

О.П. Шатова<sup>1</sup>, Е.В. Хомутов<sup>1</sup>, М.А. Сташкевич<sup>2</sup>, И.И. Зинкович<sup>1</sup>

### Участие лактата в «парадоксе Хелстрема»

<sup>1</sup>Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького,

<sup>2</sup>Национальный медицинский университет им. А.А. Богомольца, г. Киев

**Ключевые слова:** лактат, аденозин, рак молочной железы, «парадокс Хелстрема».

Показано, что лактат натрия дозозависимо увеличивает активность АДА в эритроцитах здоровых женщин и больных раком молочной железы. Максимальный стимулирующий эффект отмечен при конечной концентрации лактата 20 мМ. АДА из эритроцитов больных РМЖ менее чувствительна к влиянию лактата, чем АДА из эритроцитов здоровых. Увеличение концентрации лактата при опухолевом росте может носить защитный механизм, который определяет активность АДА и, соответственно, иммунологический надзор.

### Участь лактату у «парадоксі Хелстрема»

О.П. Шатова, Е.В. Хомутов, М.А. Сташкевич, І.І. Зинкович

Показано, що лактат натрію дозозалежно збільшує активність АДА в еритроцитах здорових жінок і хворих раком молочної залози. Максимальний стимулюючий ефект відзначено при кінцевій концентрації лактату 20 мМ. АДА з еритроцитів хворих на РМЖ менш чутлива до впливу лактату, ніж АДА з еритроцитів здорових. Збільшення концентрації лактату при пухлинному зростанні може мати захисний механізм, що визначає активність АДА і, відповідно, імунологічний нагляд.

**Ключові слова:** лактат, аденозин, рак молочної залози, «парадокс Хелстрема».

**Патологія.** – 2011. – Т.8, №2. – С. 73–75

### Involvement of lactate in «Hellstrom paradox»

O.P. Shatova, E.V. Khomutov, M.A. Stashkevych, I.I. Zyncovich

It was revealed, that the sodium lactate increases activity of ADA in the erythrocytes of healthy women and in patients with the breast cancer by dose-dependent manner. Maximal stimulating effect is noted during the eventual concentration of lactate - 20 mM. ADA from the erythrocytes of BC patients is less sensible to influence of lactate, than ADA from the erythrocytes of healthy persons. Increase of lactate concentration upon tumour growth can have a nocifensor which determines activity of ADA and accordingly immunological supervision.

**Key words:** lactate, adenosine, breast cancer; «Hellstrom paradox».

**Pathologia.** 2011; 8(2): 73–75

Аденозин – это пуриновый нуклеозид, который образуется внутриклеточно в результате дефосфорилирования АМФ и при гидролизе S-аденозилгомоцистеина [1]. Дальнейшее превращение аденозина происходит гидролитическим путем с помощью фермента аденозиндезаминазы (АДА). Продуктами данной реакции является инозин и аммиак. Характерной чертой злокачественного роста является увеличение активности АДА в опухолевом узле [2,11].

Внутриклеточный аденозин поступает в интерстициальную ткань с помощью специфических транспортных систем. Существуют равновесные и концентрирующие белки транспортеры для аденозина – это семейство SLC29 белков. Равновесные транспортеры осуществляют прямой и обратный транспорт по градиенту концентрации, а концентрирующие транспортеры участвуют в активном переносе аденозина в клетку, используя градиент ионов натрия [3]. Транспорт аденозина из клетки усиливается в условиях ацидоза, что может быть обусловлено избытком лактата [4].

Аденозин является сигнальной молекулой [5]. Передача клеточных сигналов аденозина происходит через 4 типа аденозиновых рецепторов: А1, А2А, А2В, и А3. Рецепторы А2А и А2В сопряжены с Gs протеином, что приводит к стимуляции аденилатциклазы, а рецепторы А1 и А3 сопряжены с Gi протеином, который подавляет аденилатциклазную активность [6]. В любом случае аде-

нозин изменяет концентрацию цАМФ внутри клетки.

При опухолевом росте наблюдается аденозинергическая иммуносупрессия или «парадокс Хелстрема». Показано, что гипоксия приводит к стабилизации гипоксия-индуцибельного фактора 1α (HIF-1α), а данный фактор, в свою очередь, модулирует синтез ферментов метаболизма аденозина: увеличивает экспрессию 5-нуклеотидазы и подавляет образование аденозинкиназы. Таким образом, HIF-1α регулирует концентрацию внутриклеточного и, соответственно, внеклеточного аденозина. При опухолевом росте высокие концентрации внеклеточного аденозина приводят к нарушению функциональной активности лимфоцитов. Известно, что и опухолевые, и Т-регуляторные (Т-супрессоры) клетки продуцируют аденозин во внеклеточную среду, где последний связывается с А2А-рецепторами противоопухолевых клеток (Т-киллеры), что приводит к увеличению в них цАМФ и снижению синтеза и секреции интерферона-γ [7]. Данные метаболические изменения приводят к нарушению иммунного ответа и опухолевой прогрессии [4].

