

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ  
ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
імені ДАНИЛА ГАЛИЦЬКОГО

Кваліфікаційна наукова праця  
на правах рукопису

**БАРИЛЯК РОМАН ВОЛОДИМИРОВИЧ**

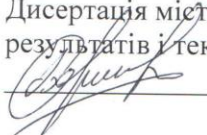
УДК 612.015.33.+616.153.94

ДИСЕРТАЦІЯ

**ОСОБЛИВОСТІ ФУНКЦІОНУВАННЯ  $\text{Ca}^{2+}$ -ЗАЛЕЖНИХ  
РЕГУЛЯТОРНИХ СИСТЕМ ЛІМФОЦИТІВ КРОВІ ЖІНОК ХВОРИХ  
НА РАК ЯЄЧНИКА**

222 Медицина

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії.  
Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,  
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

 Р.В. Баріляк

Науковий керівник – Воробець Зіновій Дмитрович,  
доктор біологічних наук, професор

Львів – 2021

## АНОТАЦІЯ

*Бариляк Р.В.* «Особливості функціонування  $\text{Ca}^{2+}$ -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  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних регуляторних систем лімфоцитів крові жінок хворих на рак яєчника (РЯ) –  $\text{Ca}^{2+}$ -активованих,  $\text{Mg}^{2+}$ -залежних АТФ-гідролазних, аргіназо-NO-синтазної та глутатіонової антиоксидантної з метою встановлення їх діагностичної цінності, що має суттєве значення для охорони здоров'я.

Задля 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 I 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 пероксидації 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  $\text{Ca}^{2+}$  в інкубаційному середовищі. Так, за присутності 0,5 мМ  $\text{Ca}^{2+}$  в інкубаційному середовищі пероксидація ліпідів інтенсифікується в 1,6 раза ( $p < 0,001$ ). Однак, це не є фізіологічні внутрішньоклітинні 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 ( $17,8 \pm 1,6$ ) 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  $\text{Ca}^{2+}$  відіграє ключову роль в регуляції практично всіх внутрішньоклітинних процесів, включаючи пухлинний ріст, проліферацію клітин, апоптоз тощо. Важлива роль у підтриманні внутрішньоклітинного гомеостазу  $\text{Ca}^{2+}$  відводиться  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФазам плазматичної мембрани та ендоплазматичного ретикулуму, функції яких полягають у зниженні концентрації даного іону в цитозолі. У результаті проведених досліджень встановлено, що  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФаза активність плазматичної мембрани лімфоцитів крові практично здорових жінок становила ( $2,79 \pm 0,27$ ) мкмоль  $\text{P}_i/\text{хв} \cdot \text{мг}$  протеїну. У пацієнтів з РЯ (III і IV стадія)  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФаза 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  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазної активності плазматичної мембрани лімфоцитів крові пацієнтів з РЯ є одним із свідчень про зростання  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  у цитозолі лімфоцитів.

Для визначення основних кінетичних параметрів гідролізу АТФ за участі  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -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  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазою плазматичної мембрани лімфоцитів крові практично здорових жінок становила  $(2,89 \pm 0,27)$  мкмоль  $\text{P}_i/\text{хв} \cdot \text{мг}$  протеїну. Максимальна швидкість АТФазної реакції за участі  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФази плазматичної мембрани лімфоцитів крові пацієнтів з РЯ III стадії знижувалась в 1,5 ( $p < 0,05$ ), а IV стадії – в 1,6 раза ( $p < 0,05$ ).

З'ясування значень констант спорідненості (афінності) показало, що ці величини знаходяться в субмілімолярному діапазоні концентрацій, що відповідає фізіологічній концентрації  $[\text{Mg} \cdot \text{АТФ}]$  у цитоплазмі клітин (0,5 – 5 мМ). У здорових осіб за умов фізіологічної норми константа спорідненості  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФази плазматичної мембрани до АТФ становила  $(0,17 \pm 0,02)$  мМ. Константи спорідненості  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФази плазматичної мембрани лімфоцитів до АТФ у пацієнтів з РЯ (III і IV стадія) 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  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФаз до субстрату (константа спорідненості до АТФ зростала).

Одночасно встановлено, що  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазна активність мембран ЕПР лімфоцитів крові практично здорових осіб становила  $(2,25 \pm 0,17)$  мкмоль  $\text{P}_i/\text{хв} \cdot \text{мг}$  протеїну. У пацієнтів з РЯ  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -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  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФази плазматичної мембрани лімфоцитів крові має більш виражений характер, ніж  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФази мембран ЕПР. Зниження  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФазної активності плазматичної мембрани і мембран ЕПР лімфоцитів крові пацієнтів з РЯ свідчить про зростання  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  у цитозолі лімфоцитів.

