сравнению с некурящими лицами [38, 39]. Если эффекты табакокурения удавалось обнаружить по показателям мутагенеза в лимфоцитах крови, то они заключались чаще всего в повышении частоты хромосомных aberrаций примерно на 10–20%, генных

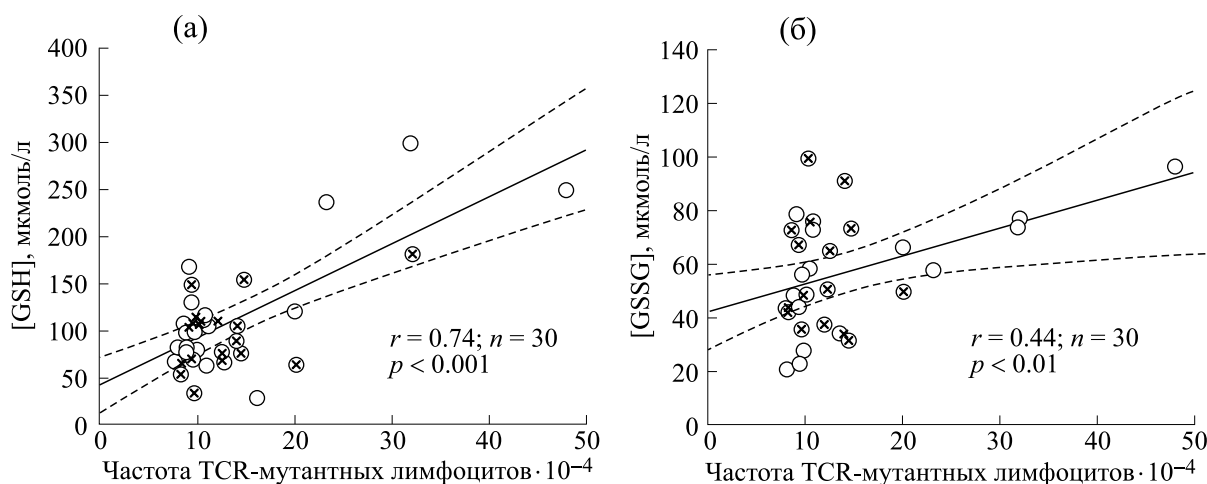


Рис. 7. Корреляционная связь между относительно высокой частотой TCR-мутантных клеток (более $8.0 \cdot 10^{-4}$) и содержанием GSH (а) и GSSG (б) в группе курящих онкологических больных (кружки) и профессионалов-атомщиков (крестики), подвергшихся воздействию радиации в относительно небольших дозах. Пунктирные линии показывают границы 95%-го доверительного интервала для линейной регрессии.

мутаций — на 50%. В нашем исследовании средняя частота лимфоцитов с мутациями по локусу Т-клеточного рецептора повышалась у курящих онкологических больных в среднем на 46% по сравнению с таковой у никогда не куривших больных и на 58% по сравнению с таковой у бросивших курить ($9.8 \cdot 10^{-4}$ vs $6.7 \cdot 10^{-4}$ и $6.2 \cdot 10^{-4}$ соответственно), что согласуется с литературными данными [39, 40].

Можно полагать, что онкологические больные представляют группу людей, особенно чувствительных к действию генотоксических факторов, включая продукты горения табака. Причина повышенной чувствительности к последним может заключаться в наследственных особенностях детоксикации ксенобиотиков, антиоксидантной защиты, репарации повреждений ДНК и других процессов, герминальный полиморфизм которых интенсивно изучается в последнее время в связи с поиском молекулярно-генетических маркеров риска заболеваний, связанных с курением [41]. С другой стороны, обнаруженное нами повышение частоты TCR-мутантных клеток именно у курящих онкологических больных может быть связано с наличием в организме окислительного стресса, источником которого является злокачественное новообразование, что может привести к повышению чувствительности к дополнительному оксидативному/генотоксическому действию табачного дыма, и, в конечном итоге, к аддитивному, или синергическому, повышению уровня соматического мутагенеза. Что касается статистически значимого повышения частоты TCR-мутантных лимфоцитов у курящих онкологических больных, то оно могло быть обусловлено следующим. Показано, что курение приводит к поступлению в организм человека значительного количества газообразного оксида азота (NO) [42]. Этот свободнорадикальный агент эффективно реагирует с другим свободнорадикальным агентом: анионом супероксида ($O_2^{\cdot -}$), что приводит к образованию пероксинитрита ($ONOO^-$). Последующее протонирование этого соединения приводит к образованию соответствующей кислоты ($HONOO$), которая распадается на гидроксильный радикал (OH^{\cdot}) и диоксид азота (NO_2). Оба агента токсичны для организма, особенно гидроксильный радикал, как сильнейший окислитель. Есть основания полагать, что именно этот радикал инициирует повышение частоты TCR-мутантных лимфоцитов у курящих онкологических больных.