Особенности метаболизма опухолевых клеток (чрезмерная экспрессия ферментов гликолиза, мембранных переносчиков глюкозы, активация путей синтеза лактата из глутамина и аланина), а также недостаточная микроциркуляция приводят к накоплению в опухолевой ткани лактата в высоких концентрациях. Исследования

показали прямую зависимость между содержанием лактата в опухоли и наличием метастазов и обратную – с выживаемостью пациентов и их устойчивостью к лучевой терапии [12].

Таким образом, в опухоли увеличена концентрация аденозина, активность АДА, а также уровень лактата, который может влиять на метаболизм данного нуклеотида. В современных научных обзорах лактат уже представляют как «новую сигнальную молекулу» [8], регулирующую не только активность некоторых ферментов, но и экспрессию генов, синтез некоторых цитокинов [9]. Следовательно, логично предположить, что молекула лактата способна оказывать выраженное влияние и на онкогенез [10] через модуляцию активности АДА.

### Цель работы

Установить влияние лактата на активность АДА.

### Материалы и методы исследования

Использовали гемоллизат эритроцитов здоровых (21 донор в возрасте 20–30 лет) и больных раком молочной железы женщин (10 пациенток в возрасте 23–73 лет, на различной стадии заболевания), к которому добавляли различные концентрации лактата натрия. Для исключения влияния рН на показатель активности фермента использовали раствор натриевой соли молочной кислоты, который, как известно, не оказывает влияния на уровень протонов и соответственно не изменяет рН.

Из 2 мл цельной гепаринизированной крови получали эритроцитарную массу. Эритроциты дважды отмывали в физиологическом растворе NaCl. Готовили суспензию эритроцитов в буферном растворе с рН 7,4. Затем делили суспензию на 7 исследуемых пробирок: первая пробирка была контрольной и не содержала добавок лактата натрия. Остальные шесть пробирок – опытные, отличались по концентрации добавок лактата: вторая с концентрацией 7,5 мМ, третья с концентрацией 10 мМ, четвертая с концентрацией 15 мМ, пятая с концентрацией 20 мМ, шестая с концентрацией 25 мМ и седьмая с концентрацией 30 мМ.

На всех этапах эксперимента контролировали рН.

Пробирки инкубировали в течение 60 мин при температуре 37°C с периодическим «мягким» помешиванием.

Перед определением активности АДА суспензию центрифугировали в течение 15 мин при 3000 об/мин, надосадочную жидкость удаляли, затем доводили до 5 мл дистиллированной водой и, таким образом, гемоллизировали эритроциты. Активность АДА определяли в гемоллизате эритроцитов.

Принцип метода определения активности АДА основан на изменении оптической плотности реакционной смеси при длине волны 248 нм, обусловленном накоплением продукта дезаминирования аденозина – инозина, которое регистрировали на спектрофотометре Spcord-200.

### Результаты и их обсуждение

В модельных экспериментах определяли активность АДА в гемоллизатах при добавлении различных концентраций лактата.

При добавлении к гемоллизатам эритроцитов здоровых женщин (норма) лактата в конечной концентрации 7,5 мМ активность АДА достоверно ( $p=0,001$ ) увеличивается (рис. 1, табл. 1). Дальнейшее увеличение концентрации лактата в инкубационной среде вплоть до 20 мМ сопровождается закономерным ростом показателя активности АДА. Значения активности АДА во всех точках шкалы концентраций (рис. 1) достоверно, при  $p<0,001$ , отличаются от предыдущих.

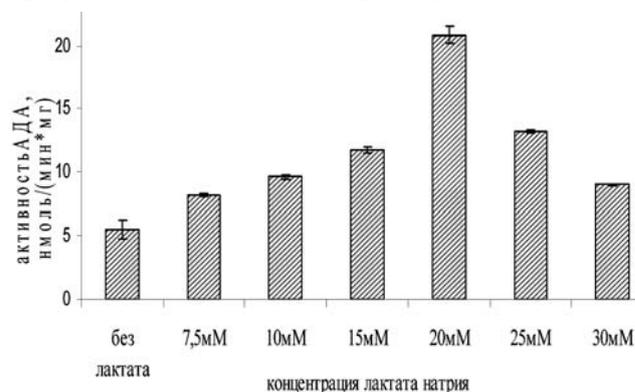


Рис. 1. Активность АДА в гемоллизате эритроцитов здоровых женщин при различных концентрациях лактата натрия.

