

## СЕРУМНАТА АДЕНОЗИН ДЕАМИНАЗА КАТО ПОТЕНЦИАЛЕН БИОМАРКЕР ЗА ПРОГРЕСИЯТА НА КОЛОРЕКТАЛЕН КАРЦИНОМ И РАК НА ГЪРДАТА

Марияна Йорданова<sup>1</sup>, Даниела Герова<sup>2</sup>, Бистра Галунска<sup>3</sup>, Милена Василева<sup>1</sup>,  
Ширин Маринова<sup>1</sup>, Симона Стоянова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Бургаски държавен университет „Проф. д-р Асен Златаров“, бул. „Проф. Якимов“ 1, Бургас 8010, България

<sup>2</sup> Медицински университет "Проф. д-р Параскев Стоянов" Варна, Факултет по медицина, Център Приморски, бул. „Цар Освободител“ 84, Варна 9002

<sup>3</sup> Медицински университет "Проф. д-р Параскев Стоянов" Варна, Факултет по фармация, Център Приморски, бул. „Цар Освободител“ 84, Варна 9002

**Резюме: Въведение:** Аденозин деаминазата (ADA) е ключов ензим в пуриновия метаболитен път. Възпалителни и неопластични състояния водят до натрупване на извънклетъчен аденозин, който вероятно потиска противотуморната имунна реакция и насърчават туморния растеж. **Цел:** Да се установят нивата на АДА при пациенти с метастатичен рак на гърдата (MBRC) и колоректален карцином (MCRC) спрямо пациенти със стабилно заболяване със същите туморни процеси. **Материал и метод:** В проучването са включени 95 пациенти с BRC (45) и CRC (50). Пациентите са диагностицирани и лекувани в КОЦ–Бургас. TNM класификация, стадий, предходна терапия, последен PET-CT за оценка на метастази, динамика на туморните маркери са извлечени от медицинска документация. Изследването на серумната активност на ензима АДА се осъществява посредством тест на Diazyme Laboratories, USA) с биохимичен анализатор Mindray BS220E. Извършен е стандартен статистически анализ. **Резултати:** Пациентите са разделени на група G2 с активна болест и метастази (III-IV клиничен стадий) и G1 със стабилна болест без прогресия (II стадий). Стойностите на АДА в G2 групата ( $15,7 \pm 7,08 \text{ U/L}$ ) бяха значително по-високи ( $p=0,0018$ ) в сравнение с тези в G1 групата ( $8,5 \pm 1,51 \text{ U/L}$ ). Стойностите на АДА са най-високи при пациенти с чернодробни метастази ( $21,0 \pm 7,2 \text{ U/L}$ ) спрямо тези с метастази в кости или лимфни възли (съответно  $10,86 \pm 3,43$  и  $11,62 \pm 2,62$ ,  $p=0,0002$ ). Наблюдава се значителна положителна корелация между активността на АДА и стадия на тумора ( $r=0,633$ ;  $p<0,0001$ ). Серумните нива на CEA, Ca19-9 и CA15-3 също бяха значително по-високи в G2 в сравнение с тези в G1, но не беше открита корелация с АДА. **Заключение:** Серумната АДА активност може да бъде полезен биомаркер за наблюдение на прогресията на рака на гърдата и колоректалния рак.

**Ключови думи:** АДА, рак на гърдата, колоректален карцином, метастатичен карцином.

## SERUM ADENOSINE DEAMINASE AS A POTENTIAL BIOMARKER FOR THE PROGRESSION OF COLORECTAL CARCINOMA AND BREAST CANCER

Yordanova M.<sup>1</sup>, Gerova D.<sup>2</sup>, Galunska B.<sup>3</sup>, Vasileva M.<sup>1</sup>, Marinova Sh.<sup>1</sup>, Stoyanova S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>BDU "Prof. Asen Zlatarov", Faculty of Medicine