На групповом уровне прослеживается определенное соответствие полученных нами данных об уровне соматического мутагенеза и состоянии тиолдисульфидной системы: например, отсутствие эффектов табакокурения у здоровых лиц и

наличие изменений по обоим критериям у онкологических больных по сравнению со здоровыми лицами независимо от статуса курения.

Однако на индивидуальном уровне сильные корреляционные связи между частотой TCR-мутантных клеток и показателями тиолдисульфидной системы были обнаружены только в подгруппе больных с высоким уровнем мутагенеза (в подгруппу входили курящие пациенты). Полученные результаты указывают на вклад тиолдисульфидной системы в формирование высокой частоты TCR-мутантных клеток у части курящих лиц. Но если частота мутантных клеток остается в пределах возрастной нормы, вклад тиолдисульфидной системы в формирование мутаций не прослеживается.

Сходные результаты были получены нами ранее при обследовании сотрудников атомной промышленности, подвергшихся радиационному воздействию в средней дозе 10.1 сЗв, накопленной суммарно за 26 лет профессиональной деятельности [29]. Показатели тиолдисульфидной системы коррелировали с частотой TCR-мутантных клеток также только в подгруппе профессионалов-атомщиков с высокой TCR-мутантной частотой. По-видимому, вклад тиолдисульфидной системы в соматический мутагенез становится заметным лишь в случае снижения эффективности других, более мощных, систем поддержания генетической стабильности (например, репарации повреждений ДНК).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведено сравнительное исследование показателей соматического мутагенеза и тиолдисульфидной системы, которая играет важную роль в многокомпонентном механизме антиоксидантной защиты, в периферической крови онкологических больных до лечения ($n = 44$) и здоровых лиц ($n = 51$) с разным статусом курения. В общей группе больных обнаружено статистически значимое повышение всех исследованных показателей по сравнению с общей группой здоровых лиц, т.е. независимо от статуса курения. При этом были зарегистрированы эффекты, связанные с прекращением курения. Так, у бросивших курить больных отмечено снижение средней частоты TCR-мутантных лимфоцитов и GSH/GSSG по сравнению с таковыми у больных, куривших на момент обследования: $9.8 \cdot 10^{-4}$ vs $6.2 \cdot 10^{-4}$ и 2.5 vs 1.9 отн. ед. ($p < 0.05$ в обоих случаях) соответственно. На индивидуальном уровне обнаружены сильные корреляционные связи между частотой TCR-мутантных клеток и показателями тиолдисульфидной системы только в подгруппе курящих больных с высоким уровнем мутагенеза, который превышал возрастную норму. Полученные