Примечательно, что активность АДА имеет максимальные значения при концентрации лактата в инкубационной среде равной 20 мМ – показатель почти в 4 раза превышает соответствующий в пробе гемоллизата без добавок лактата.

При дальнейшем увеличении концентрации лактата натрия в гемоллизате до 30 мМ активность АДА снижается, по сравнению с пробой, где концентрация лактата составляет 20 мМ. Однако в 25 мМ растворе лактата натрия показатель активности фермента остается увеличенным в 2,4 раза, а в 30 мМ растворе лактата – в 1,6 раза, по сравнению с гемоллизатом, не содержащим добавки лактата.

Такие же закономерности влияния солей лактата на активность АДА эритроцитов, как и у здоровых людей, обнаружены и при работе с гемоллизатами эритроцитов больных раком молочной железы (табл. 1).

Таблица 1

### Активность АДА в гемоллизате эритроцитов в норме и у больных раком молочной железы при различных концентрациях лактата натрия (М±σ)

Концентрация лактата натрия, мМ	Норма	РМЖ	p*
без добавок лактата	7,33±0,43	5,50±1,84	0,020
7,5 мМ	8,74±0,39	8,19±0,27	0,006
10 мМ	9,58±1,49	9,61±0,41	0,956
15 мМ	16,05±0,71	11,76±0,36	0,0001
20 мМ	23,37±1,46	20,85±1,59	0,005
25 мМ	13,58±1,02	13,47±0,33	0,783
30 мМ	11,29±0,71	8,13±2,48	0,003

Примечание: \* – вероятность нулевой гипотезы для сравнения показателей в норме и у больных РМЖ.

В пробах без добавок лактата натрия активность исследуемого фермента нуклеотидного обмена выше у здоровых женщин. При добавлении различных концентраций лактата активность фермента остается выше у здоровых. При концентрации 15 мМ лактата в инкубационной среде АДА в эритроцитах здоровых женщин более чувствительна к стимулирующему влиянию лактата, чем в эритроцитах женщин, больных раком.

#### Выводы

Активность АДА в гемолизате эритроцитов существенно зависит от концентрации лактата. Рост уровня лактата от 7,5 мМ до 20 мМ сопровождается четырехкратным увеличением активности фермента. АДА из эритроцитов больных раком менее чувствительна к стимулирующему влиянию лактата при концентрации 15 мМ. Лактат увеличивает активность АДА, что определяет уровень аденозина и иммуносупрессию при опухолевом росте.

#### Литература

- Adenosine as a metabolic regulator of tissue function: production of adenosine by cytoplasmic 5'-nucleotidases / A. Borowiec, K. Lechward, K. Tkacz-Stachowska [et al.] // *Acta Biochimica Polonica* – 2006. – V. 53, №2. – P. 269–278.
- Шатова О.П. Лактатдегидрогеназная, аденозиндезаминазная и тимидинфосфорилазная активности крови и тканей при опухолях молочной железы / О.П. Шатова, Б.Г. Борзенко, И.И. Зинкович [и др.] // *Укр. біохм. журнал.* – 2009. – Т. 81, №4. – С. 88–93.
- Mammalian nucleoside transporters / W Kong, K. Engel, J. Wang // *Curr. Drug. Metab.* – 2004 – V. 5 (1). – P. 63–84.
- Sitkovsky M.V. Hypoxia-adenosine immunosuppression: tumor protection by T regulatory cells and cancerous tissue hypoxia / M.V. Sitkovsky, J. Kjaergaard, D. Lukashev [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 2008. – V. 14, №19. – P. 5947–5952.
- Görlach A. Control of adenosine transport by hypoxia / A. Görlach // *Circulation Research.* – 2005. – V. 97. – P. 1–3
- CF102 an A (3) adenosine receptor agonist mediates anti-tumor and antiinflammatory effects in the liver / S. Cohen, S. Stemer, G. Zozulya [et al.] // *J.Cell Physiol.* – 2011. – V. 226. – P. 2438–2447.
- Nowak M. The A2aR adenosine receptor controls cytokine production in iNKT cells / M. Nowak, L. Lynch, S. Yue, A. Ohta, M. Sitkovsky, S.P. Balk, M.A. Exley // *Eur. J. Immunol.* – 2010. – V. 40, №3. – P. 682–687.
- Philp A. Lactate-a signal coordinating cell and systemic function / A. Philp, A.L. Macdonald, P.W. Watt // *J. Exp. Biol.* – 2005. – V. 208, №Pt 24. – P. 4561–4575.
- Gladden L.B. Current trends in lactate metabolism: introduction / L.B. Gladden // *Med. Sci. Sports Exerc.* – 2008. – V. 40, №3. – P. 475–476.
- Garber K. Energy boost: the Warburg effect returns in a new theory of cancer K. Garber // *J. Natl. Cancer Inst.* – 2004. – V. 96, №24. – P. 1805–1806.
- Aghaei M. Adenosine deaminase activity in the serum and malignant tumors of breast cancer: the assessment of isoenzyme ADA1 and ADA2 activities / Aghaei M., Karami-Tehrani F., Salami S. [et al.] // *Clin. Biochem.* – 2005. – V. 38, №10. – P. 887–891.
- Mueller-Klieser W. Metabolic micromilieu in tumours / Mueller-Klieser W. // *Nuklearmedizin* – 2010. – V. 49, №1. – P. 16–20.

