

УДК 616-006.04

О. І. Якубець, Д. З. Воробець, З. Д. Воробець

Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького

**ОСОБЛИВОСТІ Na^+/K^+ - ТА H^+ -АТФазних АКТИВНОСТЕЙ
ЛІМФОЦИТІВ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ ЖІНОК,
ХВОРИХ НА РАК ЯЄЧНИКА**

Вивчено зміни Na^+/K^+ -АТФазної та H^+ -АТФазної активностей лімфоцитів периферичної крові жінок, хворих на рак яєчника. Встановлено значне зниження оубаїн-залежної Na^+/K^+ -АТФазної та мітохондріальної H^+ -АТФазної активностей у лімфоцитах периферичної крові пацієнток, хворих на рак яєчника, порівняно з клінічно здоровими жінками.

О. И. Якубец, Д. З. Воробец, З. Д. Воробец

Львовский национальный медицинский университет им. Данила Галицкого

**ОСОБЕННОСТИ Na^+/K^+ - И H^+ -АТФазных АКТИВНОСТЕЙ
ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЖЕНЩИН,
БОЛЬНЫХ РАКОМ ЯИЧНИКА**

Изучены изменения Na^+/K^+ -АТФазной и H^+ -АТФазной активностей лимфоцитов периферической крови женщины, больных раком яичника. Показано значительное снижение оубаин-зависимой Na^+/K^+ -АТФазной и митохондриальной H^+ -АТФазной активностей в лимфоцитах периферической крови пациенток, больных раком яичника, по сравнению с клинически здоровыми женщинами.

O. I. Yakubets, D. Z. Vorobets, Z. D. Vorobets

Danylo Halitsky Lviv National Medical University

**FEATURES OF Na^+/K^+ - AND H^+ -ATPases ACTIVITIES
OF PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES
IN PATIENTS WITH AN OVARIAN CARCINOMA**

The changes of Na^+/K^+ -ATPase and H^+ -ATPase enzymatic activities of the peripheral blood lymphocytes in patients with an ovarian carcinoma have been studied. The significant decrease of ouabain-sensitive Na^+/K^+ -ATPase and H^+ -ATPase enzymatic activities in patients with ovarian carcinoma in comparison with the clinically healthy women was shown.

Вступ

Рак яєчника (РЯ) – одна з найпоширеніших онкологічних патологій. Щорічно у світі реєструється понад 200 тисяч нових випадків злоякісних новоутворень яєчника [15; 22]. За даними Національного концерн-ресстру України 2010 року, в Україні показник захворюваності на РЯ коливається в межах 14,7–15,3 випадка на 100 тисяч жіночого населення. Незважаючи на застосування удосконалених підходів до лікування РЯ, в основу яких покладено поєднання хірургічного втручання та хіміотерапії, залишаються нез'ясованими багато питань етіології, патогенезу,

діагностики пухлинного росту. Продукти секреції пухлинних клітин мають пригнічувальну дію на органи та тканини організму. У зв'язку з цим актуальною є проблема дослідження структурно-функціональних змін у різних органах і тканинах онкологічно хворих. У цьому плані одним із найдоступніших об'єктів досліджень є лімфоцити периферичної крові. Внутрішньоклітинний метаболізм лімфоцитів ґрунтується на фізіологічно закріпленій здатності цих клітин швидко реагувати на будь-які зміни гомеостазу організму, а модуляція активності ферментів у лімфоцитах настає значно раніше, ніж змінюються морфологічні показники [3].