результаты проясняют вклад тиолдисульфидной системы в формирование высокой частоты TCR-мутантных клеток у части курящих лиц с онкологическими заболеваниями. Важно, что результаты данной работы подтверждают ранее установленную закономерность, которая характеризует роль тиолдисульфидной системы в соматическом мутагенезе после воздействия другого генотоксического фактора (ионизирующего излучения в относительно небольших дозах) при профессиональном облучении.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Сбор образцов периферической крови и обработка данных проводились в полном соответствии с принципами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения медицинских исследований с участием человека» (Хельсинки, 1964 г., с поправками, внесенными в 1975–2000 гг.), действующим законодательством и постановлениями Правительства Российской Федерации, в том числе Федеральным законом «О персональных данных» № 152-ФЗ, 2006 г. Все данные и личная информация собраны для обработки и оценки только в анонимной форме. Образцы крови были взяты у всех лиц после подписания ими информированного согласия на участие в исследовании. Данное исследование одобрено этическим комитетом МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиала Национального медицинского исследовательского центра радиологии Минздрава России.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Solak I., Cetinkaya C. D., Gederet Y. T., Kozanhan B., Erel O., and Eryilmaz M. A. Effects of smoking on thiol/disulfide homeostasis. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, **22** (8), 2477–2482 (2017). DOI: 10.26355/eurrev_201804_14842
2. Sies H. and Jones D. P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **21** (7), 363 (2020). DOI: 10.1038/s41580-020-0230-3
3. Chauhan P., Reddy S. S., Chokkanna V. K., Singh P., and Majumdar K. Oxidant and antioxidant status among tobacco users: A cross-sectional study. *Natl. J. Maxillofac. Surg.*, **14** (3), 444 (2023). DOI: 10.4103/njms.njms_517_21
4. Ghezzi P. Role of glutathione in immunity and inflammation in the lung. *Int. J. Gen. Med.*, **4**, 105–113 (2011). DOI: 10.2147/IJGM.S15618
5. Domenicotti C. and Marengo B. Paradox role of oxidative stress in cancer: State of the art. *Antioxidants (Basel)*, **11** (5), 1027 (2022). DOI: 10.3390/antiox11051027
6. Lambring C. B., Chen L., Nelson C., Stevens A., Bratcher W., and Basha R. Oxidative stress and cancer: Harnessing the therapeutic potential of curcumin and analogues against cancer. *Eur. J. Biol.*, **82** (2), 317 (2023). DOI: 10.26650/eurjbiol.2023.1348427
7. Shadfar S., Parakh S., Jamali M. S., and Atkin J. D. Redox dysregulation as a driver for DNA damage and its relationship to neurodegenerative diseases. *Transl. Neurodegener.*, **12** (1), 18 (2023). DOI: 10.1186/s40035-023-00350-4
8. Roos E., Heikkinen S., Seppä K., Pietiläinen O., Ryyänänen H., Laaksonen M., Roos T., Knekt P., Männistö S., Härkänen T., Jousilahti P., Koskinen S., Eriksson J. G., Malila N., Rahkonen O., and Pitkaniemi J. Pairwise association of key lifestyle factors and risk of solid cancers – A prospective pooled multi-cohort register study. *Prev. Med. Rep.*, **38** (10), 2607 (2024). DOI: 10.1016/j.pmedr.2024.102607
9. Hafizoglu M., Eren F., Neşelioğlu S., Şahiner Z., Karaduman D., Atbaş C., Dikmeer A., İleri İ., Balci C., Doğu B. B., Cankurtaran M., Erel Ö., and Halil M. G. Physical frailty is related to oxidative stress through thiol/disulfide homeostasis parameters. *Eur. Geriatr. Med.*, **15** (2), 423 (2024). DOI: 10.1007/s41999-023-00911-w
10. Korkmaz Ş. A., Kaymak S. U., Neşelioğlu S., and Erel Ö. Thiol-disulphide homeostasis in patients with schizophrenia: The potential biomarkers of oxidative stress in acute exacerbation of schizophrenia. *Clin. Psychopharmacol. Neurosci.*, **22** (1), 139 (2024). DOI: 10.9758/cpn.23.1084
11. Desideri E., Ciccarone F., and Ciriolo M. R. Targeting glutathione metabolism: Partner in crime in anticancer therapy. *Nutrients*, **11**, 1926 (2019). DOI: 10.3390/nu11081926
12. Nitti M., Marengo B., Furfaro A. L., Pronzato M. A., Marinari U. M., Domenicotti C., and Traverso N. Hormesis and oxidative distress: Pathophysiology of reactive oxygen species and the open question of antioxidant modulation and supplementation. *Antioxidants (Basel)*, **11** (8), 1613 (2022). DOI: 10.3390/antiox11081613
13. Halliwell B. Reactive Species and Antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.*, **141** (2), 312–322 (2006). DOI: 10.1104/pp.106.077073
14. Musaogullari A. and Yuh-Cherng Ch. Redox regulation by protein S-glutathionylation: From molecular mechanisms to implications in health and disease. *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 8113 (2020). DOI: 10.3390/ijms21218113
15. Lu S. C. Glutathione synthesis. *Biochim. Biophys. Acta*, **1830**, 3143 (2013). DOI: 10.1016/j.bbagen.2012.09.008
16. Vivancos P. D., Wolff T., Markovic J., Pollardó F. V., and Foyer C. H. A nuclear glutathione cycle within the cell cycle. *Biochem J.*, **431**, 169 (2010). DOI: 10.1042/BJ20100409
17. Corso C. R. and Acco A. Glutathione system in animal model of solid tumors: From regulation to therapeutic target. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **128**, 43 (2018).
18. Liguori I., Russo G., Curcio F., Bulli G., Aran L., Della-Morte D., Gargiulo G., Testa G., Cacciatore F., Bonaduro

