АНОТАЦІЯ

Бариляк Р.В. «Особливості функціонування Ca^{2+}-залежних регуляторних систем лімфоцитів крові жінок хворих на рак яєчника» - кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 222 Медицина. – Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, Львів, 2021.

Дисертацію присвячено вивченню основних Ca^{2+}-залежних регуляторних систем лімфоцитів крові жінок хворих на рак яєчника (РЯ) – Ca^{2+}-активованих, Mg^{2+}-залежних АТФ-гідролазних, аргіназо-NO-синтазної та глутатіонової антиоксидантної з метою встановлення їх діагностичної цінності, що має суттєве значення для охорони здоров'я.

З метою діагностики та постопераційного лікування РЯ використовують визначення специфічного антигена в сироватці крові СА-125. Результати визначення концентрацій пухлинного маркера СА-125 в сироватці крові практично здорових жінок і хворих на рак яєчника свідчать про те, що за фізіологічної норми в залежності від віку концентрація антигена складає (26,1 - 35,9) Од/мл. З розвитком раку яєчника (від 1 до IV стадії) спостерігалось зростання концентрації СА-125 від (146,2±12,1) до (2865,0±217,4) Од/мл. Доведено, що існує позитивна кореляція між клінічною стадією РЯ і рівнем СА-125. Однак, можливості використання цього тесту при ранньому виявленні захворювання, диференційній діагностиці, прогнозуванні перебігу хвороби досить обмежені і вимагають подальшого більш детального пошуку інших потенційних маркерів.

У цьому плані нами встановлено, що додатковими потенційними маркерами РЯ також можуть слугувати співвідношення нейтрофілів до лімфоцитів та активність мієлопероксидази.

Відомо, що інтенсифікація перксидації ліпідів в мембранах призводить до накопичення токсичних продуктів, що призводить до зниження резистентності організму. Важливе місце серед АОС клітини займає система глутатіону. Хоча ця система є об'єктом багатьох досліджень, в літературі немає одностайної думки щодо її ролі в розвитку патологічних станів, зокрема злоякісного росту.

Нами показано активацію процесів ПОЛ, за визначенням концентрації малонового діальдегіду, при РЯ як у сироватці, так і у лімфоцитах крові, в 1,6 раза ($p<0,001$). Слід відмітити, що пероксидація ліпідів чутлива до концентрації Ca^{2+} в інкубаційному середовищі. Так, за присутності 0,5 мМ Ca^{2+} в інкубаційному середовищі пероксидація ліпідів інтенсифікується в 1,6 раза ($p<0,001$). Однак, це не є фізіологічні внітнішньоклітинні концентрації іонізованого кальцію. Вони перевищують їх більш як на два порядки.

Одночасно з інтенсифікацією процесів ПОЛ, виявлені відповідні зміни і в активності ензимів системи глутатіону. Так, у практично здорових жінок концентрація відновленого глутатіону складає (17,8±1,6) нмоль/мг протеїну. При РЯ ця величина зростає в 1,4 раза щодо контролю ($p<0,05$). Також, виявлено, що при РЯ активність глутатіонпероксидази достовірно знижується в 1,6 раза ($p<0,001$). Щодо активності глутатіонредуктази, то при РЯ ця активність знижується в 1,4 раза щодо контролю ($p<0,05$). При розвитку РЯ (III-IV стадія) активність глутатіон-S трансферази зростає в 1,2 раза, проте ці зміни не є статистично достовірними ($p>0,05$).

Таким чином, при розвитку РЯ суттєво знижуються активності двох основних антиоксидантних ензимів – глутатіонпероксидази та глутатіонредуктази.

Відомо, що іонізований Ca^{2+} відіграє ключову роль в регуляції практично всіх внутрішньоклітиних процесів, включаючи пухлинний ріст, проліферацію клітин, апоптоз тощо. Важлива роль у підтриманні внутрішньоклітинного гомеостазу Ca^{2+} відводиться Ca^{2+},Mg^{2+}-АТФазам плазматичної мембрани та ендоплазматичного ретикулуму, функції яких полягають у зниженні концентрації даного іону в цитозолі. У результаті проведених досліджень встановлено, що Ca^{2+},Mg^{2+}-АТФазна активність плазматичної мембрани

лімфоцитів крові практично здорових жінок становила (2,79±0,27) мкмоль P_i/хв·мг протеїну. У пацієнтів з РЯ (III і IV стадія) Ca^{2+},Mg^{2+}-АТФазна активність плазматичної мембрани лімфоцитів крові достовірно відрізнялась від фізіологічної норми - знижувалась в 1,6 та 1,8 раза, відповідно, ($p<0,05$), порівняно з фізіологічною нормою. Зниження Ca^{2+},Mg^{2+}-АТФазної активності плазматичної мембрани лімфоцитів крові пацієнтів з РЯ є одним із свідчень про зростання $[Ca^{2+}]_i$ у цитозолі лімфоцитів.

Для визначення основних кінетичних параметрів гідролізу АТФ за участі Ca^{2+},Mg^{2+}-АТФази плазматичної мембрани лімфоцитів крові пацієнтів з РЯ та з'ясування можливого механізму зміни ензиматичної активності цих АТФ-гідролазних систем криві концентраційних залежностей було лінеаризовано у координатах Лайнуівера-Берка. Встановлено, що значення максимальної швидкості гідролізу АТФ Ca^{2+},Mg^{2+}-АТФазою плазматичної мембрани лімфоцитів крові практично здорових жінок становила становила (2,89±0,27) мкмоль P_i/хв·мг протеїну. Максимальна швидкість АТФазної реакції за участі Ca^{2+},Mg^{2+}-АТФази плазматичної мембрани лімфоцитів крові пацієнтів з РЯ III стадії знижувалась в 1,5 ($p<0,05$), а IV стадії – в 1,6 раза ($p<0,05$).