<sup>2</sup>MU- Varna, Faculty of Medicine

<sup>3</sup>MU- Varna, Faculty of Pharmacy

**Abstract: Introduction:** Adenosine deaminase (ADA) is a key enzyme in the purine metabolic pathway. Inflammatory and neoplastic conditions lead to the accumulation of extracellular adenosine, which probably suppresses the antitumor immune response and promotes growth. **Objective:** To determine the levels of ADA in patients with metastatic breast cancer (MBRC) and

colorectal carcinoma (MCRC) compared to patients with stable disease with the same tumor processes. **Material and method:** The study included 95 patients with BRC (45) and CRC (50). The patients were diagnosed and treated at the Burgas Cancer Centre. TNM classification, stage, previous therapy, last PET-CT for assessment of metastases, dynamics of tumor markers were extracted from medical records. The study of serum ADA enzyme activity was performed using a test from Diazyme Laboratories, USA) with a biochemical analyzer Mindray BS220E. Standard statistical analysis was performed. **Results:** Patients were divided into group G2 with active disease and metastases (clinical stage III-IV) and G1 with stable disease without progression (stage II). ADA values in the G2 group ( $15.7 \pm 7.08 \text{ U/L}$ ) were significantly higher ( $p=0.0018$ ) compared to those in the G1 group ( $8.5 \pm 1.51 \text{ U/L}$ ). ADA values were highest in patients with liver metastases ( $21.0 \pm 7.2 \text{ U/L}$ ) compared to those with bone or lymph node metastases ( $10.86 \pm 3.43$  and  $11.62 \pm 2.62$ ,  $p=0.0002$ , respectively). A significant positive correlation was observed between ADA activity and tumor stage ( $r=0.633$ ;  $p<0.0001$ ). Serum levels of CEA, Ca19-9, and CA15-3 were also significantly higher in G2 than in G1, but no correlation with ADA was observed. **Conclusion:** Serum ADA activity may be a useful biomarker for monitoring the progression of breast and colorectal cancer.

**Keywords:** ADA, breast cancer, colorectal carcinoma, metastatic carcinoma.

**Въведение:** В съвременната онко-имунология хипоксичната туморна микросреда (ТМЕ) се възприема като ключов регулатор на противотуморния имунен отговор. За да метастазира, туморната клетка трябва да преодолее имунния надзор. В условия на нискокислородна среда, в тумора, масово се освобождава АТФ вследствие на клетъчна смърт и некроза. [1]. Включват се редица адаптивни механизми и метаболитно препрограмиране с ацидоза, в резултат на преминаване на туморните клетки към анаеробна гликолиза. В тази среда на устойчиво хронично възпаление, пуриновият нуклеозид аденозин играе централна роля. Той представлява мощна имunosупресивна молекула, чиято концентрация рязко нараства в зони на тъканно увреждане, възпаление и хипоксия. [2], [3]. Аденозинът упражнява ефектите си главно чрез свързване с рецепторите А2А и А2В върху имунните клетки. Активацията на А2А рецепторите има мощни ефекти като намалява пролиферацията на цитотоксичните Т-клетки и производството на цитокини (като IL-2 и IFN- $\gamma$ ), Т-хелперите и дезактивира НК-клетките. [3]. От друга страна стимулира диференциацията и супресивната функция на Т-регулаторните клетки и поляризацията на макрофагите към М2 фенотип, който насърчава ангиогенезата, метастазирането и потискане на имунитета [2, 4]. Затова ролята на аденозин деаминазата (ADA) е фундаментална: тя е ключовият ензим, който катализира необратимата деаминация на аденозин до инозин, като по този начин дезактивира имunosупресивните сигнали на аденозина. Следователно, балансът между производството на аденозин и неговата деградация от ADA диктува имунния тонус в ТМЕ и определя туморната прогресия и метастазиране [1]. Разделянето на ADA на два основни изоензима, ADA1 и ADA2, допълнително усложнява и обогатява тази картина, като всеки от тях играе различни роли в модулацията на имунния отговор.