Виникнення, перебіг пухлинного росту та його агресивність залежать від порушень внутрішньоклітинних біохімічних процесів, зокрема сигнальних систем [7; 28]. Із позиції сучасної біомембранології відомо, що патогенез багатьох захворювань пов'язаний зі змінами структури та функцій біомембран, у формуванні яких значна роль належить мембранозв'язаним білкам, зокрема інтернальним АТФ-залежним транспортним системам іонів. Na^+/K^+ -АТФаза – маркерний ензим плазматичної мембрани, що здійснює активне трансмембранне перенесення іонів Na^+ та K^+ і тим самим підтримує їх електрохімічні градієнти, необхідні для нормального функціонування клітини. Ця АТФаза опосередковано бере участь у регуляції експресії генів, проліферації та росту клітин [6; 7; 28]. Порушення іонного гомеостазу (перш за все натрій-калієвого) зумовлює розвиток клітинних патологій, зокрема супроводжується посиленою проліферацією клітин. Численними дослідженнями показано, що активність Na^+/K^+ -АТФази, яка відіграє ключову роль у підтриманні внутрішньоклітинного іонного гомеостазу, осмотичного балансу клітини, трансмембранного потенціалу клітин, змінюється під впливом гормонів, факторів росту, стресу [1; 7; 11; 28].

Мета даної роботи – оцінити функціональний стан Na^+/K^+ -АТФази в лімфоцитах периферичної крові клінічно здорових і хворих на рак яєчника жінок.

Матеріал і методи досліджень

Дослідження проводили на лімфоцитах периферичної крові клінічно здорових жінок віком 20–30 років ($n = 15$) і жінок, хворих на рак яєчника, які перебували на стаціонарному лікуванні у Львівському регіональному онкологічному диспансері ($n = 26$).

Моноядерні лімфоцити периферичної крові людини виділяли з гепаринізованої свіжоотриманої крові хворих і донорів у градієнті концентрації фікол-тріумбасту ($1,08 \text{ г/см}^3$) [10; 19]. Цілісність і життєздатність лімфоцитів, яка в усіх дослідках становила не менше 95 %, оцінювали за забарвленням трипановим синім [5; 10].

Для пермеабілізації мембран лімфоцитів периферичної крові та розкриття латентної Na^+/K^+ -АТФазної активності до суспензії лімфоцитів додавали 0,2 % сапонін. Ця методика ґрунтується на роботах, виконаних на лімфоцитах раніше [2; 5; 8; 10]. Сапонін належить до групи речовин амфифільної природи, що здатні зв'язуватися з мембранними білками гідروفобними зв'язками, одночасно взаємодіючи полярними групами з водою. Це дає змогу молекулам детергенту розпушувати мембрану, водночас не порушуючи структуру та функцію клітини та її транспортувальних систем.

Визначення загальної АТФазної ензиматичної активності лімфоцитів проводили за $+37^\circ\text{C}$ у середовищі інкубації (об'єм – 1 мл) такого складу (мМ): 30 $NaCl$, 120 KCl , 5 $MgCl_2$, 1,5 АТФ, 1 ЕГТА, 1 $NaNO_3$ (інгібітор мітохондріальної АТФази) [17], 20 Nepes-Tris-буфер 7,4), 0,1 мкМ тапсигаргін (селективний інгібітор Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФази ендоплазматичного ретикулуму) [18]. Наявність Ca^{2+} -хелатора ЕГТА в середовищі інкубації забезпечувало зв'язування в ньому ендогенних іонів Ca^{2+} . Ензиматичну реакцію ініціювали внесенням до інкубаційного середовища аліквоти лімфоцитарної

суміші (100 мкл); кількість білка у пробі не перевищувала 50–100 мкг/мл. Тривалість інкубації – 1–15 хв. Ензиматичну реакцію зупиняли додаванням 1 мл охолодженого стоп-розчину такого складу: 1,5 М натрій ацетат, 3,7 % формальдегід, 14 % етанол, 5 % ТХО ($pH = 4,3$). Базальну Mg^{2+} -АТФазну активність лімфоцитів тестували в аналогічному середовищі інкубації, але за присутності 1 мМ оубаїну – селективного інгібітора Na^+/K^+ -АТФази [2; 5; 10]. Оубаїнчутливу Na^+/K^+ -АТФазну активність обчислювали за різницею між величиною загальної АТФазної та базальної Mg^{2+} -активності.

