

## ОСОБЛИВОСТІ АРГІНАЗНОГО ТА NO-СИНТАЗНОГО ШЛЯХІВ МЕТАБОЛІЗМУ L-АРГІНІНУ В ЛІМФОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ ХВОРИХ НА РАК ЯЄЧНИКА

О. І. ЯКУБЕЦЬ, Р. В. ФАФУЛА, Д. З. ВОРОБЕЦЬ, З. Д. ВОРОБЕЦЬ

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, Україна;  
e-mail: vorobets@meduniv.lviv.ua

Досліджено особливості аргіназного і NO-синтазного шляхів перетворення L-аргініну в лімфоцитах периферичної крові жінок, хворих на рак яєчника. Показано, що розвиток онкопатології супроводжується дисбалансом у системі синтезу NO в лімфоцитах крові, який полягає в активації аргінази та індукційної ізоформи NO-синтази (iNOS) і значному інгібуванні її конститутивної ізоформи. Проведено аналіз кінетичних властивостей NOS лімфоцитів крові пацієнток з раком яєчника. Показано, що за онкопатології уявна константа спорідненості iNOS до L-аргініну в 5,4 рази нижча, ніж для eNOS лімфоцитів крові осіб групи контролю, а інгібування активності eNOS відбувається за неконкурентним типом — за рахунок зниження числа обертів ензиму.

*Ключові слова:* NO-синтаза, аргіназа, L-аргінін, оксид азоту, лімфоцити, рак яєчника.

Одним з найважливіших напрямів біомедичних досліджень є з'ясування механізмів, які регулюють проліферацію та апоптоз пухлинних клітин. На сучасному етапі розвитку біології та медицини роль нітроген (N) оксиду (NO) як універсального клітинного і тканинного метаболіту за пухлинного росту не викликає сумніву. Відомо, що NO виявляє про- або антионкогенний ефект залежно від його концентрації. За високих концентрацій NO знищує ракові клітини, а за низьких — стимулює пухлинний ріст і метастазування [1, 2]. NO бере участь у промоції канцерогенезу, як модифікатор метаболізму ксенобіотиків, і як агент, що порушує про- та антиканцерогенний генетичний баланс, зумовлюючи одно- та дволанцюгові розриви ДНК [3, 4]. Крім того, NO є фактором, який відіграє важливу роль в ангиогенезі та рості пухлин [5]. Водночас, встановлено, що NO виявляє інгібувальну дію на процеси утворення і генезу пухлин [6, 7].

Обмін L-аргініну може здійснюватися шляхом окисного перетворення за участю NO-синтази (NOS, 1.14.13.39) до NO та L-цитруліну і неокисного за участю аргінази (3.5.3.1) до сечовини та орнітину [8]. Співвідношення між цими ензимами забезпечує в клітинах певний фізіологічний пул L-аргініну, а також генерацію активних форм нітрогену, який забезпечує функціональну активність імункомпетентних клітин [9].

Розрізняють конститутивну ізоформу NOS (cNOS) та індукційну NOS (iNOS).

Конститутивні NOS є менш потужними ензимами, ніж індукційні, їх поділяють на нейрональну (nNOS) та ендотеліальну (eNOS) ізоформи. Більшість типів клітин організму людини мають одну або декілька ізоформ NOS. Ці ізоензими експресуються як продукти різних генів, локалізованих в окремих хромосомах. Відмінності ко- та посттрансляційних модифікацій можуть впливати на внутрішньоклітинну локалізацію та активність ізоформ NOS.

Актуальною проблемою сучасної онкології є рак яєчника, який займає третє місце у структурі онкогінекологічної патології. За даними Національного канцерреєстру України, захворюваність на рак яєчника у 2010 році становила 15,8 на 100 тис. жіночого населення, а смертність — 9,86 на 100 тис. [10, 11].

У пацієнтів зі злоякісними новоутвореннями виникають виражені патологічні порушення функції багатьох органів. Пухлина реалізує депресивний вплив на системи та структури всього організму хворого внаслідок дії біологічно активних продуктів метаболізму злоякісної пухлини.

Найадекватнішою моделлю для вивчення патологічних змін є лімфоцити периферичної крові, які знаходяться переважно в одній фазі клітинного циклу ( $G_0$ ), в звичайних умовах не діляться, легко піддаються культивуванню і об'єктивно відображають генетичний гомеостаз організму [12]. Відомо, що внутрішньоклітинний метаболізм лімфоцитів ґрунтується на фізіологічно і біохімічно

закріпленій здатності цих клітин швидко реагувати на будь-які зміни гомеостазу в організмі, а модуляція активності ензимів у лімфоцитах настає значно раніше, ніж змінюються їхні морфологічні та біохімічні показники [13]. Це дає змогу використовувати лімфоцити як «метаболічне дзеркало організму».

Метою роботи було дослідити активність ензимів окисного та неокисного шляхів перетворення L-аргініну в лімфоцитах периферичної крові хворих на рак яєчника та вивчити кінетичні властивості NOS.