Зясування значень констант спорідненості (афінності) показало, що ці величини знаходяться в субмілімолярному діапазоні концентрацій, що відповідає фізіологічній концентрації [Mg·АТФ] у цитоплазмі клітин (0,5 – 5 мМ). У здорових осіб за умов фізіологічної норми константа спорідненості Ca^{2+},Mg^{2+}-АТФази плазматичної мембрани до АТФ становила (0,17±0,02) мМ. Константи спорідненості Ca^{2+},Mg^{2+}-АТФази плазматичної мембрани лімфоцитів до АТФ у пацієнтів з РЯ (III і IV стадіяї) у 2,0-2,1 раза перевищували ці значення для лімфоцитів крові осіб групи фізіологічної норми ($p<0,001$). Можна зробити висновок, що інгібування активності досліджуваних ензиматичних систем відбувається як за рахунок зменшення кількості обертів ензиму (максимальна швидкість гідролізу АТФ знижувалась), так і за рахунок зниження афінності Ca^{2+},Mg^{2+}-АТФаз до субстрату (константа спорідненості до АТФ зростала).

Одночасно встановлено, що Ca^{2+},Mg^{2+}-АТФазна активність мембран ЕПР лімфоцитів крові практично здорових осіб становила (2,25±0,17) мкмоль P_i/хв· мг протеїну. У пацієнтів з РЯ Ca^{2+},Mg^{2+}-АТФазна активність мембран ЕПР лімфоцитів крові статистично достовірно відрізнялась від контрольної групи, тобто знижувалась в 1,5 раза ($p<0,001$), порівняно з практично здоровими особами. Отримані нами дані свідчать про те, що пригнічення АТФ-гідролазної активності Ca^{2+},Mg^{2+}-АТФази плазматичної мембрани лімфоцитів крові має більш виражений характер, ніж Ca^{2+},Mg^{2+}-АТФази мембран ЕПР. Зниження Ca^{2+},Mg^{2+}-АТФазної активності плазматичної мембрани і мембран ЕПР лімфоцитів крові пацієнтів з РЯ свідчить про зростання $[Ca^{2+}]_i$ у цитозолі лімфоцитів.

Ca^{2+},Mg^{2+}-АТФаза для перенесення йонів проти їх електрохімічного градієнта використовує енергію гідролізу АТФ. Тому зміни концентрації АТФ в інкубаційному середовищі впливатимуть на швидкість АТФ-гідролазної реакції.

Показано, що збільшення концентрації АТФ в інкубаційному середовищі в діапазоні концентрацій від 0,1 до 4,0 мМ призводить до поступового монотонного зростання Ca^{2+},Mg^{2+}-АТФазної активності мембран ЕПР лімфоцитів крові практично здорових осіб з наступним виходом на плато. Максимальні значення АТФ-гідролазної активності Ca^{2+},Mg^{2+}-АТФази мембран ЕПР лімфоцитів крові здорових осіб та пацієнтів з РЯ відмічались при концентрації АТФ 4 мМ в середовищі інкубації. Вивчення концентраційної залежності Ca^{2+},Mg^{2+}-АТФазної активності від АТФ свідчить, що у всьому діапазоні досліджуваних концентрацій субстрату активність Ca^{2+},Mg^{2+}-АТФази мембран ЕПР пацієнтів із РЯ була зниженою порівняно з групою контролю.

Визначення основних кінетичних параметрів гідролізу АТФ за участі Ca^{2+},Mg^{2+}-АТФази мембран ЕПР лімфоцитів крові показало, що у практично здорових осіб максимальна швидкість Ca^{2+},Mg^{2+}-АТФазної реакції мембран ЕПР становила (2,2±0,2) мкмоль P_i/хв· мг протеїну. Максимальна швидкість АТФазної реакції за участі Ca^{2+},Mg^{2+}-АТФази ЕПР лімфоцитів крові пацієнтів з РЯ знижувалась щодо контрольних значень в 1,3 раза ($p<0,05$). Водночас

значення константи афінності Ca^{2+},Mg^{2+}-АТФаз до АТФ обох досліджуваних груп також статистично достовірно відрізнялись між собою, що свідчить про різну їх спорідненість до субстрату. Величина константи афінності до АТФ Ca^{2+},Mg^{2+}-АТФази мембран ЕПР лімфоцитів крові пацієнтів з РЯ у 2,15 раза перевищувала ці значення для лімфоцитів крові практично здорових осіб ($p<0,001$).

В цілому, отримані величини константи афінності знаходяться в субмілімолярному діапазоні концентрацій, що відповідає концентрації [Mg·АТФ] у цитоплазмі клітин (0,5 – 5 мМ).

Отримані дані свідчать, що інгібування активності досліджуваних ензиматичних систем відбувається як за рахунок зменшення кількості обертів ензиму (максимальна швидкість гідролізу АТФ знижувалась), так і за рахунок зниження афінності Ca^{2+},Mg^{2+}-АТФаз до субстрату (константа спорідненості до АТФ зростала).