У дослідях контролем на неензиматичний гідроліз АТФ було стандартне середовище інкубації, яке не містило досліджуваної проби. Як контроль на кількість ендogenous неорганічного фосфору (P_i) в лімфоцитарній суміші використовували суспензію лімфоцитів у фізіологічному розчині. Кількість продукту реакції P_i визначали методом W. Rathbun, V. Betlach [27] і виражали у мкмоль P_i /хв·мг білка. Вміст білка у лімфоцитарній суміші визначали методом Лоурі [25].

У дослідях використовували реактиви АТФ, Нерес, Tris, оубаїн, тапсигаргін, ЕГТА (Sigma, США). Інші використані у дослідях реактиви були вітчизняного виробництва (ч. д. а. та х. ч.).

Результати та їх обговорення

Оскільки зміни концентрації іонів Na^+ у клітинах можуть характеризувати їх фізіологічний чи патологічний стан [1; 7; 20; 23], нами досліджено активність і деякі кінетичні параметри Na^+/K^+ -АТФази в лімфоцитах периферичної крові клінічно здорових жінок і хворих на рак яєчника.

Для встановлення оптимальних умов Mg^{2+} -залежного гідролізу АТФ, який каталізується Na^+/K^+ -АТФазою лімфоцитів, досліджували динаміку накопичення продукту АТФ-гідролізу реакції. Для цього суспензію лімфоцитів інкубували у стандартному середовищі інкубації протягом різних проміжків часу (1–15 хв). Дані експериментів показали, що кінетику Na^+/K^+ -активованого, Mg^{2+} -залежного гідролізу АТФ сапонін-перфорованими лімфоцитами відображають криві, які мають тенденцію до насичення (рис.).

Аналіз отриманих результатів дозволяє дійти висновку, що кінетика Na^+/K^+ -активованого, Mg^{2+} -залежного гідролізу АТФ, каталізованого сапонін-перфорованими лімфоцитами, узгоджується із закономірностями реакції нульового порядку в діапазоні 0–5 хв: у цьому інтервалі часу графік залежності P_i від періоду інкубації практично лінійний. Тому у подальших експериментах тривалість інкубації лімфоцитів і, відповідно, реакції гідролізу АТФ становила 5 хв. В усьому діапазоні часу кількість вивільненого неорганічного фосфору P_i оубаїнчутливою Na^+/K^+ -АТФазою лімфоцитів хворих на РЯ була значно нижчою порівняно з величиною у донорів.

Оскільки протягом 5 хв залежність активності Na^+/K^+ -АТФази від часу інкубації практично лінійна, можна розрахувати, що в контрольній групі (клінічно здорові жінки) у пермеабілізованих сапоніном лімфоцитах периферичної крові активність ферменту складає $6,34 \pm 0,36$ мкмоль P_i /хв·мг білка (табл.).

У пацієток з РЯ ця величина значно менша ($4,18 \pm 0,12$ мкмоль P_i /хв·мг білка. Можна стверджувати, що має місце достовірне зниження Na^+/K^+ -АТФазної активності лімфоцитів периферичної крові у хворих на РЯ, яке становить 34,1 %.

Зниження Na^+/K^+ -АТФазної активності сповільнює транспорт Na^+ із клітини, і це спричинює зростання його концентрації у клітині та зростання співвідношення $[Na_i]/[K_i]$. Останнє спричинює мітогенний ефект [7; 20]. З іншого боку, порушення Na^+/K^+ -АТФазної активності лімфоцитів свідчить про зміни функціональної активності

імунокомпетентних клітин, що може бути зумовлено певними впливами на мембранозв'язаний ензим із боку інших процесів у цих клітинах, а також може опосередковуватись через інші регуляторні механізми клітини (йони Ca^{2+} , NO).