#### Сведения об авторах:

Шатова О.П., к. мед. н., ассистент каф. биохимии ДонНМУ им. М. Горького.

Хомутов Е.В., к. хим. н., доцент каф. биохимии ДонНМУ им. М. Горького.

Шашкевич М.А., ст. лаборант каф. биоорганической, биологической и фарм. химии НМУ им. А.А. Богомольца.

Зинкович И.И., д. мед. н., профессор, проректор по научной работе ДонНМУ им. М. Горького.

#### Адрес для переписки:

Зинкович Игорь Иванович. 83003, пр. Ильича, 15, ДонНМУ, каф. химии. Тел.: (050) 426 92 64. E-mail: zii@dsmu.edu.ua

УДК 616.12:577.152.34

О.А. Обухова

## Оцінка зв'язку факторів ризику гострого коронарного синдрому з поліморфізмом Thr83Ala гена MGP

Сумський державний університет

**Ключові слова:** фактор ризику, гострий коронарний синдром.

Останнім часом наукові зусилля вітчизняних і закордонних учених спрямовано на вивчення причин і механізмів розвитку мультифакторних хвороб, розвиток яких зумовлений складною взаємодією генетичних факторів і факторів зовнішнього середовища.

**Мета роботи:** вивчення деяких факторів ризику (АТ<sub>сист.</sub>, АТ<sub>діаст.</sub>, АТ<sub>пульс.</sub>, ІМТ, ступеню ожиріння, ЧСС) у пацієнтів з різними генотипами гена MGP, хворих на гострий коронарний синдром (ГКС).

Дослідження проведено з використанням венозної крові 118 хворих з ГКС. Оцінювали середні значення ЧСС, АТ<sub>сист.</sub>, АТ<sub>діаст.</sub>, АТ<sub>пульс.</sub>, ІМТ і ступеню ожиріння хворих з різними генотипами. У жінок Ala/Ala середній АТ<sub>сист.</sub> склав 175±11,3, а у Thr/Thr і Thr/Ala 139,5±11,8 і 142,1±7,0, що є статистично достовірним (p<0,05). За АТ<sub>діаст.</sub> статистичні відмінності були лише між Thr/

Ala (88,8±3,6) і Ala/Ala (101,7±5,1) (p<0,05), а між Thr/Thr і Thr/Ala розбіжностей немає. У жінок з генотипом Ala/Ala середній ІМТ достовірно вищий (35±1,7) ніж у Thr/Thr (29±1,5) і Thr/Ala (29±0,9) (p<0,05). Розподіл генотипів за ступенем ожиріння достовірно відрізнявся у пацієток без ожиріння і з 1 ступенем ожиріння та 2–3 ступенями ожиріння у Thr/Thr–26,7%, Thr/Ala–33,3%, Ala/Ala–3,3%, проти 3,3%, 16,7% і 16,7% відповідно (p<0,001). Значення ЧСС, і АТ<sub>пульс.</sub> у жінок і всі показники у чоловіків з різними генотипами не були статистично достовірними.

**Висновок:** генотип Ala/Ala поліморфізму Thr 83Ala гена MGP асоційований з підвищенням показників АТ<sub>сист.</sub>, АТ<sub>діаст.</sub>, ІМТ і ступеня ожиріння у жінок хворих на ГКС.