### Матеріали і методи

Дослідження проводили на лімфоцитах периферичної крові пацієнток з раком яєчника ( $n = 30$ ), які знаходилися на лікуванні у Львівському державному онкологічному регіональному лікувально-діагностичному центрі з червня 2011 до червня 2012 р. У дослідження включали пацієнток переважно в початковій або розгорнутій фазі хвороби. Середній вік пацієнток становив  $48,2 \pm 3,8$  років. Групу контролю становили практично (клінічно) здорові жінки, репрезентативні за віком ( $n = 30$ ). Усі пацієнтки з раком яєчника та особи групи контролю дали письмову згоду на участь у дослідженні.

Моноядерні лімфоцити периферичної крові виділяли з гепаринізованої свіжо-отриманої крові пацієнток на рак яєчника та осіб групи контролю у градієнті густини фікол-тріумбасту ( $\rho = 1,08 \text{ г/см}^3$ ) [14]. Цілісність і життєздатність лімфоцитів крові, яка в усіх дослідах становила не менше 95%, оцінювали за забарвленням трипановим синім.

Визначення активності NOS і аргінази проводили на пермеабілізованих сапоніном лімфоцитах крові. Для пермеабілізації мембран лімфоцитів і виявлення ензиматичної активності лімфоцити інкубували протягом 10 хв за помірного струшування в розчині, який містив сапонін у концентрації 0,1%. Такий методологічний підхід до визначення активності як мембранозв'язаних, так і цитозольних ензимів лімфоцитів крові був апробований дослідниками нашої лабораторії раніше і підтверджений ультраструктурним дослідженням [15]. Вміст протеїну у лімфоцитарній суміші встановлювали методом Лоурі [16].

Активність аргінази визначали за утворенням сечовини, вміст якої вимірювали за допомогою діагностичного набору фірми Сімко (Україна). Аліквоти пермеабілізованих лімфоцитів крові інкубували при 37 °С у

субстратній суміші (0,3 мл): трис-ОН-буфер – 50 мМ (pH 9,5),  $\text{MnCl}_2$  – 2,0 мМ, Arg – 100 мМ. Кількість протеїну в пробі не перевищувала 50–75 мкг. Інкубацію проводили протягом 30 хв. при 37 °С. Реакцію зупиняли внесенням 36 мкл «стоп-розчину» 50%-ї трихлороцтової кислоти, центрифугували і в одержаному супернатанті визначали вміст сечовини. Усі проби спектрофотометрували при 520 нм проти контрольних проб, які замість супернатанту містили дистильовану воду [17]. Вміст новоутвореної сечовини вираховували за різницею загального вмісту сечовини та її вихідного рівня, який визначали в досліджуваних зразках, попередньо оброблених «стоп-розчином». Активність аргінази виражали в нмолях сечовини, що утворилася протягом 1 хв у розрахунку на 1 мг протеїну.

Визначення активності NOS в пермеабілізованих лімфоцитах проводили в реакційній суміші: 80 мМ трис-НСІ буфер (pH 7,4), 5 мМ  $\text{CaCl}_2$ , 0,15 мМ L-Arg, 0,12 мМ NADPH. Кількість протеїну в пробі не перевищувала 50–75 мкг. Реакцію ініціювали внесенням аліквоти лімфоцитів крові в реакційну суміш. Різниця між величинами окислення NADPH з L-Arg та з інгібітором L-NAME відображає величину окислення NADPH, тобто активність сумарної NOS. Дослідні проби спектрофотометрували проти контрольних при 340 нм, потім інкубували 20 хв при 37 °С, зупиняли реакцію внесенням 0,05 мл 1,5 М  $\text{HClO}_4$  і реєстрували зниження екстинкції [18]. Активність NOS виражали у нмолях NADPH, що окислювався протягом 1 хв на 1 мг протеїну лімфоцитів.

Активність  $\text{Ca}^{2+}$ -незалежної ізоформи NOS, яка згідно з даними літератури відповідає індукцибельній ізоформі NOS (iNOS), визначали аналогічно, додаючи в інкубаційне середовище хелатор  $\text{Ca}^{2+}$  ЕГТА (4 мМ) замість  $\text{CaCl}_2$ . Активність  $\text{Ca}^{2+}$ -залежної ізоформи NOS, що згідно з даними літератури відповідає конститутивній ізоформі NOS (cNOS), розраховували як різницю між загальною активністю NOS і активністю  $\text{Ca}^{2+}$ -незалежної ізоформи NOS.

Вивчення кінетичних властивостей NOS проводили в стандартному середовищі інкубації, що було модифіковане за часом інкубації (0–30 хв) та концентрацією субстрату (0,1 до 30 мкМ). Уявні кінетичні параметри, які характеризують NO-синтазну реакцію – максимальну миттєву швидкість реакції  $V_0$ , максимальну (платову) кількість утворення продукту реакції  $P_{\text{max}}$  та характеристичний час

реакції  $\tau$  визначали як описано у статті [19]. Уявні кінетичні параметри, які характеризують NO-синтазу реакцію – уявну константу спорідненості (афінності) до L-аргініну  $K_{L-Arg}$  та максимальну швидкість реакції  $V_{max}$ , визначену L-аргініном, розраховували у координатах Лайнуївера–Берка [20].