- ce D., and Abete P. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin. Interv. Aging*, **13**, 757 (2018).
19. Buşu C., Li W., Caldito G., and Yee T. An inhibition of glutathione synthesis in brain endothelial cells lengthens S-phase transit time in the cell cycle: Implications for proliferation in recovery from oxidative stress and endothelial cell damage. *Redox Biol.*, **1** (1), 131–139 (2013). DOI: 10.1016/j.redox.2013.01.003
20. Yamashita R., Komaki Y., Yang G., and Ibuki Y. Cell line-dependent difference in glutathione levels affects the cigarette sidestream smoke-induced inhibition of nucleotide excision repair. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.*, **858–860**, 503273 (2020). DOI: 10.1016/j.mrgentox.2020.503273
21. Emre S., Demirseren D. D., Alisik M., Aktas A., Neselioglu S., and Erel O. Dynamic thiol/disulfide homeostasis and effects of smoking on homeostasis parameters in patients with psoriasis. *Cutan. Ocul. Toxicol.*, **36** (4), 393 (2017). DOI: 10.1080/15569527.2017.1311339
22. Erel Ö. and Erdoğan S. Thiol-disulfide homeostasis: an integrated approach with biochemical and clinical aspects. *Turk. J. Med. Sci.*, **50** (10), Article 17 (2020). DOI: 10.3906/sag-2003-64
23. Calaf G. M., Urzua U., Termini L., and Aguayo F. Oxidative stress in female cancers. *Oncotarget*, **9** (34), 23824–23842 (2018). DOI: 10.18632/oncotarget.25323
24. Kalinina E. V., Gavriluk L. A., and Pokrovsky V. S. Oxidative Stress and Redox-Dependent Signaling in Prostate Cancer. *Biochemistry (Moscow)*, **87** (5), 413 (2022). DOI: 10.1134/S0006297922050030
25. Kyoizumi S., Akiyama M., Hirai Y., Kusunoki Y., Tanabe K., and Umeki S. Spontaneous loss and alteration of antigen receptor expression in mature CD4⁺ T cells. *J. Exp. Med.*, **171** (6), 1981 (1990).
26. Замулаева И. А., Саенко А. С., Орлова Н. В. и Смирнова С. Г. Патент на изобретение «Способ определения частоты мутантных по Т-клеточному рецептору лимфоцитов периферической крови человека» № 2316766 (Россия), приоритет от 30 мая 2006 г., зарегистрирован 10 февраля 2008 г.
27. McNeil T. L. and Beck L. Y. Fluorometric estimation of GSH-OPT. *Anal. Biochem.*, **22**, 431 (1968).
28. Ivanenko G. F. and Burlakova E. B. Relationships between a thiol-disulfide system and liposoluble antioxidants with cytogenetic indices in humans exposed to low doses radiation. *Engineering*, **5** (10B), 62–67 (2013). DOI: 10.4236/eng.2013.510B013
29. Орлова Н. В., Иваненко Г. Ф., Смирнова С. Г., Максюттов М. А. и Замулаева И. А. Частота TCR-мутантных лимфоцитов и состояние тиолдисульфидной системы у работников атомной промышленности. *Радиация и риск*, **29** (1), 57 (2020). DOI: 10.21870/0131-3878-2020-29-1-57-67
30. Kennedy L., Sandhu J. K., Harper M. E., and Cuperlovic-Culf M. Role of glutathione in cancer: From mechanisms to therapies. *Biomolecules*, **10** (10), 1429 (2020). DOI: 10.3390/biom10101429
31. Marengo B., Nitti M., Furfaro A. L., Colla R., Ciucis C. D., Marinari U. M., Pronzato M. A., Traverso N., and Domenicotti C. Redox Homeostasis and cellular antioxidant systems: Crucial players in cancer growth and therapy. *Oxid. Med. Cell Longev.*, **623**, 5641 (2016). DOI: 10.1155/2016/6235641
32. Kirtonia A., Sethi G., and Garg M. The multifaceted role of reactive oxygen species in tumorigenesis. *Cell. Mol. Life Sci.*, **77** (22), 4459 (2020). DOI: 10.1007/s00018-020-03536-5
33. Borrego S., Vazquez A., Dasí F., Cerdá C., Iradi A., Tormos C., Sánche J. M., Bagán L., Boix J., Zaragoza C., Camps J., and Sáez G. Oxidative stress and DNA damage in human gastric carcinoma: 8-Oxo-7'-8'-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxo-dG) as a possible tumor marker. *Int. J. Mol. Sci.*, **14** (2), 3467 (2013). DOI: 10.3390/ijms14023467
34. Замулаева И. А., Смирнова С. Г., Орлова Н. В., Богатырева Т. И., Павлов В. В., Терехова А. Ю., Макаренко С. А. и Саенко А. С. Анализ частоты TCR-мутантных лимфоцитов у онкологических больных до и после химиолучевого лечения. *Радиация и риск*, **20** (1), 8 (2011).
35. Замулаева И. А. Закономерности соматического мутагенеза на геномном уровне после радиационного воздействия в дозах до 200 мЗв на организм человека. В кн. *Избранные лекции*, под ред. А.Д. Каприна и С.А. Иванова (МРНЦ им. А.Ф. Цыба, Обнинск, 2022), сс. 199–203.
36. Иванов В. К., Кашеев В. В., Замулаева И. А., Саенко А. С., Чекин С. Ю., Максюттов М. А., Туманов К. А., Смирнова С. Г. и Орлова Н. В. Патент на изобретение «Способ формирования группы радиологического риска» № 2492480 (Россия), приоритет от 05 июля 2012 г., зарегистрировано 10 сентября 2013 г.
37. Bonassi S., Norppa H., Ceppi M., Strömberg U., Vermeulen R., Znaor A., Cebulski-Wasilewska A., Fabianova E., Fucic A., Gundy S., Hansteen I. L., Knudsen L. E., Lazutka J., Rossner P., Sram R. J., and Boffetta P. Chromosomal aberration frequency in lymphocytes predicts the risk of cancer: results from a pooled cohort study of 22358 subjects in 11 countries. *Carcinogenesis*, **29** (6), 1178 (2008). DOI: 10.1093/carcin/bgn075
38. Cole J. and Scopek T. R. International commission for protection against environmental mutagens and carcinogens. Working paper no. 3. Somatic mutant frequency, mutation rates and mutational spectra in the human population *in vivo*. *Mutat. Res.*, **304** (1), 33 (1994). DOI: 10.1016/0027-5107(94)90320-4
39. DeMarini D. M. Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate: A review. *Mutat. Res.*, **567** (2–3), 447 (2004). DOI: 10.1016/j.mrrev.2004.02.001
40. Al-Obaide M. A. I., Ibrahim B. A., Al-Humaish S., and Abdel-Salam A. G. Genomic and bioinformatics approaches for analysis of genes associated with cancer risks following exposure to tobacco smoking. *Front. Publ. Health*, **6**, 84 (2018). DOI: 10.3389/fpubh.2018.00084
41. Kuśnierczyk P. Genetic differences between smokers and never-smokers with lung cancer. *Front. Immunol.*, **14**, 1063716 (2023). DOI: 10.3389/fimmu.2023.1063716
42. Курбанов И. С., Алиев Д. И. и Ванин А. Ф. Содержание окиси азота в табачном дыме. *Журн. физ. химии*, **62** (4), 1123 (1988).