Вивчення аргіназної активності при патологічних станах викликає значний інтерес у дослідників, першою чергою тому, що аргіназа конкурує з ізоформами NO-синтази за субстрат L-аргінін.

Показано, що аргіназна активність в лімфоцитах крові практично здорових осіб становить (131,3±9,7) нмоль сечовини/хв· мг протеїну. У пацієнток з РЯ вона підвищується в 3,1 раза щодо фізіологічної норми ($p<0,001$). Зростання аргіназної активності відмічається при цілому ряді інших онкопатологій, причому характер змін активності аргінази часто залежить від стадії новоутворення та типу тканини.

Розрахунок кінетичних параметрів активності аргінази свідчить про те, що максимальна швидкість гідролізу L-аргініну лімфоцитами крові хворих на РЯ, визначена за L-аргініном, становить різницю стосовно фізіологічної норми приблизно в 2,6 раза ($p<0,001$). Константа спорідненості до L-аргініну у лімфоцитах хворих на РЯ також зростає у 2,1 раза у порівнянні з контрольною групою ($p<0,001$). Отже, при інтерпритації отриманих даних з урахуванням кінетичних параметрів, визначених за L-аргініном, можна дійти висновку, що за умов розвитку РЯ в імунокомпетентних клітинах зростання активності

досліджуваної ензиматичної системи відбувається за рахунок збільшення числа обертів ензиму (величина V_{max} зростає), хоча спорідненість субстрату до ензиму суттєво зменшується.

На відміну від іонів мангану, судячи з даних літератури, аргіназа не є Ca^{2+}-залежним ензимом. Однак, ми продемонстрували, що додавання в інкубаційне середовище 0,5 мМ Ca^{2+} (оптимальна концентрація, що активує пероксидацію ліпідів) призводить до достовірного зростання активності аргінази в лімфоцитах як у контрольній групі, так і при раку яєчника. Ймовірно іони Ca^{2+} призводять до зростання ензиматичної активності опосередковано через інші ензиматичні системи.

Дослідження показали, що інгібування активності аргінази призводить до підвищення продукції NO ендотелієм, а наявність аргінази в ендотеліальних клітинах слугує обмежувачем доступності субстрату для оксиду азоту.

Встановлено, що активність cNOS лімфоцитів крові практично здорових жінок становить (71,4±6,9) нмоль $NADPH(H^+)$/хв· мг протеїну. Аналіз літературних даних свідчить про значну варіабельність абсолютних значень ензиматичної активності NOS лімфоцитів крові, що, ймовірно, обумовлено різноманітними методологічними підходами до вивчення активності ензиму.

В лімфоцитах крові пацієнток з РЯ активність cNOS знижується в 4,1 раза щодо контрольної групи ($p<0,001$). Індуцибельна ізоформа NOS є кальцій-незалежною і, на відміну від конститутивної ізоформи NOS, не експресується постійно (конститутивно).

Виявлено, що активність iNOS лімфоцитів крові практично здорових жінок ідентифікується в незначній мірі, практично на межі похибки, та становить (1,42±0,18) нмоль $NADPH(H^+)$/хв· мг протеїну. На фоні інгібування cNOS у лімфоцитах крові пацієнток з РЯ спостерігається різке зростання активності iNOS - в 155 раз ($p<0,001$). Зростання активності iNOS свідчить про гіперпродукцію NO в лімфоцитах крові за умов розвитку онкопатології. Оксид азоту, що утворюється у надмірній кількості при патологічних станах організму, має виражену цитотоксичну дію внаслідок утворення пероксинітриту – продукту взаємодії NO та супероксиданіон-радикала,

здатного до деструкції практично всіх компонентів клітини. Показано, що клітини, в яких відмічено зростання концентрації NO мають підвищену швидкість росту [143].

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 (τ). Для встановлення цих кінетичних параметрів NOS, досліджували динаміку зменшення NADPH(H^+), що свідчить про синтез NO. Кінетика утворення NO, за участю cNOS узгоджується із закономірностями реакції нульового порядку в діапазоні 0 – 20 хв. Виявлено, що динаміка і кількість утворення NO за участю cNOS лімфоцитів крові пацієнток з РЯ є суттєво нижчими ніж у практично здорових осіб. Водночас, у всьому діапазоні фактора часу утворення NO за участю iNOS лімфоцитів крові хворих з РЯ значно перевищує ці величини для cNOS.

Значення кінетичних параметрів для cNOS та iNOS лімфоцитів крові практично здорових жінок і хворих на РЯ істотно відрізняються між собою. Так, V_0 для cNOS контрольної групи складає (94,0±7,4) нмоль NADPH(H^+)/хв· мг протеїну. У хворих на РЯ V_0 суттєво знижувалось – у 5,0 раза ($p<0,001$). Синтез NO за участю iNOS, яка активується при РЯ, відбувається значно інтенсивніше ніж за участю cNOS, V_0 зростає в 7,9 раза ($p<0,001$). Щодо максимальної кількості утвореного продукту реакції, продукованого в cNO-синтазній реакції, то при РЯ його утворювалось в 3,8 менше, ніж у контрольній групі ($p<0,001$). В iNO-синтазній реакції P_{max} при РЯ була в 6 разів вищою, ніж в cNO-синтазній реакції ($p<0,001$). При аналізі характеристичного часу реакції було з’ясовано, що при РЯ він зростав в 1,4 раза ($p<0,05$). Отримані кінетичні параметри підтверджують дані, що у лімфоцитах крові хворих на РЯ гіперсинтез NO відбувається за участю iNOS, а “базальний” синтез NO в нормальних фізіологічних умовах відбувається за участю cNOS.