Кінетичні та статистичні розрахунки проводили в режимі програмного забезпечення MS Office. Для оцінки вірогідності різниці між статистичними характеристиками двох експериментальних сукупностей даних визначали коефіцієнт Стюдента, а вірогідними вважали зміни за рівня значущості  $P < 0,05$ . Рівняння прямої лінії, що найкраще апроксимує експериментальні дані, розраховували із використанням методу найменших квадратів. Абсолютне значення коефіцієнта кореляції  $r$  становило 0,85–0,95. Вірогідність розрахованих параметрів прямої перевіряли за  $F$ -критерієм Фішера: вірогідною вважали апроксимацію, за якої  $P \leq 0,05$ .

### Результати та обговорення

Згідно з даними літератури, в лімфоцитах крові ідентифіковано всі ізоформи NOS [21]. Внаслідок проведених досліджень встановлено, що активність eNOS лімфоцитів крові практично здорових осіб становить  $74,6 \pm 6,38$  нмоль NADPH(H<sup>+</sup>)/хв на мг протеїну (рис. 1). Аналіз даних літератури свідчить про значну варіабельність абсолютних значень

ензиматичної активності NOS лімфоцитів крові, що обумовлено різноманітними методологічними підходами до вивчення активності ензиму.

Відомо, що eNOS продукує низькі концентрації NO, в той час як iNOS синтезує високі концентрації NO ( $> 300$  нМ) [22]. iNOS є кальційнезалежною ізоформою NOS і, на відміну від eNOS, не експресується постійно (конститутивно). Встановлено, що активність iNOS лімфоцитів крові здорових осіб ідентифікується в незначній мірі та становить  $1,32 \pm 0,18$  нмоль NADPH(H<sup>+</sup>)/хв-мг протеїну.

У лімфоцитах крові пацієток з раком яєчника активність eNOS знижується в 4,1 раза і становить  $18,0 \pm 1,6$  нмоль NADPH(H<sup>+</sup>)/хв-мг протеїну. На фоні інгібування eNOS у лімфоцитах крові хворих жінок спостерігається різке зростання активності iNOS до величини  $220,1 \pm 24,4$  нмоль NADPH(H<sup>+</sup>)/хв-мг протеїну. Ці результати узгоджуються з даними, одержаними дослідниками раніше, яким також встановлено зростання активності та експресії iNOS у пацієток з раком яєчника [23]. Показано, що у хворих на рак яєчника експресія iNOS корелює зі стадією диференціації пухлини, а внутрішньоклітинний NO – зі стадією хвороби. Встановлено, що інгібування iNOS може бути потенційною під час лікування терапевтичною мішенню [24]. Гіперекспресію iNOS виявлено в різних типах злоякісних пухлин. Показано, що селективні інгібітори

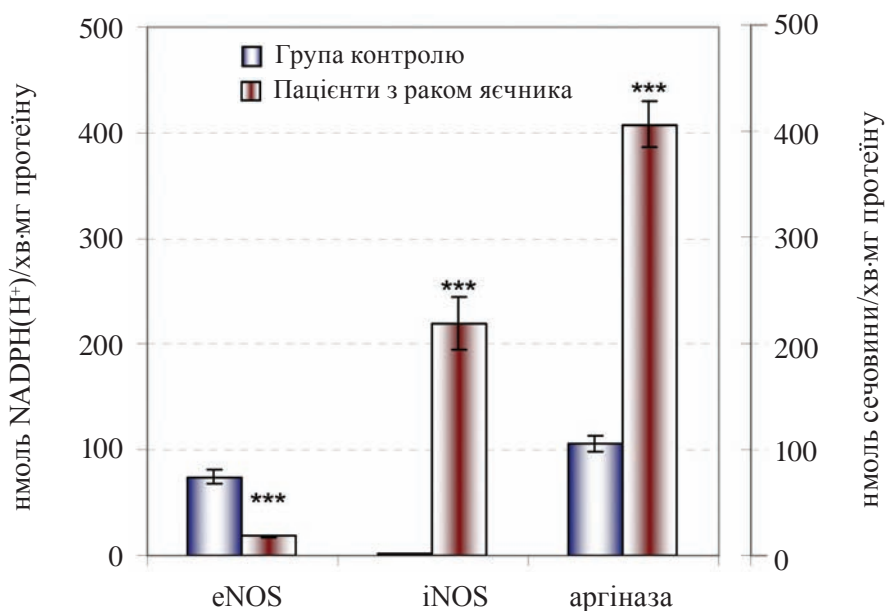


Рис. 1. Зміни активності NOS та аргінази в лімфоцитах крові пацієток з раком яєчника,  $M \pm t$ , \*\*\*  $P < 0,001$  щодо величин в осіб групи контролю

iNOS гальмують ріст пухлин, розвиток яких індукований дією різних канцерогенів [25].

Аргіназа — металоензим, що каталізує гідроліз L-аргініну до L-орнітину та сечовини. Аргіназна активність у лімфоцитах крові практично здорових осіб становить  $106,0 \pm 6,7$  нмоль сечовини/хв·мг протеїну. В лімфоцитах крові пацієнток з раком яєчника активність аргінази зростає в 3,8 раза і становить  $408,1 \pm 22,4$  нмоль сечовини/хв·мг протеїну. Одержані дані узгоджуються з результатами, одержаними Melichar B. et al. [26]. Дослідниками показано зростання активності аргінази-2 в клітинній лінії епітеліального рака яєчника. Зростання аргіназної активності встановлено за низки онкопатологій, причому характер змін активності аргінази часто залежить від стадії новоутворення і типу тканини [27].