Influence of Smoking on the State of the Thiol-Disulphide System in Blood Plasma and the Frequency of TCR-Mutant Lymphocytes in Healthy Individuals and Cancer Patients

G.F. Ivanenko* and I.A. Zamulaeva, *****

**N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119334 Russia*

***A. Tsyb Medical Radiological Research Center—Branch of the National Medical Research Center of Radiology of the Ministry of Health of Russia, ul. Marshala Zhukova 10, Obninsk, Kaluga Region, 249031 Russia*

****Joint Institute for Nuclear Research, ul. Joliot-Curie 6, Dubna, Moscow Region, 141980 Russia*

A comparative study of indicators of somatic mutagenesis and the thiol-disulfide system in the peripheral blood of cancer patients before treatment and healthy individuals with different smoking status ($n = 95$) was carried out. All studied parameters including the content of reduced (GSH), oxidized (GSSG) glutathione and their ratio (GSH/GSSG), the frequency of lymphocytes with mutations at T-cell receptor (TCR) locus were found to be significantly increased by 1.5–2.7 times in the general group of patients as compared to those in the general group of healthy individuals ($p < 0.01$ in all cases). After smoking cessation, a decrease in the frequency of mutant cells and the ratio of reduced and oxidized glutathione was observed in patients ($p < 0.05$). At the individual level, strong correlations were found between the frequency of TCR-mutant cells and the content of GSH and GSSG only in the subgroup of smoking patients with a high level of mutagenesis. Thus, the correlation coefficient between the frequency of TCR-mutant lymphocytes and the GSH content in this subgroup was 0.82 ($p < 0.001$), for GSSG — $r = 0.68$ ($p < 0.01$). The results obtained indicate the contribution of the thiol disulfide system to the formation of a high frequency of gene mutations in a part of smokers with cancer.

Keywords: smoking, cancer patients, reduced and oxidized glutathione, frequency of TCR-mutant lymphocytes, blood plasma