Зміни концентрації L-аргініну в інкубаційному середовищі, вірогідно, впливають на швидкість NO-синтазної реакції. З’ясовано, що підвищення концентрації L-аргініну в середовищі інкубації в діапазоні концентрацій від 0,1

до 30 мкМ призводить до поступового зростання швидкості NO-синтазної реакції за участю обох ізоформ NOS з виходом на плато. Однак, активність cNOS лімфоцитів крові пацієнток з РЯ виходить на плато за значно нижчих концентрацій субстрату.

Виявлено, що значення V_{max} для cNOS лімфоцитів крові осіб групи контролю в 1,8 рази перевищує цю величину для cNOS лімфоцитів крові пацієнток з РЯ ($p<0,001$). Водночас, значення $K_{L\text{-}Arg}$ для всіх досліджуваних груп достовірно не відрізняються між собою, що свідчить про те, що за наявності онкопатології спорідненість cNOS до L-аргініну практично не змінюється. V_{max} для iNOS, активованої за онкопатології, істотно не відрізняється від цієї величини для cNOS лімфоцитів крові групи контролю. Проте, iNOS лімфоцитів крові пацієнток з РЯ характеризується значно вищою спорідненістю до L-аргініну: величина $K_{L\text{-}Arg}$ для iNOS є нижчою в 5,4 рази ніж для cNOS лімфоцитів крові осіб групи контролю ($p<0,001$).

Отже, при інтерпретації отриманих кінетичних параметрів, визначених за L-аргініном, показано, що за онкопатології уявна константа спорідненості iNOS до L-аргініну в 5,4 рази нижча ($p<0,001$) ніж для cNOS лімфоцитів крові осіб групи контролю, а інгібування активності cNOS відбувається за конкурентним типом – за рахунок зниження числа обертів ензиму. Отже, за умов розвитку онкопатології порушується співвідношення NO-синтазного та аргіназного метаболізму L-аргініну, що свідчить про дисметаболічні зміни в системі синтезу NO, а саме його гіперпродукцію.

Таким чином, в дисертаційній роботі встановлено механізми дисфункції досліджуваних АТФазних систем лімфоцитів крові пацієнтів хворих на рак яєчника, які полягають у зменшенні числа обертів ензимів та зниженні їх афінності до субстрату. З’ясовано, що під час розвитку злоякісної трансформації яєчника в лімфоцитах крові відбувається зростання активності аргінази, за рахунок збільшення числа обертів ензиму. Одночасно відбувається зниження активності cNOS та багатократне зростання активності iNOS. Кінетичний аналіз свідчить, що зростання активності iNOS відбувається за захунок збільшення числа обертів ензиму та зростання його спорідненості до

субстрату. На фоні порушень у функціонуванні Ca^{+}-залежних АТФ-гідролазних та аргіназа/NO-синтазної систем спостерігається зростання пероксидації ліпідів і зниження активності глутатіонової антиоксидантної системи. Результати проведених досліджень розкривають раніше невідомі біохімічні та патофізіологічні механізми змін у лімфоцитах при розвитку рака яєчника і доповнюють відомості про регуляцію функціонування клітин.

Ключові слова: Ca^{2+},Mg^{2+}-АТФази, NO-синтази, пероксидація ліпідів, глутатіонпероксидаза, глутатіонредуктаза, глутатіон-S трансфераза, лімфоцити, рак яєчника.

SUMMARY

Barylyak RV. «Peculiarities of the functioning of Ca^{2+}-dependent regulatory systems of blood lymphocytes of women with ovarian cancer» – qualifying scientific work on the right of manuscript.

Dissertation for the PhD degree (PhD) in specialty 222 Medicine – Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Lviv, 2021.

The dissertation is devoted to the study of the main Ca^{2+}-dependent regulatory systems of blood lymphocytes of women with ovarian cancer (OC) Ca^{2+}-activated, Mg^{2+}-dependent ATP-hydrolase, arginase-NO-synthase and glutathione antioxidant.

In order to diagnose and perform postoperative treatment of OC the determination of specific antigen in the serum CA-125 is used. The results of detected concentration of the tumor marker CA-125 in the serum of practically healthy women and patients with ovarian cancer indicate that at physiological norm (20-40 years) the concentration of antigen is (26.1±2.2) U/mlIn the second age group (41-60 years) the concentration of antigen is (35.9±4.3) U/ml. With the development of ovarian cancer (stage 1 to IV), an increase in the concentration of CA-125 from (146.2±12.1) to (2865.0±217.4) U/ml was observed. It is proved that there is a positive correlation between the clinical stage of OC and the level of CA-125. However, the possibilities of using this test at an early stage of disease detection,

differential diagnosis, predicting the course of the disease are quite limited and require further and more detailed search for other potential markers.

In this regard, we found that the ratio of neutrophils to lymphocytes and myeloperoxidase activity can be additional potential markers of OC.

It is known that the intensification of lipid peroxidation in membranes leads to the accumulation of toxic products, which decreases resistance of organism. The glutathione system plays an important role for the AOC of the cell. Although this system is the subject of a great quantity of research, there is no unanumious opinion as to its role in developing pathological conditions, including malignant growth.