Раніше вважали, що NOS-залежний синтез фізіологічно необхідного NO («базальний NO») здійснюється за участю eNOS і nNOS, а NOS-залежний синтез додаткової кількості NO в клітині за розвитку різних патологічних станів реалізується за участю iNOS. Тому активація iNOS є складовою ланкою численних адаптаційно-захисних реакцій клітини й організму. Проте підтверджено участь iNOS у фізіологічному («базальному») синтезі NO, а також участь eNOS і nNOS у разі гіперсинтезу NO за інфекційних, алергічних та аутоімунних захворювань. Тому говорять про «базальну» NO-синтазну активність iNOS в регуляції фізіологічних функцій, зокрема в регуляції судинного тонуусу [28].

Одержані нами результати вказують на порушення аргіназо-NO-синтазної системи лімфоцитів крові, які ведуть до дисбалансу регуляторних систем лімфоцитів, зокрема регуляторної функції NO. Зростання активності iNOS очевидно зумовлює компенсаторне зниження активності eNOS та свідчить про гіперпродукцію NO в лімфоцитах крові в умовах розвитку онкопатології. NO, що утворюється в надмірній кількості за патологічних станів організму, має виражену цитотоксичну дію внаслідок утворення пероксинітриду — продукту взаємодії NO та супероксиданіон-радикала, здатного до деструкції практично всіх компонентів клітини [29]. Показано, що клітини, в яких відмічено зростання концентрації NO, мають підвищену швидкість росту [30].

Аргіназа регулює концентрацію L-аргініну в клітині та інгібує активність NOS (шляхом конкурування за спільний субстрат),

безпосередньо регулюючи синтез NO [31]. Інгібіторами NOS є також поліаміни, що утворюються з L-орнітину — продукту аргіназної реакції [32].

З огляду на те, що клітинна продукція NO в імунокомпетентних клітинах повністю залежить від наявності L-аргініну [33], різке зростання активності iNOS та аргінази в лімфоцитах крові пацієнтів з онкопатологією, ймовірно, пов'язане зі збільшенням концентрації субстрату цих ензимів.

L-аргінін є єдиним субстратом для синтезу NO всіма формами NOS. Доступність внутрішньоклітинного L-аргініну є лімітуючим фактором NO-синтезу і потенційним механізмом контролю регуляторної функції NO, оскільки більшість типів клітин нездатні синтезувати L-аргінін і потребують його екзогенного надходження. L-аргінін є ключовою молекулою в низці інших метаболічних, а також регуляторних і сигнальних шляхів, які зазнають серйозних змін під час злоякісної трансформації клітин і впливають на хід канцерогенезу [34, 35].

Водночас показано [36], що позаклітинний аргінін також відіграє важливу роль у регуляції синтезу NO. Концентрація L-аргініну в плазмі крові людини і тварин коливається в межах 50—200 мкМ залежно від віку та дієти. Літературні дані стосовно вмісту L-аргініну в плазмі крові людини за наявності онкопатології є суперечливими. Дослідниками встановлено як зростання концентрації L-аргініну в плазмі крові за деяких онкопатологій [37], так і зниження його рівня [38], що пов'язують саме з високими потребами в цій амінокислоті пухлинних клітин, які поглинають значну його кількість із плазми крові. Тому концентрація L-аргініну в плазмі крові не може вважатися достатньо переконливим діагностичним і прогностичним показником.

Концентрація внутрішньоклітинного L-аргініну становить 1—2 мМ і залежить від активності його надходження з їжею, його синтезу (ресинтезу) в організмі, його активного транспортування в клітині крізь плазматичну мембрану та активності аргініндеградуючих ензимів. Катаболізм протеїнів та/або ресинтез L-аргініну з цитруліну в L-цитруліновому циклі можуть тією чи іншою мірою компенсувати дефіцит L-аргініну для підтримання його сталого рівня. Незважаючи на те, що внутрішньоклітинна концентрація L-аргініну в декілька разів перевищує величини  $K_{L-Arg}$  для NOS, активність ензиму значно залежить від надходження аргініну із зовнішньоклітинного



середовища (так званий «аргініновий парадокс») та від «бідоступності» L-аргініну для NOS у клітині [39].

Відомо, що злоякісні клітини характеризуються підвищеною чутливістю до дефіциту аргініну порівняно з нормальними клітинами організму. Це, ймовірно, пов'язано з мутаційним статусом клітин пухлини, а саме з особливостями регуляції експресії генів метаболізму аргініну [40].

З іншого боку, відомо, що підвищена активність аргінази та iNOS за патологічних станів може спричинювати таке зниження доступності аргініну, яке ставить під загрозу T-лімфоцитарну функцію та продукцію NO, що веде до збільшеної сприйнятливості до інфекції [34].

Таким чином, зростання активності аргінази та NOS лімфоцитів крові пацієток з раком яєчника свідчить про загальну потребу клітин у L-аргініні у разі пухлинного росту. Патологічна активація аргінази та iNOS на фоні зниження активності eNOS пов'язані зі збільшенням бідоступності ендogenous пулу L-аргініну.

