

Ключові слова: синдром подразненого кишечника, метопролол, артеріальний тиск, індекс маси серця

CARDIOVASCULAR EFFECTS OF B-BLOCKER METOPROLOL IN EXPERIMENTAL MODEL OF IRRITABLE BOWEL SYNDROME IN RATS

Dorofeyev A.E., Rassokhina O.A., Tarasova V.I., Osadchaja V.O., Butova A.Y.

Summary. In an experimental model of irritable bowel syndrome in rats have shown that irritable bowel syndrome associated with hypertension. Negative effect of metoprolol for irritable bowel syndrome was found, it consists in shortening the term of development and further more severe course of the irritable bowel syndrome. Cardioprotective effect of metoprolol was also revealed.

Key words: irritable bowel syndrome, metoprolol, blood pressure, heart weight index

Отримано до редакції 19.04.2013 р.

УДК 616-092.4

РОЛЬ ЛАКТАТА В АДЕНОЗИНЕРГИЧЕСКОЙ ИММУНОСУПРЕССИИ

Шатова О.П.

Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького

Резюме. Нами показано, что лактат натрия дозозависимо увеличивает активность АДА в эритроцитах здоровых женщин и больных раком молочной железы. Увеличение концентрации лактата при опухолевом росте может носить защитный механизм, который определяет активность АДА и соответственно иммунологический надзор. 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.

Ключевые слова: лактат, аденозин, рак молочной железы, «парадокс Хелстрома»

В результате дефосфорилирования аденозинмонофосфата (АМФ) образуется иммуносупрессор – аденозин, который играет важную роль в опухолевой прогрессии [1]. Согласно данным De Pierree образование аденозина связано с активностью 5-нуклеотидазы (CD 73), данный фермент связан с внешней стороной плазматической мембраны и является эктоферментом. Мишенью для антиаденозинергической терапии также может быть и другой эктофермент – трифосфат-

дифосфогидролаза (CD 39). В настоящее время создаются новые анти-гипокси-аденозиновые технологии (НьюВак) – это лекарства и вакцины против рака. Установлено, что в лимфоцитах активность АДА связана с активностью дипептидилпептидазы (CD 39) [2].

Продуктами аденозиндезаминазной реакции является инозин и аммиак. Характерной чертой злокачественного роста является увеличение активности АДА как в опухолевом узле, так и в смежных с опухолью тканях [3, 12]. Кроме этого активность АДА при злокачественном росте повышена как в Т-регуляторных, так и Т-эффекторных клетках [2].

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 [4]. Транспорт аденозина из клетки усиливается в условиях ацидоза, что может быть обусловлено избытком лактата в опухоли [5].

Аденозин – является сигнальной молекулой [6]. Передача клеточных сигналов аденозина происходит через 4 типа аденозиновых рецепторов: A1, A2A, A2B, и A3. Рецепторы A2A и A2B сопряжены с Gs протеином, что приводит к стимуляции аденилатциклазы, а рецепторы A1 и A3 сопряжены с Gi протеином, который подавляет аденилатциклазную активность [7]. В любом случае аденозин изменяет концентрацию цАМФ внутри клетки.

При опухолевом росте наблюдается аденозинергическая иммуносупрессия или «парадокс Хеллстрёма». Показано, что гипоксия приводит к стабилизации гипоксия-индуцибельного фактора 1 α (HIF-1 α), а данный фактор в свою очередь модулирует синтез ферментов метаболизма аденозина: увеличивает экспрессию эктофермента – 5-нуклеотидазы и подавляет образование аденозинкиназы. Таким образом, HIF-1 α 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 A2A-рецепторами противоопухолевых клеток (Т-киллеры), что приводит к увеличению в них концентрации цАМФ и снижению синтеза и

секреции интерферона- γ [8]. Данные метаболические изменения приводят к нарушению иммунного ответа и опухолевой прогрессии [5].

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 [13].

Таким образом, в опухоли увеличена концентрация аденозина, активность АДА, а также уровень лактата, который может влиять на метаболизм данного нуклеозида. В современных научных обзорах лактат уже представляют как «новую сигнальную молекулу» [9], регулируемую не только активностью некоторых ферментов, но и экспрессию генов, и синтез некоторых цитокинов [10]. Следовательно, логично предположить, что молекула лактата способна оказывать выраженное влияние и на онкогенез [11], через модуляцию активности АДА.

Цель исследования. Установить влияние лактата на активность АДА в эритроцитах здоровых и больных раком молочной железы.

Материал и методы

Использовали гемолизат 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 были опытными и 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 течении 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 гемолизировали эритроциты. Активность АДА определяли в гемолизате 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 Specord-200.

Статистический анализ результатов проведен с использованием лицензионного пакета прикладных программ Statistica-6.0 (StatSoft). Данные в таблицах и по тексту представлены в виде средних значений (М) и их стандартных отклонений (σ). Статистические характеристики распределения на графиках представлены в виде средних значений (М) и их стандартных ошибок (m).

Различия между частотами регистрации клинических признаков заболевания считали достоверными при $p < 0,05$ (двусторонний критерий).

Результаты и их обсуждение

В модельных экспериментах определяли активность АДА в гемолизатах при добавлении различных концентраций лактата натрия (лития).

При добавлении к гемолизатам 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.

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 гемолизата без добавок лактата.

При дальнейшей увеличении концентрации лактата натрия в гемолизате 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 гемолизатом, не содержащим добавки лактата.