In current research, the activation of LP processes by determining the concentration of malonic dialdehyde at OC in both serum and blood lymphocytes in 1.6 times ($p < 0.001$) has been shown. It should be noted that lipid peroxidation is sensitive to the concentration of Ca^{2+} in the incubation mediumThus, the presence of 0.5 mm Ca^{2+} in the incubation medium intensifies lipid peroxidation by 1.6 times ($p<0.001$). However, these are not physiological intracellular concentrations of ionized calcium. They exceed them by more than two orders.

Simultaneously with the intensification of LP processes, corresponding changes of the glutathione system enzymes activity were revealed. hus, in practically healthy women, the concentration of reduced glutathione is (17.8±1.6) nmol/mg protein. This value increases by 1.4 times at OC relative to control ($p<0.05$).

It has been revealed that at OC the activity of glutathione peroxidase is reduced by 1.6 times ($p<0.001$). Regarding the activity of glutathione reductase at OC, it is reduced by 1.4 times relative to control ($p<0.05$). With the development of OC (stage III-IV), the activity of glutathione-s-transferase increases by 1.2 times, but these changes are not statistically significant ($p>0.05$).

Moreover, it was found that the activity of glutathione peroxidase is significantly reduced by 1.6 times at OC ($p<0,001$). Regarding to the activity of glutathione reductase, at OC this activity is reduced by 1.4 times relative to the control ($p<0,05$). With the development of OC (III-IV stage), the activity of glutathione-S transferase increases by 1.2 times, but these changes are not statistically significant ($p>0.05$).

Thus, during the development of OC, the activities of two main antioxidant enzymes, glutathione peroxidase and glutathione reductase, are significantly reduced.

It is known that ionized Ca^{2+} plays a key role in the regulation of almost all intracellular processes, including tumor growth, cell proliferation, apoptosis etc. Ca^{2+},Mg^{2+}-ATPase of the plasma membrane is important in maintaining intracellular Ca^{2+} homeostasis, the function of which is to reduce the concentration of this ion in the cytosol, precicely to transport it against the concentration gradient in the extracellular environment. The activities of Ca^{2+},Mg^{2+}-ATPase of the plasma membrane of lymphocytes of almost healthy women, as well as patients with stage III and IV ovarian cancer have been studied.

As a result of the conducted research, it was established that Ca^{2+},Mg^{2+} -ATPase activity of a plasma membrane of lymphocytes of blood of practically healthy women was (2.79±0.27) μmol Pi/min·mg of protein. In patients with OC (stage III and IV) Ca^{2+}, Mg^{2+}-ATPase activity of the plasma membrane of blood lymphocytes significantly differed from the physiological norm and decreased by1.6 and 1.8 times respectively ($p<0,05$) compared to physiological norm. Decrease of Ca^{2+}, Mg^{2+}-ATPase activity of the plasma membrane of lymphocytes in the blood of patients with OC is one of the indications of [Ca^{2+}] growth in the cytosol of lymphocytes.

To determine the main kinetic parameters of ATP hydrolysis with Ca^{2+}, Mg^{2+}-ATPase of the plasma membrane of blood lymphocytes of patients with OC and to elucidate the possible mechanism of changes in the enzymatic activity of these ATP-hydrolase systems, the concentration-dependence curve was linearized in the Lineweaver–Burk plot. It was found that the value of the maximum rate of hydrolysis of ATP by Ca^{2+}, Mg^{2+}-ATPase of the plasma membrane of lymphocytes in the blood of practically healthy women was (2.89±0.27) μmol Pi/min·mg of protein. The maximum rate of ATPase reaction with the participation of Ca^{2+}, Mg^{2+}-ATPase of the plasma membrane of blood lymphocytes of patients with OC III stage decreased by 1.5 times ($p<0.05$) and with stage IV by 1.6 times ($p <0.05$).

Elucidation of the values of affinity constants showed that these values are in the submillimolar range of concentrations, which corresponds to the physiological

concentration [Mg·ATP] in the cytoplasm of cells (0.5-5 mM). In healthy individuals under conditions of physiological norm, the affinity constant of Ca^{2+}, Mg^{2+}-ATPase of the plasma membrane to ATP was (0.17±0.02) mmol. The affinity constants of Ca^{2+},Mg^{2+}-ATPase of the plasma membrane of lymphocytes to ATP in patients with OC (stage III and IV) were 2.0-2.1 times higher than these values for lymphocytes in the blood of individuals of the physiological group ($p<0.001$). It can be concluded that the inhibition of the activity of the studied enzymatic systems occurs both by reducing the number of enzyme revolutions (maximum rate of ATP hydrolysis decreased) and by reducing the affinity of Ca^{2+}, Mg^{2+}-ATPase to the substrate (ATP affinity constant increased).

As a result of the conducted research it was also established that Ca^{2+}, Mg^{2+}-ATPase activity of endoplasmic reticulum membranes (ER) of lymphocytes of blood of practically healthy person was (2.25±0.17) μmol P_i/min· mg of protein. In patients with OC Ca^{2+},Mg^{2+}-ATPase activity of the ER membranes of blood lymphocytes was statistically significantly different from the control group, i.e. it decreased by 1.5 times ($p<0.001$), compared with practically healthy individuals. The data obtained indicate that the inhibition of ATP-hydrolase activity of Ca^{2+}, Mg^{2+}-ATPase of the plasma membrane of blood lymphocytes is more pronounced than Ca^{2+},Mg^{2+}-ATPase of ER membranes. Decrease of Ca^{2+},Mg^{2+}-ATPase activity of the plasma membrane and of ER membranes of blood lymphocytes of patients with OC indicates the increase of $[Ca^{2+}]$ i in the cytosol of lymphocytes.