Зміни активності аргіназої та NOS ензиматичних систем лише вказують на

спрямованість дисметаболических порушень в системі NO-гомеостазу. Проте біохімічні та біофізичні механізми, що ведуть до змін функціональної активності досліджуваних ензиматичних систем, залишаються нез'ясованими. Тому наступний етап нашого дослідження був присвячений вивченню кінетичних властивостей eNOS та iNOS лімфоцитів крові.

З метою вивчення особливостей і механізму роботи NOS визначали максимальну миттєву швидкість реакції ( $V_0$ ), максимальну (платову) кількість утворення продукту реакції ( $P_{max}$ ) та характеристичний час реакції ( $\tau$ ). Для встановлення цих кінетичних параметрів NOS досліджували динаміку зменшення NADPH( $H^+$ ), що свідчить про синтез NO. Для цього суспензію лімфоцитів інкубували в стандартному середовищі інкубації протягом різних проміжків часу (0–30 хв).

З рис. 1 видно, що кінетика утворення NO за участю eNOS узгоджується із закономірностями реакції нульового порядку в діапазоні 0–20 хв: у цьому інтервалі часу графік залежності утворення NO від періоду інкубації є практично лінійним. Тому в подальших експериментах тривалість інкубації

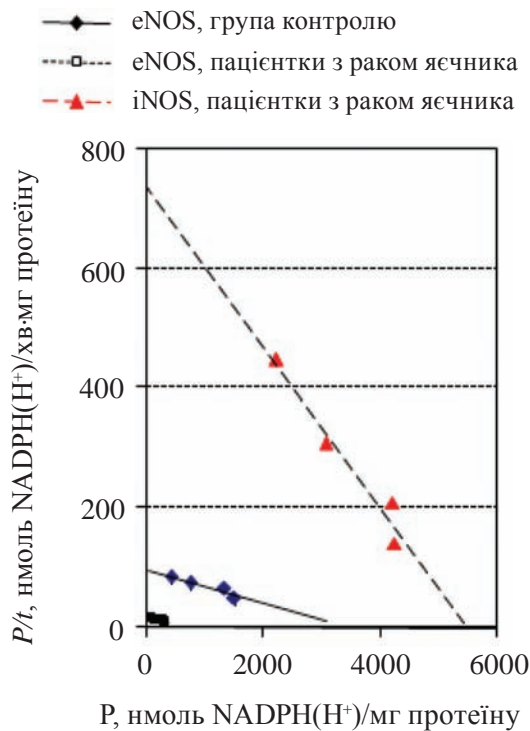
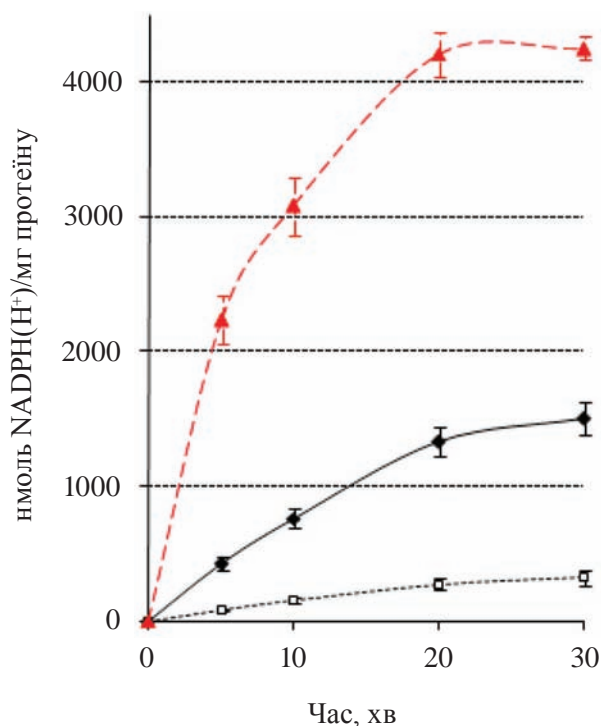


Рис. 2. Динаміка утворення NADPH( $H^+$ ) у процесі NO-синтазної реакції лімфоцитів крові пацієток з раком яєчника та осіб групи контролю і лінеаризація кривих накопичення в координатах  $\{P/t; P\}$ ,  $M \pm m$ ,  $n = 4-6$ ,  $r > 0,85$ ;  $F < 0,05$

Таблиця 1. Кінетичні параметри NOS реакції лімфоцитів крові пацієнток з раком яєчника ( $M \pm t$ ,  $n = 4-6$ )

Кінетичні параметри	Пацієнтки з раком яєчника	Група контролю
eNOS		
$V_0$ , нмоль NADPH( $H^+$ )/хв·мг протеїну	$18,5 \pm 1,5^{***}$	$98,0 \pm 7,2$
$P_{max}$ , нмоль NADPH( $H^+$ )/мг протеїну	$908,6 \pm 186,2^{***}$	$3512 \pm 306$
$\tau$ , хв	$50,6 \pm 12,9^{**}$	$36,4 \pm 4,9$
iNOS		
$V_0$ , нмоль NADPH( $H^+$ )/хв·мг протеїну	$739,0 \pm 59,6$	—
$P_{max}$ , нмоль NADPH( $H^+$ )/мг протеїну	$5536,4 \pm 57,7$	—
$\tau$ , хв	$7,6 \pm 0,7$	—

Зміни вірогідні щодо величин в осіб групи контролю, \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$ .