ADA1 е повсеместен вътреклетъчен ензим, високо експресиран в лимфоидните тъкани който осигурява около 90% от цялата ADA активност. Нейната основна физиологична роля е да предотврати натрупването на токсични метаболити на аденозин (като дезоксиаденозин), които инхибират рибонуклеотидна редуктаза и водят до апоптоза на Т-лимфоцитите. В контекста на туморния имунитет, ADA1, чрез регулирането на нивата на аденозин, индиректно влияе на туморната среда, чрез имunosупресивния аденозин, с което се насърчава туморния растеж [5], [6]. За разлика от ADA1, ADA2 е основно вътреклетъчен ензим, секретирани от моноцити и макрофаги. Тя е доминиращата изоформа в серума (при липса на лимфопролиферативни заболявания) и работи добре в слаба киселинна среда, например, при хипоксични условия [7]. Нейната експресия рязко нараства при алтернативната активация на макрофагите (М2 фенотип), които са про-туморни, потенцира ангиогенезата [8] и потиска имунитета. [9]. Докато ADA1 е критична за адаптивния

имунитет, ADA2 изглежда играе по-голяма роля във вродения имунитет и модулацията на възпалителния отговор. Увеличената експресията и секрецията на ADA в ТМЕ е като "очистител" на аденозина и опит на организма да противодейства на супресивната среда. Нивата на ензима и по-специално съотношението ADA1/ADA2, отразяват интензивността на метаболитната и имунната борба в ТМЕ. Създава се устойчиво хронично възпаление и имunosупресия, които подпомагат оцеляването на тумора, растежа и метастазирането [8], [10]. Не напразно туморното възпаление се определя като огън, който гори, но не унищожава. Така идва логичен въпрос относно използването на ензима като маркер за оценка процесите в ТМЕ, за да предвидим и поведението на тумора?

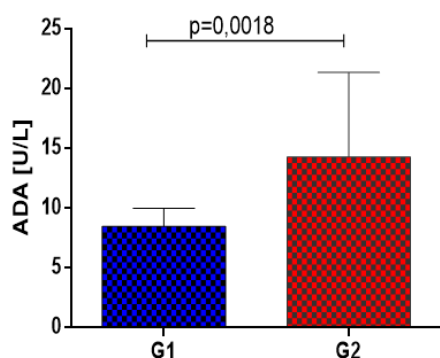
**Цел:** Да се установят нивата на АДА при пациенти с метастатичен рак на гърдата (МВРС) и колоректален карцином (MCRC) спрямо пациенти със стабилно заболяване със същите туморни процеси.

**Материал и методи:** В проучването са включени 95 пациенти (56 жени и 39 мъже) с МВРС (45 души) и MCRC (50 души). Пациентите са разделени на две според клиничния стадий: наличието на активно заболяване с метастази (G2) и стабилна болест без усложнения (G1). Включените в проучването лица са диагностицирани и лекувани в Комплексен онкологичен център–Бургас от 01.2024 до 01.2025 г. TNM класификация, стадий, предходна терапия, последен PET-CT за оценка на метастази, динамика на туморните маркери са извлечени от медицинска документация. Изследването на серумната активност на ензима АДА се осъществява посредством тест на Diazyme Laboratories, USA) с биохимичен анализатор Mindray BS220E. Извършен е стандартен статистически анализ.  $P < 0.05$  се счита за статистически значимо.

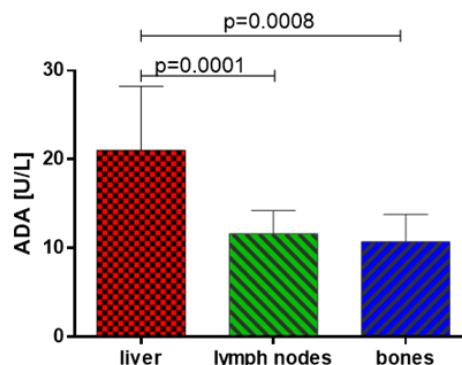
## Резултати:

Табл.1. Възрастово представяне на двете групи и стойности на ензима АДА в двете групи

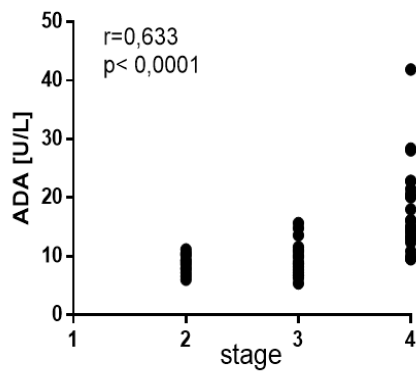
Patients	G1 (stable disease)	G2 (stages III and IV)
n	25	70
age	64.17±11.74	66±12.37
ADA	8.5±1.51U/L	15.7±7.08 U/L



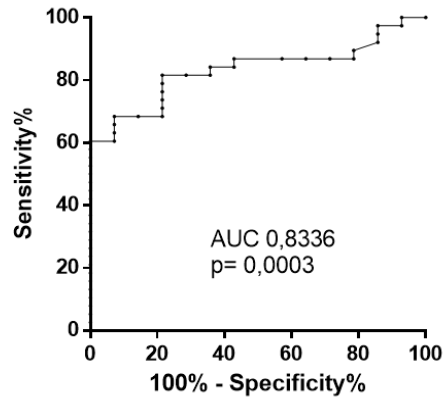
Фиг. 1. Сравнителен анализ на стойностите на АДА в G1 и G2



Фиг. 3. Стойности на АДА според локализацията на метастазите в група G2



Фиг. 2. Корелация между стойностите на ADA и стадия на заболяването



Фиг. 4. ROC крива на потенциала на ADA да дискриминира различна активност на заболяването

Табл.2. Стойности на туморните маркери в двете групи

Tumor marker	G1 IQR	G2 IQR	p
CEA	2.3÷8.958 ng/mL	10.6÷270.8 ng/mL	p=0.0186
CA 19-9	10.53÷18.03 U/mL	68.7÷186,7 U/mL	p=0.0023
CA 15-3	13.43÷24.42 U/mL	39.92÷86 U/mL	p=0.0206

**Дискусия:** Настоящото изследване предоставя убедителни доказателства, че повишените нива на АДА в серума са тясно свързани с агресивна болест и лоша прогноза при пациенти с MBRC и MCRC. Нашите резултати недвусмислено демонстрират статистически значимо по-високи нива на АДА при пациенти с активна метастатична болест в сравнение с тези със стабилно заболяване ( $p=0.0018$ ), което позиционира АДА като чувствителен маркер за болестна активност. Тези открития са в съгласие с нарастващия брой литературни данни, които разглеждат АДА не просто като маркер на възпаление, а като ключов медиатор на имunosupресивната и хипоксична туморна микросреда [10] [11].

Традиционно ензима се свързва с Т-клетъчна активация при локални възпалителни процеси, но в туморната микросреда АДА придобива парадоксална и зловеща роля. Аденозинът, който се натрупва в хипоксичните зони на тумора е мощен имunosupресивен агент [12]. Нашите данни, показващи висока корелационна зависимост между стойностите на АДА и напредналия стадий на заболяването ( $p=0.633$ ), подкрепят хипотезата, че нарастването на АДА е пряко свързано с туморната маса и метастатичното натоваарване. Следователно, високата активност на АДА не отразява ефективен имуноен отговор, а по-скоро активен метаболитен път, който поддържа високи нива на имunosupресивен аденозин, създавайки „имунологично привилегирована“ ниша за тумора [13].