Ca^{2+}, Mg^{2+}-ATPase uses the energy of ATP hydrolysis to transfer ions against their electrochemical gradient. Therefore, changes in the concentration of ATP in the incubation medium will affect the rate of ATP-hydrolase reaction.

It is shown that the increase of ATP concentration in the incubation medium in the range of concentrations from 0.1 to 4.0 mM leads to a gradual monotonic growth of Ca^{2+},Mg^{2+}-ATPase activity of the ER membranes of lymphocytes in practically healthy individuals reaching a plateau. The maximum values of ATP-hydrolase activity of Ca^{2+},Mg^{2+}-ATPase of ER membranes of blood lymphocytes of healthy individuals and patients with OC were observed at an ATP concentration of 4 mM in the incubation medium. The study of the concentration dependence of Ca^{2+},Mg^{2+}-

ATPase activity from ATP shows that within the whole range of substrate concentrations investigation the activity Ca^{2+},Mg^{2+}-ATPase membranes of ER membranes of patients with OC was reduced compared to the control group.

Determination of the main kinetic parameters of ATP hydrolysis with the participation of Ca^{2+},Mg^{2+}-ATPase of ER membranes of blood lymphocytes has shown that in almost healthy individuals the maximum rate of Ca^{2+},Mg^{2+}-ATPase reaction of ER membranes was (2.2±0.2) μmol P_i/min· mg of protein. The maximum rate of ATPase reaction involving Ca^{2+},Mg^{2+}-ATPase of the ER of blood lymphocytes of patients with OC decreased relative to control values by 1.3 times ($p<0.05$). At the same time, the values of the affinity constant Ca^{2+},Mg^{2+}-ATPase to ATP of the two studied groups also differed statistically significantly, which indicates their different affinity for the substrate. The value of the affinity constant to Ca^{2+},Mg^{2+}-ATPase of the ER membranes of blood lymphocytes of patients with OC was 2.15 times higher than these values for blood lymphocytes of almost healthy individuals ($p<0.001$).

In general, the obtained values of the affinity constant are in the submilimolar range of concentrations, which corresponds to the concentration of [Mg·ATP] in the cytoplasm of cells (0.5-5 mM).

The obtained data indicate that the inhibition of the activity of the studied enzymatic systems occurs both by reducing the number of revolutions of the enzyme (maximum rate of ATP hydrolysis decreased) and by reducing the affinity of Ca^{2+},Mg^{2+}-ATPase to the substrate (affinity constant to ATP increased).

The study of arginase activity at pathological conditions has been a considerable interest of researchers, primarily because arginase competes with NO-synthase isoforms for the substrate L-arginine.

It has been shown that arginase activity in the lymphocytes of practically healthy individuals is (131.3±9.7) nmol of urea/min mg of protein. In patients with OC it increases by 3.1 times relative to the physiological norm ($p<0.001$). The increase in arginase activity is observed in a number of other oncopathologies, and the nature of changes in arginase activity often depends on the stage of the tumor and the type of tissue.

The calculation of the kinetic parameters of arginase activity indicates that the maximum rate of hydrolysis of L-arginine by lymphocytes of the blood of patients with OC, determined by L-arginine and differer from the physiological norm approximately in 2.6 times ($p<0.001$ The affinity constant to L-arginine in the lymphocytes of patients with OC has been increased by 2.1 times as compared to the control group ($p<0.001$). Therefore, when interpreting the obtained data taking into account the kinetic parameters determined by L-arginine, it can be concluded that under the development of OC in immunocompetent cells, the activity of the studied enzymatic system increases due to increasing the number of enzyme revolutions (V_{max} increases), although the substrate affinity to the enzyme is significantly reduced.

As it is known, arginase, unlike manganese ions, is not a Ca^{2+}-dependent enzyme. However, we have shown that the addition of 0.5 mm Ca^{2+} (optimal concentration that activates lipid peroxidation) to the incubation medium leads to a significant increase in arginase activity in lymphocytes in both the control group and ovarian cancer. Probably Ca^{2+} ions lead to the increase in enzymatic activity indirectly through other enzymatic systems.

The research has shown that inhibition of arginase activity leads to increased production of NO by the endothelium, and the presence of arginase in endothelial cells serves as a limiter of the substrate availability for nitric oxide.

It was found out that the activity of cNOS lymphocytes in the blood of practically healthy women is (71.4±6.9) nmol NADPH(H^+)/min· mg protein. Analysis of data provided in literature shows a significant variability in the absolute values of the enzymatic activity of NOS blood lymphocytes. This is probably due to various methodological approaches to the study of enzyme activity.

In lymphocytes of the blood of patients with OC the activity of cNOS is reduced by 4.1 times in relation to the control group ($p<0,001$). The inducible NOS isoform is calcium-independent and unlike the constitutive NOS isoform is not expressed continuously (constitutively).