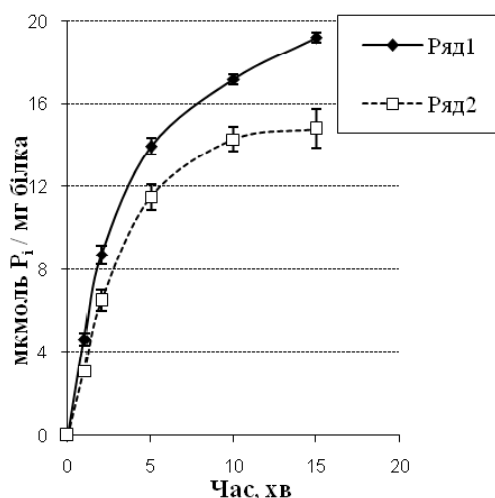


Рис. Динаміка вивільнення неорганічного фосфору (P_i) у процесі гідролізу АТФ у Na^+/K^+ -АТФазній реакції лімфоцитами периферичної крові клінічно здорових жінок (ряд 1) і хворих на рак яєчника (ряд 2)

Таблиця

Na^+/K^+ - та H^+ -АТФазні активності лімфоцитів периферичної крові хворих на рак яєчника та в контролі

Ферменти	Активності ферментів	
	контроль ($n = 15$)	хворі до початку лікування ($n = 26$)
Na^+/K^+ -АТФаза, мкмоль P_i /хв·мг білка	$6,34 \pm 0,36$	$4,18 \pm 0,14$
H^+ -АТФаза мітохондрій, мкмоль P_i /хв·мг білка	$3,61 \pm 0,28$	$2,02 \pm 0,12$

Наші дані погоджуються з такими, де показана позитивна кореляція між проліферативною активністю клітин гепатоми, аденокарциноми молочної залози, окогенною трансформацією епітелію в культурі клітин нирок і зростанням іонів Na^+ у клітині [7; 20; 24; 26]. Крім того, при індукції експериментального раку в дистальному відділі товстої кишки інгібування Na^+/K^+ -АТФазної активності, що спричинює зростання $[Na_i]$, відбувається задовго до появи гістологічних змін [7; 20]. H^+ -АТФазна активність мітохондрій пермеабілізованих лімфоцитів периферичної крові контрольної групи складала $3,61 \pm 0,28$, а дослідної – $2,02 \pm 0,14$ мкмоль P_i /хв·мг білка, тобто знижувалась на 44,1 %.

Вивчення змін Na^+/K^+ -АТФазної активності при патологічних станах викликає значний інтерес дослідників у медико-біологічній практиці [9; 13; 14]. Результати дослідження функціональної активності Na^+/K^+ -АТФази лімфоцитів периферичної крові в клінічних дослідженнях украй обмежені, що пояснюється невеликою кількістю біологічного матеріалу, який можна виділити з крові хворих. Зокрема, показано значні порушення механізмів оубаїнчутливого та оубаїнрезистентного транспортування моновалентних іонів при багатьох психічних порушеннях [9; 16]. Виявлено достовірне зниження активності Na^+/K^+ -АТФази еритроцитів у хворих із миготливою аритмією, шлуночковою та надшлуночковою екстрасистолією, гіпертонією [14]; має місце порушення механізмів роботи Na^+/K^+ -АТФази і при інших серцево-судинних захворюваннях. Зниження ензиматичної активності Na^+/K^+ -АТФази клітин печінки та головного

мозку має місце у хворих за тривалої дії етанолу [4]. Виявлено значні зміни функціональної активності Na^+/K^+ -АТФази лімфоцитів у пацієнтів із маніакально-депресивним психозом [16]. Показано зниження активності базальної АТФази мембран лімфоцитів при лімфомі Ходжкіна [12].

Щодо H^+ -АТФази, то вона функціонує і як АТФ-синтаза, забезпечуючи спряження в мітохондріях фосфорилування АДФ із реакціями дихального ланцюга. Пригнічення роботи даної АТФази викликає енергодефіцит у клітині.