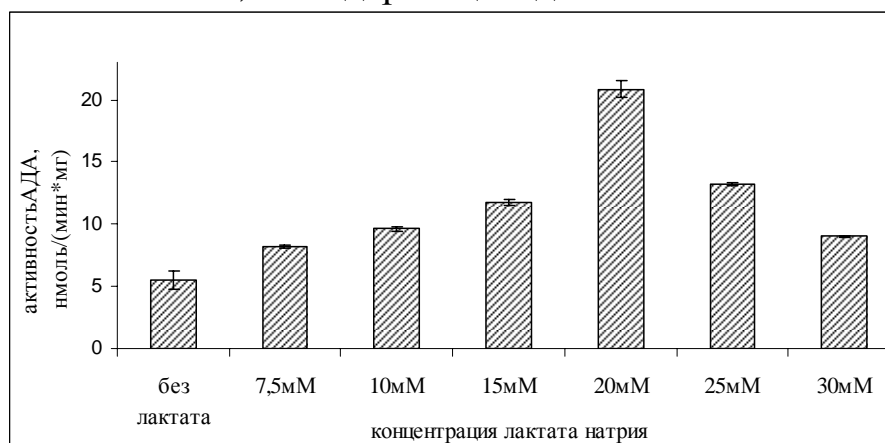


Рис. 1. Активность АДА в гемолизате эритроцитов здоровых женщин при различных концентрациях лактата натрия

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

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.

Таблица 1. Активность АДА в гемолизате эритроцитов в норме и у больных раком молочной железы при различных концентрациях лактата натрия ($M \pm \sigma$)

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

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

Выводы

Обнаружено, что при добавлении солей лактата происходит дозозависимо увеличивает активность АДА в гемолизате эритроцитов как здоровых так и больных РМЖ и максимальный активирующий эффект обнаружен в пробе где концентрация лактата была 20 мМ. Гиперэкспрессия и активация гликолитических ферментов, которая сопровождается избыточным образованием лактата оказывающим активирующее влияние на АДА в концентрации до 20 мМ, может быть механизмом защиты против аденозинергической иммуносупрессии. Активируя дезаминирование аденозина и соответственно уменьшая концентрацию его внеклеточнолактат положительно влияет на функцию Т-киллеров, которые отвечают за распознавание и уничтожение опухолевых клеток. То есть, избыток лактата (до определенной концентрации – 20 мМ) может носить адаптивный защитный механизм. При дальнейшем же повышении лактата, его стимулирующее влияние на АДА активность снижается.

ЛИТЕРАТУРА

1. 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. – Vol. 53, № 2. – P. 269–278.
2. Mandapathil M. CD26 expression and adenosine deaminase activity in regulatory T cells (Treg) and CD4(+) T effector cells in patients with head and neck squamous cell carcinoma / M. Mandapathil, M. Szczepanski, M. Narasymczuk [et al.] // *Oncoimmunology*. – 2012. – Vol. 1, № 5. – P. 659–669.
3. 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.
4. Mammalian nucleoside transporters / W Kong, K. Engel, J. Wang // *Curr. Drug. Metab.* – 2004. – Vol. 5 (1). – P. 63–84.
5. Hypoxia-adenosinergic immunosuppression: tumor protection by T regulatory cells and cancerous tissue hypoxia / M. V. Sitkovsky, J. Kjaergaard, D. Lukashev [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 2008. – Vol. 14, № 19. – P. 5947–5952.
6. [6] Görlach A. Control of adenosine transport by hypoxia / A. Görlach // *Circulation Research*. – 2005. – Vol. 97. – P. –3
7. 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. – Vol. 226. – P. 2438–2447.

8. The A2aR adenosine receptor controls cytokine production in iNKT cells / M. Nowak, L. Lynch, S. Yue [et al.] // Eur. J. Immunol. – 2010. – Vol. 40, № 3. – P. 682–687.
9. Philp A. Lactate-a signal coordinating cell and systemic function / A. Philp, A. L. Macdonald, P. W. Watt // J. Exp. Biol. – 2005. – Vol. 208, Pt. 24. – P. 4561–4575.
10. Gladden L. B. Current trends in lactate metabolism: introduction / L. B. Gladden // Med. Sci. Sports Exerc. – 2008. – Vol. 40, № 3. – P. 475–476.
11. Garber K. Energy boost: the Warburg effect returns in a new theory of cancer / K. Garber // J. Natl. Cancer Inst. – 2004. – Vol. 96, № 24. – P. 1805–1806.
1. Adenosine deaminase activity in the serum and malignant tumors of breast cancer: the assessment of isoenzyme ADA1 and ADA2 activities / M. Aghaei, F. Karami-Tehrani, S. Salami [et al.] // Clin. Biochem. – 2005. – Vol. 38, № 10. – P. 887–891.
2. Mueller-Klieser W. Metabolic micromilieu in tumours / W. Mueller-Klieser // Nuklearmedizin – 2010. – Vol. 49, № 1. – P. 16–20.

РОЛЬ ЛАКТАТУ В АДЕНОЗИНЕРГІЧНОЇ ІММУНОСУПРЕСІЇ

Шатова О.П.

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

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

THE ROLE OF LACTATE IN ADENOSINERGIC IMMUNOSUPPRESSION

Shatova O.P.

Summary. It is showed by us, that the sodium of lactate increases activity of ADA in the erythrocytes of healthy women and patients of the breast cancer by dose-dependent manner. The increasing of lactate concentration upon tumor growth can carry a immune mechanism which determines activity of ADA and accordingly immunological supervision. A maximal stimulant effect is detected during the eventual concentration of lactate – 20 mM. ADA from the erythrocytes of BC patients is less sensible to influence of lactate, what ADA from the erythrocytes of healthy.

Key words: lactate, adenosine, breast cancer, "Hellstrom paradox"

Отримано до редакції 17.04.2013 р.