It was revealed that the activity of iNOS lymphocytes in the blood of practically healthy women is identified to a small extent almost on the verge of error and has been (1.42±0.18) nmol NADPH(H^+)/min· mg protein. Due to the inhibition

of cNOS in the blood lymphocytes of patients with OC, a sharp increase in iNOS activity up to 155 times ($p<0,001$) occurs. Зростання активності iNOS свідчить про гіперпродукцію NO в лімфоцитах крові за умов розвитку онкопатології. The increase of iNOS activity indicates hyperproduction of NO in blood lymphocytes with the development of oncopathology. Nitric oxide, which is formed in excessive amounts at pathological conditions of the body, has a pronounced cytotoxic effect due to the formation of peroxynitrite – a product of the interaction between NO and superoxidanion-radical, capable of destroying almost all components of the cell. It has been shown that cells in which an increase in NO concentration is observed have an increased growth rate.

Thus, the increase in the activity of arginase and iNOS of lymphocytes in the blood of patients with OC indicates a general need of cells for L-arginine at tumor growth.

In order to study the features and mechanism of the work of NOS, the initial (instantaneous) reaction rate (V_0), maximum amount of the reaction product (P_{max}) and the reaction characteristic time (time half saturation) (τ) were determined. To establish these kinetic parameters of NOS, the dynamics of NADPH (H^+) reduction was investigated, which indicates the synthesis of NO. The kinetics of NO formation with the participation of cNOS is consistent with the laws of the zero-order reaction in the range of 0-20 minutes. It was discovered that the dynamics and amount of NO formation with the participation of cNOS lymphocytes in the blood of patients with OC are significantly lower than in practically healthy individuals. However, NO formation with the participation of iNOS blood lymphocytes of patients with OC significantly exceeds these values for cNOS within the whole range of time factor of NO formation.

The values of kinetic parameters for cNOS and iNOS of blood lymphocytes of practically healthy women and patients with OC differ significantly. Thus, V_0 for cNOS of the control group is (94.0±7.4) nmol NADPH(H^+)/min· mg protein. In patients with OC V_0 was significantly reduced in 5.0 times ($p<0.001$). The synthesis of NO with the participation of iNOS, activated at OC, is much more intense than with the participation of cNOS, V_0 here increases by 7.9 times ($p<0,001$). Regarding

the maximum amount of the reaction product (P_{max}) produced in the cNO-synthase reaction, it was 3.8 times less at the OC then in the control group ($p<0.001$). In the iNO-synthase reaction at P_{max}, OC was 6 times higher than at the cNO-synthase reaction ($p<0.001$). The analysis of the reaction characteristic time showed that at OC it increased by 1.4 times ($p<0.05$). The obtained kinetic parameters confirm that in the lymphocytes of patients with OC hypersynthesis of NO occurs with the participation of iNOS and "basal" synthesis of NO at normal physiological conditions occurs with the participation of cNOS.

Changes in the concentration of L-arginine in the incubation medium are likely to affect the rate of NO-synthase reaction. It was found that increasing the concentration of L-arginine in the incubation medium in the concentration range from 0.1 to 30 μm leads to a gradual increase of the rate of NO-synthase reaction with the participation of both isoforms of NOS reaching the plateau. However, the activity of cNOS lymphocytes in the blood of patients with OC reaches the plateau at much lower concentrations of substrate.

It was found that the value of V_{max} for cNOS of lymphocytes in the blood of the control group is 1.8 times higher than this value for cNOS of lymphocytes in the blood of patients with OC ($p<0.001$). At the same time, the values of $K_{L\text{-}Arg}$ for all the studied groups do not differ significantly, which proves that at the presence of oncopathology, the affinity of cNOS to L-arginine is practically unchanged. V_{max} for iNOS activated by oncopathology does not differ significantly from this value for cNOS blood lymphocytes of the control group. However, iNOS of blood lymphocytes of patients with OC is characterized by a significantly higher affinity for L-arginine: the value of $K_{L\text{-}Arg}$ for iNOS is 5.4 times lower than for cNOS of lymphocytes in the blood of control group($p<0.001$).

Therefore, when interpreting the obtained kinetic parameters determined by L-arginine, it is shown that at oncopathology the affinity constant of iNOS to L-arginine is 5.4 times lower ($p<0.001$) than for cNOS blood lymphocytes of control groups, and inhibition of activity cNOS occurs by a competitive type of reducing the number of the enzyme revolutions. Thus, with the development of oncopathology, the ratio of

NO-synthase and arginase metabolism of L-arginine is disturbed, which indicates dysmetabolic changes in the system of NO synthesis, namely its hyperproduction.

Key words: lymphocytes, Ca^{2+},Mg^{2+}-ATPase, NO-synthase, lipid peroxidation, glutathione peroxidase, glutathione reductase, glutathione-S transferase, ovarian cancer.

Список наукових праць здобувача:

1. Barylyak RV, Iefremova UP, Onufrovych OK, Melnyk OV., Vorobets D.Z, Vorobets ZD. Characterization of Ca^{2+},Mg^{2+}-ATPase of blood lymphocytes in women with ovarian cancer. Regulatory Mechanisms in Biosystems. 2018;9(1):85–89 (*Web of Science*). *(Здобувачем особисто проведено аналіз літературних джерел, виконання лабораторних досліджень, аналіз та узагальнення отриманих результатів; написання та оформлення статті виконано у співавторстві*).
2. Бариляк РВ, Воробець ДЗ, Онуфрович ОК, Воробець ЗД. Особливості зміни активності Ca^{2+}-активованої, Mg^{2+}-залежної АТФ-гідролази ендоплазматичного ретикулуму лімфоцитів крові при раку яєчника. Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. 2018;2(82):64-70. *(Здобувачу належить ідея проведення досліджень та узагальнення результатів; аналіз літературних джерел, виконання лабораторних дослідження, аналіз отриманих даних, написання та оформлення публікації виконано у співавторстві).*
3. Бариляк РВ, Воробець ДЗ, Фафула РВ, Онуфрович ОК, Мельник ОМ, Воробець ЗД. Рак яєчника: функціонування Ca^{2+}-залежної та Ca^{2+}-незалежної ізофом NO-синтази в лімфоцитах крові жінок. Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. 2019;4(88):63-72. *(Здобувачу належить ідея проведення досліджень та узагальнення результатів; аналіз літературних джерел, виконання лабораторних дослідження, аналіз отриманих даних, написання та оформлення публікації виконано у співавторстві).*

4. Barylyak R, Onufrovych O, Fafula R, Vorobets D, Vorobets Z. State of glutathione antioxidant system in blood lymphocytes at ovarian cancer. American Scientific Journal. 2020;1(42):12-15. *(Здобувачем особисто проведено аналіз літературних джерел, виконання лабораторних досліджень, аналіз та узагальнення отриманих результатів; написання та оформлення статті виконано у співавторстві*).
5. Бариляк РВ, Воробець ДЗ, Воробець ЗД. Характеристика маркера рака яєчника на різних стадіях захворювання. Збірник праць XIII Міжнародної міждисциплінарної науково-практичної конференції «Сучасні аспекти збереження здоров'я людини» (3-4.05.2020, Ужгород). 2020:275-240. *(Здобувачу належить ідея проведення досліджень та узагальнення результатів; аналіз літературних джерел, виконання лабораторних дослідження, аналіз отриманих даних, написання та оформлення публікації виконано у співавторстві).*
6. Barylyiak R, Melnyk O, Onufrovych O, Fafula R, Borzhievsky A, Vorobets Z. Search for indicators of ovarian cancer development et differend stages of the disease. Polish Journal of Science. 2021;35(1):6-9. *(Здобувачем особисто проведено аналіз літературних джерел, виконання лабораторних досліджень, аналіз та узагальнення отриманих результатів; написання та оформлення статті виконано у співавторстві*).
7. Бариляк РВ, Воробець ДЗ, Воробець ЗД. Активність Ca^{2+}-залежної та Ca^{2+}-незалежної ізоформ NO-синтази лімфоцитів крові у хворих на рак яєчника. Актуальні питання патоллогії за умов дії надзвичайних факторів на організм. Матеріали X Науково-практ. конф. з міжнародною участю (05-06.10.2017, Тернопіль). Тернопіль, 2017:5. *(Здобувачем особисто проведено аналіз літературних джерел, виконання лабораторних досліджень, аналіз та узагальнення отриманих результатів; написання та оформлення статті виконано у співавторстві*).
8. Бариляк РВ, Воробець ДЗ, Воробець ЗД. Ca^{2+},Mg^{2+}-АТФаза плазматичної мембрани лімфоцитів крові жінок хворих на рак яєчника. Актуальні проблеми довкілля та здоров'я людини в умовах еклологічних і

соціальних змін у Європі та в Україні. Матеріали наук.-практ. конф. з міжнародною участю (24-26.05.2018, Тернопіль). Тернопіль, 2018:3. *(Здобувачу належить ідея проведення досліджень та узагальнення результатів; аналіз літературних джерел, виконання лабораторних дослідження, аналіз отриманих даних, написання та оформлення публікації виконано у співавторстві).*

9. Бариляк РВ, Воробець ДЗ, Мельник ОВ, Корчинська ОС, Воробець ЗД. Властивості Ca^{2+}-залежної та Ca^{2+}-незалежної ізоформ NO-синтази в лімфоцитах крові жінок хворих на рак яєчника. Здобутки клінічної та експериментальної медицини. Підсумкова LXII науково-практична коференція присвячена 165-річчю від дня народження Івана Яковича Горбачевського (30.06.2019, Тернопіль). Тернопіль, 2019:35-36. . *(Здобувачу належить ідея проведення досліджень та узагальнення результатів; аналіз літературних джерел, виконання лабораторних дослідження, аналіз отриманих даних, написання та оформлення публікації виконано у співавторстві).*
10. Бариляк РВ, Воробець НМ, Воробець ДЗ. Функціональний стан Ca^{2+},Mg^{2+}-АТФази лімфоцитів крові у жінок хворих на рак яєчника. Медична та клінічна хімія. Матеріали XII Українського біохіміцчного конгресу (30.09-04.10.2019, Тернопіль). Тернопіль, 2019;3(80):61-62. *(Здобувачу належить ідея проведення досліджень та узагальнення результатів; аналіз літературних джерел, виконання лабораторних дослідження, написання публікації виконано у співавторстві).*
11. Бариляк Р.В., Воробець Д.З., Воробець З.Д. Індуцибельна ізоформа NO-синтази, як потенційний додатковий маркер раку яєчника. XVIII Конгрес СФУЛТ. Матеріали Міжнародного наукового конгресу (1-3.10. 2020, Львів-Київ-Чікаго). Львів, 2019:189. *(Здобувачу належить ідея проведення досліджень та узагальнення результатів; аналіз літературних джерел, виконання лабораторних дослідження, аналіз отриманих даних, написання та оформлення публікації виконано у співавторстві).*