Висновки

Виявлено достовірне зниження Na^+/K^+ - та H^+ -АТФазних активностей у лімфоцитах периферичної крові хворих на рак яєчника на 34,1 та 44,1 % порівняно з практично здоровими донорами. Визначення АТФазних активностей лімфоцитів периферичної крові дає якісну інформаційну оцінку функціонування імунокомпетентних клітин. Її співставлення з іншими фізіологічними та біохімічними характеристиками може мати значення у з'ясуванні механізмів розвитку раку яєчника.

Бібліографічні посилання

1. **Болдырев А. А.** Na^+,K^+ -АТФаза – свойства и биологическая роль // Соросовский образовательный журн. – 1998. – № 4. – С. 2–9.
2. **Воробець Д. З.** Неплідність та еректильна дисфункція чоловіків: біохімічні та клінічні аспекти / Д. З. Воробець, Н. С. Кочешкова. – Тернопіль : Укрмедкнига, 2008. – 204 с.
3. **Давтян Т. К.** О взаимоотношении иммунного и адаптивного ответов / Т. К. Давтян, Л. А. Аванесян // Успехи соврем. биол. – 2001. – Т. 121, № 3. – С. 275–286.
4. **Дереча Л. М.** Стан біологічних мембран та вміст макро- і мікроелементів в організмі тварин і людини при дії етанолу: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – Харків : Харківський держ. мед. ун-т, 2006. – 21 с.
5. **Дія** квамателу та пірензепіну на активність транспортних АТФаз лімфоцитів периферичної крові / О. В. Кімакович, Н. О. Підковка, З. Д. Воробець // Практична медицина. – 2004. – Т. 10, № 2. – С. 86–89.
6. **Долговременная** регуляция Na^+,K^+ -насоса в лимфоцитах человека: роль JAK/STAT- и MAP-киназных сигнальных путей / И. А. Карицкая, Н. Д. Аксенов, И. О. Васильева и др. // Цитология. – 2008. – Т. 50, № 4. – С. 329–337.
7. **Изоферменты** Na^+,K^+ -АТФазы и Ca^{2+} -АТФазы в злокачественных образованиях / А. А. Капля, С. В. Хижняк, А. Г. Кудрявцева и др. // Укр. біохім. журн. – 2006. – Т. 78, № 1. – С. 29–42.
8. **Кочешкова Н. С.** Вплив інгібіторів на Ca^{2+} -залежні та Ca^{2+} -незалежні АТФазні системи сперматозоїдів / Н. С. Кочешкова, З. Д. Воробець, Л. П. Оліферчук // Світ медицини та біології. – 2007. – № 3. – С. 65–70.
9. **Мороз О. М.** Про доцільність дослідження властивостей еритроцитних йон-транспортуючих систем у психіатрії / О. М. Мороз, І. Й. Влох // Матер. VIII Конгресу світової федерації українських лікарських товариств. – Львів – Трускавець, 2000. – С. 285.
10. **Підковка Н. О.** Дослідження деяких властивостей АТФаз у лімфоцитах крові людини / Н. О. Підковка, З. Д. Воробець, А. Б. Зіменковський // Експерим. та клін. фізіол. і біохім. – 2002. – Т. 7, № 1. – С. 38–41.
11. **Федорова М. З.** Метод комплексного дослідження геометрії, площини поверхності, резервних можливостей мембрани і осморегуляції лейкоцитів крові / М. З. Федорова, В. Н. Левин // Клин. лаб. диагностика. – 1997. – № 11. – С. 44–46.
12. **Характер** липид-білкових взаємозв'язків в мембранах лімфоцитів при лімфомі Ходжкіна / П. А. Казарян, С. С. Дагбашян, А. А. Пепанян, А. А. Асоян // Онкогематологія. – 2008. – Т. 10, № 3.