лімфоцитів і, відповідно, NO-синтазної реакції становить 20 хв. Результати досліджень показали, що кінетичні криві утворення NO у процесі NO-синтазної реакції лімфоцитів крові мають тенденцію до насичення (рис. 2). Як видно з рис. 2, динаміка і кількість утворення NO за участю eNOS лімфоцитів крові пацієнток з раком яєчника є істотно нижчими, ніж в осіб групи контролю. Водночас у всьому діапазоні фактора часу утворення NO за участю iNOS лімфоцитів крові хворих з раком яєчника значно перевищує ці величини для eNOS.

Шляхом лінеаризації одержаних даних у координатах  $P/t$  від  $P$  обчислено основні кінетичні характеристики NOS реакції лімфоцитів крові (табл. 1).

Значення кінетичних параметрів для eNOS та iNOS, а також для eNOS лімфоцитів крові донорів і хворих на рак яєчника істотно відрізняються між собою. Як видно з рис. 2 і даних табл. 1 синтез NO за участю iNOS відбувається значно інтенсивніше, ніж за участю eNOS. А синтез NO за участю eNOS за онкопатології відбувається повільніше і менш активно, ніж у нормі.

Отримані кінетичні параметри підтверджують дані, що у лімфоцитах крові хворих на рак яєчника гіперсинтез NO відбувається за участю iNOS, а «базальний» синтез NO в нормальних фізіологічних умовах відбувається за участю eNOS.

Зміни концентрації L-аргініну в інкубаційному середовищі вірогідно впливають на швидкість NO-синтазної реакції. У цьому плані важливою характеристикою NOS є залежність активності ензиму від концентрації субстрату в середовищі інкубації,

яка визначається величиною уявної константи спорідненості (афінності) до субстрату  $K_{L-Arg}$ . Останню розраховували шляхом визначення питомої активності NOS у середовищі інкубації, яке містило L-аргінін у діапазоні концентрацій від 0,1 до 30 мкМ (за сталої концентрації  $CaCl_2 - 10$  мМ та NADPH — 0,12 мМ).

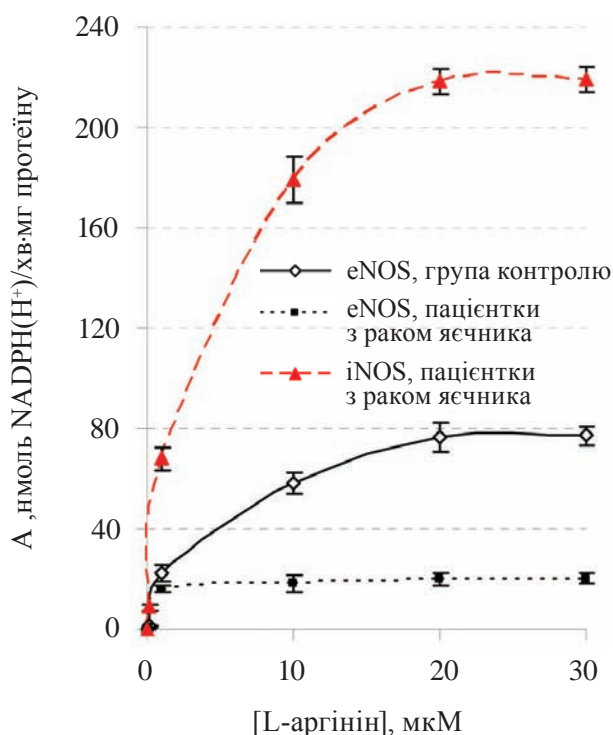


Рис. 3. Концентраційна залежність впливу L-аргініну на NO-синтазну активність лімфоцитів крові пацієнток з раком яєчника та осіб групи контролю,  $M \pm t$ ,  $n = 6-8$

Таблиця 2. Кінетичні параметри NOS лімфоцитів крові пацієнтів з раком яєчника та осіб групи контролю, визначені за L-аргініном,  $M \pm m$ ,  $n = 6-8$

Кінетичні параметри	Хворі на рак яєчника	Група контролю
eNOS		
$V_{\max}$ , нмоль NADPH( $H^+$ )/хв·мг протеїну	131,2 $\pm$ 30,7***	235,6 $\pm$ 44,0
$K_{L-Arg}$ , мкМ	21,2 $\pm$ 4,1	14,6 $\pm$ 2,7
iNOS		
$V_{\max}$ , нмоль NADPH( $H^+$ )/хв·мг протеїну	244,3 $\pm$ 6,9	—
$K_{L-Arg}$ , мкМ	2,7 $\pm$ 0,2	—

Зміни вірогідні стосовно величин у лімфоцитах в осіб групи контролю \*\*\*  $P < 0,001$ .

З'ясовано, що підвищення концентрації L-аргініну в середовищі інкубації в діапазоні концентрацій від 0,1 до 30 мкМ веде до поступового збільшення ензиматичної активності обох ізоформ NOS з виходом на плато (рис. 3).

Максимальна активність eNOS лімфоцитів крові практично здорових осіб та iNOS лімфоцитів крові хворих на рак яєчника тестується за наявності 20 мкМ L-аргініну в інкубаційному середовищі. Активність eNOS лімфоцитів крові пацієнок з раком яєчника виходить на плато за значно нижчих концентрацій субстрату.