Важно наблюдение е значителното повишаване на серумната АДА при пациенти с чернодробни метастази, което надминава стойностите, наблюдавани при метастази в лимфни възли и кости, като разликата е статистически значима ( $p=0.0001$ ;  $p=0.0008$ ). Този факт е от ключово значение и представлява важно клинично-патофизиологично явление. Чернодробната тъкан е орган с интензивен метаболизъм и относителна хипоксия, особено в условията на метастатично натоваарване. Нивата на АДА показват най-тясна връзка именно с висцералната, чернодробната, метастатична болест при колоректален карцином – фактор, добре известен с лоша прогноза [12]. Измерването на нивата на АДА, често заедно с други маркери като карциноембрионен антиген (СЕА), може да бъде полезен инструмент за скрининг за потенциални чернодробни метастази, оценка на стадия на заболяването и определяне на прогнозата.

Трябва да се отбележи, че има научни данни, относно активността на ADA (ADA1 и ADA2), които са значимо по-високи при пациентки с метастази в сравнение с неметастатни пациентки с рак на гърдата, като те корелират с установени прогностични фактори като негативен рецептор за естроген (ER-) и висок пролиферативен индекс (Ki-67) [13] [14] [15].

Високата диагностична надеждност на серумната АДА, демонстрирана чрез ROC-анализ (AUC = 0.834, p=0.0003), с оптимална дискриминантна стойност от 15.9 U/L (референтни граници на използвания кит 0-15 U/L) за разграничаване на активна болест, я превръща в мощен неинвазивен диагностичен инструмент. В нашата кохорта, АДА се проявява като независим прогностичен фактор, който е по-силно свързан с активността на метастатичния процес (наличието и локализацията на метастазите), отколкото само с характеристиките на първичния тумор.

Изследвани бяха туморните маркери, използвани в онкологичната практика за мониториране на съответните карциноми и в двете групи (СЕА, Са19-9 -маркери на колоректален карцином и СА15-3 маркер за рак на гърдата). Независимо, че се наблюдава статистически значимото им повишение в G2 групата спрямо G1, корелационна връзка между тях и стойностите на АДА не се откриват. Вероятно това е в резултат, че тези показатели се произвеждат от различни типове клетки, в отговор на различни патологични процеси (възпаление vs. неоплазия). АДА е ензим, чиито нива отразяват текущата **активност на възпалителния процес**, докато туморните маркери имат продължителен полуживот и отразяват **натрупана туморна маса или метастатично натоварване**, което води до разминаване във времето на промените в нивата им.

Ограничението на това проучване е неговата ретроспективна природа. Въпреки това, строгата статистическа значимост на получените резултати (p=0.0018 за активна болест, AUC=0.834) и установената дискриминантна стойност от 15.9 U/L предоставят солидна основа за бъдещи проспективни валидационни изследвания. Мониторирането на серумната АДА по време на лечение би могло да служи като лесен и икономичен маркер за ефективността на терапията и за ранна детекция на прогресия, особено при пациенти с чернодробни метастази. Определянето на изоензимите и тяхното съотношение би дало повече информация и оценка на исхемично-супресивната ТМЕ, поведението на тумора и прогресията му.

### **Заклучение**

В заключение, повишените нива на аденозин дезаминаза (АДА) се явяват надежден серологичен индикатор за активна метастатична болест и по-лоша прогноза при карцином на гърдата и колоректален карцином. Нашите изследвания установиха, че АДА е особено висока при наличието на чернодробни метастази и демонстрираха отлична диагностична надеждност. АДА като критичен регулатор на имunosупресивния аденозинов товар в туморната среда, особено с метастази, в комбинация с установени маркери (СЕА, СА 15-3) би могло значително да подобри стратификацията на риска и мониторинга на отговора на терапията.