13. **Шкаволяк А. В.** Дослідження *Na*-транспортуючих систем в діагностиці іонних мембранопатій (Огляд) / А. В. Шкаволяк, Н. М. Гринчишин // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. – 2000. – № 4. – С. 63–66.
14. **Шумова Н. В.** Натрійуретичний гормон та калій-натрієвий обмін при порушеннях ритму серця у хворих на хронічну ішемічну хворобу серця: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – 2002. – 19 с.
15. **Abdollahi T.** Potential for TRAIL as a therapeutic agent in ovarian cancer // *Vitam. Horm.* – 2004. – Vol. 67. – P. 347–364.
16. **Altered *in vitro* adaptive responses of lymphocyte $Na^+ K^+$ -ATPase in patients with manic depressive psychosis** / J. Wood, C. E. Smith, E. E. Clarke et al. // *J. Affective Disorders.* – 1991. – Vol. 21, is. 3. – P. 199–206.
17. **ATP synthesis** by F_0F_1 -ATP-synthase independent of noncatalytic nucleotide binding sites and insensitive to azide inhibition / D. Bald, T. Amano, E. Muneyuki et al. // *J. Biol. Chem.* – 1998. – Vol. 273, N 2. – P. 865–870.
18. **Bassani R. A.** Inhibition of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} pump with thapsigargin to estimate the contribution of $Na^+ - Ca^{2+}$ exchange to ventricular myocyte relaxation / R. A. Bassani, J. W. Bassani // *Braz. J. Med. Biol. Res.* – 2003. – Vol. 36, N 12. – P. 1717–1723.
19. **Boyum A.** Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood // *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* – 1968. – Vol. 21, Suppl. 97. – P. 77–79.
20. **Correlation** of malignancy with the intracellular $Na^+ : K^+$ ratio in human thyroid tumors / I. Nagy, G. Lustyik, G. Lukacs et al. // *Cancer Res.* – 1983. – Vol. 43. – P. 5395–5402.
21. **Davies R. J.** Inhibition of the Na^+, K^+ -ATPase pump during induction of experimental colon cancer / R. J. Davies, G. I. Sandle, S. M. Thompson // *Cancer Biochem. Biophys.* – 1991. – Vol. 12, N 2. – P. 81–94.
22. **Global cancer statistics, 2002** / D. M. Parkin, F. Bray, J. Ferlay, P. Pisani // *CA Cancer J. Clin.* – 2005. – Vol. 55. – P. 74–108.
23. **Na^+ effects** on mitochondrial respiration and oxidative phosphorylation in diabetic hearts / A. Babsky, Nic. Doliba, Nat. Doliba et al. // *Experimental Biology and Medicine.* – 2001. – Vol. 226, N 6. – P. 543–551.
24. ***Na-K*-ATPase regulates** tight junction permeability through occluding phosphorylation in pancreatic epithelial cells / S. A. Rajasekaran, S. P. Barwe, G. Gopal et al. // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* – 2007. – Vol. 292, N 1. – P. 124–133.
25. **Protein** measurement with the Folin phenolreagent / O. H. Lowry, N. J., A. L. Farr et al. // *J. Biol. Chem.* – 1951. – Vol. 193. – P. 265–275.
26. **Rajasekaran S. A.** *Na,K*-ATPase and epithelial tight junctions / S. A. Rajasekaran, A. K. Rajasekaran // *Front Biosci.* – 2009. – Vol. 14. – P. 2130–2148.
27. **Rathbun W.** Estimation of enzymically produced orthophosphate in the presence of cysteine and adenosine triphosphate / W. Rathbun, V. Betlach // *Anal. Biochem.* – 1969. – Vol. 28. – P. 436–447.
28. **Xie Z.** Na^+ / K^+ -ATPase as a signal transducer / Z. Xie, A. Askari // *Eur. J. Biochem.* – 2002. – Vol. 269. – P. 2434–2439.

Надійшла до редколегії 26.03.2012