Шляхом лінеаризації одержаної концентраційної залежності в координатах Лайнуївера–Берка визначено основні кінетичні параметри NOS лімфоцитів крові (табл. 2).

Як випливає з даних табл. 2, значення  $V_{\max}$  для eNOS лімфоцитів крові осіб групи контролю в 1,8 раза перевищує цю величину для eNOS лімфоцитів крові пацієнок з раком яєчника. Водночас, значення  $K_{L-Arg}$  для обох досліджуваних груп вірогідно не відрізняються між собою, що свідчить про те, що за наявності онкопатології спорідненість eNOS до L-аргініну не змінюється.

Водночас  $V_{\max}$  для iNOS, активованої за онкопатології, істотно не відрізняється від цієї величини для eNOS лімфоцитів крові осіб групи контролю. Проте iNOS лімфоцитів крові пацієнок з раком яєчника характеризується значно вищою спорідненістю до L-аргініну: величина  $K_{L-Arg}$  для iNOS є нижчою в 5,4 раза, ніж для eNOS лімфоцитів крові осіб групи контролю.

Таким чином, інтерпретуючи одержані кінетичні параметри, визначені за L-аргініном, показано, що за онкопатології уявна константа спорідненості iNOS до L-аргініну в 5,4 раза

нижча, ніж для eNOS лімфоцитів крові осіб групи контролю, а інгібування активності eNOS відбувається за неконкурентним типом – за рахунок зниження числа обертів ензиму.

Результати наших досліджень показали, що під час розвитку онкопатології в лімфоцитах крові відбувається зростання активності аргінази, зниження активності eNOS і компенсаторне зростання активності iNOS. Отже, в умовах розвитку онкопатології порушується співвідношення NO-синтазного та аргіназного метаболізму L-аргініну, що свідчить про дисметаболичні зміни в системі синтезу NO, а саме його гіперпродукції.

Рівень активності NOS, аргінази та концентрація NO, поряд з іншими параметрами, може свідчити про функціональний стан клітини та бути прогностичними показниками для діагностування та оцінки ефективності онкотерапії.

### ОСОБЕННОСТИ АРГИНАЗНОГО И NO-СИНТАЗНОГО ПУТЕЙ МЕТАБОЛИЗМА L-АРГИНИНА В ЛИМФОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ РАКОМ ЯИЧНИКА

О. И. Якубец, Р. В. Фафула, Д. З. Воробец, З. Д. Воробец

Львовский национальный медицинский университет имени Данила Галицкого, Украина; e-mail: vorobets@meduniv.lviv.ua

Исследованы особенности аргиназного и NO-синтазного путей превращения L-аргинина в лимфоцитах периферической крови женщин, больных раком яичника. Показано, что развитие онкопатологии сопровождается дисбалансом в системе синтеза NO в

лимфоцитах крови, который заключается в активации аргиназы и индуцибельной изоформы NO-синтазы (iNOS) и значительном ингибировании ее конститутивной изоформы. Проведен анализ кинетических свойств NOS лимфоцитов крови пациенток с раком яичника. Показано, что при онкопатологии мнимая константа сродства iNOS к L-аргинуину в 5,4 раза ниже, чем для eNOS лимфоцитов крови лиц группы контроля, а ингибирование активности eNOS происходит по неконкурентному типу – за счет снижения числа оборотов энзима.

**Ключевые слова:** NO-синтаза, аргиназа, L-аргинин, оксид азота, лимфоциты, рак яичника.

**PECULIARITIES OF ARGINASE AND NO-SYNTHASE PATHWAYS OF L-ARGININE METABOLISM IN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES OF PATIENTS WITH OVARIAN CANCER**

*O. I. Yakubets, R. V. Fafula, D. Z. Vorobets, Z. D. Vorobets*

Danylo Halytski Lviv National Medical University, Ukraine;  
e-mail: vorobets@meduniv.lviv.ua

The peculiarities of arginase and NO-synthase pathways of L-arginine metabolism in peripheral blood lymphocytes of patients with ovarian cancer were studied. It was shown that the development of cancer pathology is associated with an imbalance in the NO synthesis in blood lymphocytes. The reason for such imbalance is the activation of arginase and inducible isoform of NO-synthase (iNOS) and significant inhibition of its constitutive isoform. The analysis of the kinetic properties of NOS of blood lymphocytes of patients with ovarian cancer was carried out. It was shown that the affinity constant of iNOS affinity for L-arginine is 5.4-fold lower than for eNOS of blood lymphocytes of persons in the control group. The inhibition of eNOS occurs via non-competitive type and is related to the reduction of maximum reaction rate.

**Key words:** NO-synthase, arginase, L-arginine, nitric oxide, lymphocytes, ovarian cancer.

1. Фукузова К., Козуре К., Морита М. и др. // Биохимия. – 2004. – **69**, № 1. – С. 64–73.
2. Fukumura D., Kashiwagi S., Jain R. K. // Nat. Rev. Cancer. – 2006. – **6**, N 7. – P. 521–534.
3. Каримов Х. Я., Иноятова Ф. Х., Мухамедова М. Т. // Врач. дело. – 2002. – № 7. – С. 90–92.