### **Библиография**

1. Xing, J.; Zhang, J.; Wang, J. (2023), The Immune Regulatory Role of Adenosine in the Tumor Microenvironment. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 14928. <https://doi.org/10.3390/ijms241914928>
2. Yang et al., (2024) Adenosine signaling in tumor associated macrophages, *Cancer Biol Med* 2024. doi: 10.20892/j.issn.2095-3941.2024.0228
3. Ohta, A. (2016). A metabolic immune checkpoint: adenosine in tumor microenvironment. *Frontiers in Immunology*, 7, 109.
4. Caorsi R., Penco F., Schena F., Gattorno M. Monogenic Polyarteritis: The Lesson of ADA2 Deficiency. *Pediatr. Rheumatol.* 2016;14:51. doi: 10.1186/s12969-016-0111-7. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]

5. Blackburn, M. R., & Kellems, R. E. (2005). Adenosine deaminase deficiency: metabolic basis of immune deficiency and pulmonary inflammation. *Advances in Immunology*, 86, 1–41. .
6. Antonioli L, Blandizzi C, Pacher P, Haskó G. Immunity, inflammation and cancer: a leading role for adenosine. *Nat Rev Cancer*. 2013 Dec;13(12):842-57. doi: 10.1038/nrc3613. Epub 2013 Nov 14. PMID: 24226193..
7. Zavialov A.V., Yu X., Spillmann D., Lauvau G., Zavialov A.V. Structural Basis for the Growth Factor Activity of Human Adenosine Deaminase ADA2. *J. Biol. Chem*. 2010;285:12367–12377. doi: 10.1074/jbc.M109.083527. [[DOI](#)] [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
8. Zavialov A.V., Engström Å. Human ADA2 Belongs to a New Family of Growth Factors with Adenosine Deaminase Activity. *Biochem. J*. 2005;391:51–57. doi: 10.1042/BJ20050683. [[DOI](#)] [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
9. Zhou Q., Yang D., Ombrello A.K., Zavialov A.V., Toro C., Zavialov A.V., Stone D.L., Chae J.J., Rosenzweig S.D., Bishop K., et al. Early-Onset Stroke and Vasculopathy Associated with Mutations in ADA2. *N. Engl. J. Med*. 2014;370:911–920. doi: 10.1056/NEJMoa1307361. [[DOI](#)] [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
10. Zhulai G, Oleinik E, Shibaev M, Ignatev K. Adenosine-Metabolizing Enzymes, Adenosine Kinase and Adenosine Deaminase, in Cancer. *Biomolecules*. 2022 Mar 8;12(3):418. doi: 10.3390/biom12030418. PMID: 35327609; PMCID: PMC8946555.
11. Zavialov A.V., Gracia E., Glaichenhaus N., Franco R., Zavialov A.V., Lauvau G. Human Adenosine Deaminase 2 Induces Differentiation of Monocytes into Macrophages and Stimulates Proliferation of T Helper Cells and Macrophages. *J. Leukoc. Biol*. 2010;88:279–290. doi: 10.1189/jlb.1109764. [[DOI](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
12. Vannoni D., Bernini A., Carlucci F., Civitelli S., Di Pietro M.C., Leoncini R., Rosi F., Tabucchi A., Tanzini G., Marinello E. Enzyme Activities Controlling Adenosine Levels in Normal and Neoplastic Tissues. *Med. Oncol*. 2004;21:187–196. doi: 10.1385/MO:21:2:187. [[DOI](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
13. Faisal A., Taha M. Serum Adenosine Deaminase Activity in Iraqi Patients with Breast Cancer on Tamoxifen Therapy. *Gaziantep Med. J*. 2012;18:139. doi: 10.5455/GMJ-30-2012-96.
14. Aghaei M., Karami-Tehrani F., Salami S., Atri M. Diagnostic Value of Adenosine Deaminase Activity in Benign and Malignant Breast Tumors. *Arch. Med. Res*. 2010;41:14–18. doi: 10.1016/j.arcmed.2009.10.012. [[DOI](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
15. Kutryb-Zajac B., Harasim G., Jedrzejewska A., Krol O., Braczko A., Jablonska P., Mierzejewska P., Zielinski J., Slominska E.M., Smolenski R.T. Macrophage-Derived Adenosine Deaminase 2 Correlates with M2 Macrophage Phenotype in Triple Negative Breast Cancer. *Int. J. Mol. Sci*. 2021;22:3764. doi: 10.3390/ijms22073764. [[DOI](#)] [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]