4. Реутов В. П. // Биохимия. – 2002. – **67**, вып. 3. – С. 353–376.
5. Лю М. Б., Подобец И. С., Едыгенова А. К. и др. // Усп. соврем. биол. – 2004. – **124**, № 4. – С. 329–341.
6. Hofseth L. J., Hussain S. P., Wogan G. N. et al. // Free Radic. Biol. Med. – 2003. – **34**. – P. 955–968.
7. Crowell J. A., Steele V. E., Sigman C. C et al. // Mol. Cancer Ther. – 2003. – **2**. – P. 815–823.
8. Степанов Ю. М., Кононов И. Н., Журбина А. И. // Журн. АМН України. – 2004. – № 10. – С. 340–352.
9. Бродяк І. В., Сибірна Н. О. // Фізіол. журн. – 2008. – **54**, № 1. – С. 63–68.
10. Рак в Україні 2009–2010. Захворюваність, смертність, показники діяльності онкологічної служби // Бюл. нац. канцерреєстру в Україні. – 2011. – № 12. – С. 61–62.
11. Михановский А. А., Слободянюк О. В. // Междунар. мед. журн. – 2012. – № 2. – С. 85–89.
12. Бучинська Л. Г., Несіна І. П., Ткаченко Н. І. та ін. // Онкологія. – 2002. – **4**, № 1. – С. 18–20.
13. Луговський С. П. // Лабор. діагностика. – 2002. – № 2. – С. 29–32.
14. Воут А. // Scand. J. Clin. Lab. Invest. – 1968. – **21** (Supp. 97). – P. 77–79.
15. Фафула Р. В., Єфремова У. П., Личковська Н. Е. та ін. // Вісник проблем біології та медицини. – 2012. – **4**, Т. 1 (96). – С. 163–166.
16. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. et al. // J. Biol. Chem. – 1951. – **193**. – P. 265–275.
17. Ochoa J. B., Bernard A. S., O'Brien W. E. et al. // Ann. Surg. – 2001. – **233**, N 3. – P. 393–399.
18. Сибірна Н. О., Маєвська О. М., Барська М. Л. Дослідження окремих біохімічних показників за умов оксидативного стресу. – Львів: Видав. центр імені Івана Франка, 2006. – 60 с.
19. Костерин С. А., Бурчинская Н. Ф. // Укр. біохім. журн. – 1987. – **59**, № 2. – С. 66–69.
20. Келети Т. / Основы ферментативной кинетики: Пер. с англ. – М: Мир, 1990. – 350 с.
21. Saluja R., Jyoti A., Chatterjee M. et al. // Biochim. Biophys. Acta. – 2011. – **1813**, N 10. – P. 1700–1707.
22. Ridnour L. A., Thomas D. D., Donzelli S. et al. // Antioxid. Redox Signal. – 2006. – **8**, N 7–8. – P. 1329–1337.
23. Nomellini R. S., de Abreu Ribeiro L. C., Tavares-Murta V. M. et al. // Mediators Inflamm. – 2008. – **5**. – P. 33–37.



24. *Malone J. M., Saed G. M., Diamond M. P.* // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 2006. – **194**, N 4. – P. 1110–1116.
25. *Chen T., Nines R. G., Peschke S. M. et al.* // *Cancer Res.* – 2004. – **64**. – P. 3714–3717.
26. *Melichar B., Hu W., Patenia R. et al.* // *J. Transl. Med.* – 2003. – **1**, N 1. – P. 5.
27. *Polat M. F., Taysi S., Polat S. et al.* // *Surg. Today.* – 2003. – **33**. – P. 655–661.
28. *Арзамасцев А. П., Северина И. С., Григорьев Н. Б. и др.* // *Вест. РАМН.* – 2003. – **12**. – С. 88–95.
29. *Кратенко Р.* // *Укр. радіол. журн.* – 2006. – № 14. – С. 264–267.
30. *Jenkins D. C., Charles I. G., Thomsen L. L. et al.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1995. – **92**, N 10. – P. 4392–4396.
31. *Morris S. M.* // *J. Nutr.* – 2004. – **134**, N 10. – P. S2743–S2747.
32. *Blachier F., Mignon A., Soubrane O.* // *Nitric Oxide.* – 1997. – **1**, N 3. – P. 268–272.
33. *Mori M., Gotoh T.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2000. – **275**. – P. 715–719.
34. *Popovic P. J., Zeh H. J., Ochoa J. B.* // *J. Nutr.* – 2007. – **137**. – P. 1S–1686S.
35. *Morris S. M.* // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2006. – **83**. – P. 508–512.
36. *Ванин А. Ф.* // *Биофизика.* – 2001. – **46**, № 4. – С. 631–641.
37. *Глазев А. А., Смирнов В. Ю., Каравай А. В. и др.* // *Труды Белорусского государственного университета: научный журнал.* – 2007. – **2**, Ч. 1. – С. 131–139.
38. *Grigoryan R. S., Panosyan E. H., Seibel N. L. et al.* // *In Vivo.* – 2004. – **18**, N 2. – P. 107–112.
39. *Wu G., Morris S. M. J.* // *Biochem. J.* – 1998. – **336**, N 1. – P. 1–17.
40. *Scott L., Lamb J., Smith S. et al.* // *Br. J. Cancer.* – 2000. – **83**, N 6. – P. 800–810.

Отримано 28.02.2013