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

Визначення основних кінетичних параметрів гідролізу АТФ за участі  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФази мембран ЕПР лімфоцитів крові показало, що у практично здорових осіб максимальна швидкість  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФазної реакції мембран ЕПР становила  $(2,2 \pm 0,2)$  мкмоль  $\text{P}_i$ /хв·мг протеїну. Максимальна швидкість АТФазної реакції за участі  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФази ЕПР лімфоцитів крові пацієнтів з РЯ знижувалась щодо контрольних значень в 1,3 раза ( $p < 0,05$ ). Водночас значення константи афінності  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -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  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -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  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -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  $(131,3 \pm 9,7)$  нмоль сечовини/хв·мг протеїну. У пацієток 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  $\text{Ca}^{2+}$ -залежним ензимом. Однак, ми продемонстрували, що додавання в інкубаційне середовище 0,5 мМ  $\text{Ca}^{2+}$  (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  $\text{Ca}^{2+}$  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  $(71,4 \pm 6,9)$  нмоль  $\text{NADPH}(\text{H}^+)/\text{хв} \cdot \text{мг}$  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 пацієток 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  $(1,42 \pm 0,18)$  нмоль  $\text{NADPH}(\text{H}^+)/\text{хв} \cdot \text{мг}$  протеїну. На фоні інгібування cNOS у лімфоцитах крові пацієток 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 пероксинітриду – 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 ( $\tau$ ). 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  $(94,0 \pm 7,4)$  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 пацієток 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 пацієток з РЯ ( $p < 0,001$ ). Водночас, значення  $K_{L-Arg}$  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 пацієток з РЯ характеризується значно вищою спорідненістю до L-аргініну: величина  $K_{L-Arg}$  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 дисметаболичні 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:**  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФази, NO-синтази, пероксидація ліпідів, глутатіонпероксидаза, глутатіонредуктаза, глутатіон-S трансфераза, лімфоцити, рак яєчника.

## SUMMARY

*Barylyak RV.* «Peculiarities of the functioning of  $\text{Ca}^{2+}$ -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  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent regulatory systems of blood lymphocytes of women with ovarian cancer (OC)  $\text{Ca}^{2+}$ -activated,  $\text{Mg}^{2+}$ -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  $(26.1 \pm 2.2)$  U/ml. In the second age group (41-60 years) the concentration of antigen is  $(35.9 \pm 4.3)$  U/ml. With the development of ovarian cancer (stage 1 to IV), an increase in the concentration of CA-125 from  $(146.2 \pm 12.1)$  to  $(2865.0 \pm 217.4)$  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 unanimous 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 medium. Thus, 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. Thus, in practically healthy women, the concentration of reduced glutathione is  $(17.8 \pm 1.6)$  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  $\text{Ca}^{2+}$  plays a key role in the regulation of almost all intracellular processes, including tumor growth, cell proliferation, apoptosis etc.  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -ATPase of the plasma membrane is important in maintaining intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis, the function of which is to reduce the concentration of this ion in the cytosol, precisely to transport it against the concentration gradient in the extracellular environment. The activities of  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -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  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -ATPase activity of a plasma membrane of lymphocytes of blood of practically healthy women was  $(2.79 \pm 0.27) \mu\text{mol Pi}/\text{min} \cdot \text{mg}$  of protein. In patients with OC (stage III and IV)  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -ATPase activity of the plasma membrane of blood lymphocytes significantly differed from the physiological norm and decreased by 1.6 and 1.8 times respectively ( $p < 0.05$ ) compared to physiological norm. Decrease of  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -ATPase activity of the plasma membrane of lymphocytes in the blood of patients with OC is one of the indications of  $[\text{Ca}^{2+}]$  growth in the cytosol of lymphocytes.

To determine the main kinetic parameters of ATP hydrolysis with  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -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  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -ATPase of the plasma membrane of lymphocytes in the blood of practically healthy women was  $(2.89 \pm 0.27) \mu\text{mol Pi}/\text{min} \cdot \text{mg}$  of protein. The maximum rate of ATPase reaction with the participation of  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -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  $[\text{Mg} \cdot \text{ATP}]$  in the cytoplasm of cells (0.5-5 mM). In healthy individuals under conditions of physiological norm, the affinity constant of  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -ATPase of the plasma membrane to ATP was  $(0.17 \pm 0.02) \text{ mmol}$ . The affinity constants of

$\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -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  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase to the substrate (ATP affinity constant increased).

As a result of the conducted research it was also established that  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase activity of endoplasmic reticulum membranes (ER) of lymphocytes of blood of practically healthy person was  $(2.25 \pm 0.17) \mu\text{mol P}_i/\text{min mg}$  of protein. In patients with OC  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -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  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase of the plasma membrane of blood lymphocytes is more pronounced than  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase of ER membranes. Decrease of  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase activity of the plasma membrane and of ER membranes of blood lymphocytes of patients with OC indicates the increase of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in the cytosol of lymphocytes.

$\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -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  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase activity of the ER membranes of lymphocytes in practically healthy individuals reaching a plateau. The maximum values of ATP-hydrolase activity of  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -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  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase activity from ATP shows that within the whole range of substrate concentrations investigation the activity  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -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  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -ATPase of ER membranes of blood lymphocytes has shown that in almost healthy individuals the maximum rate of  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -ATPase reaction of ER membranes was  $(2.2 \pm 0.2) \mu\text{mol P}_i/\text{min mg}$  of protein. The maximum rate of ATPase reaction involving  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -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  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -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  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -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 submillimolar range of concentrations, which corresponds to the concentration of  $[\text{Mg} \cdot \text{ATP}]$  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  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -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  $(131.3 \pm 9.7) \text{ nmol of urea}/\text{min mg}$  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  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent enzyme. However, we have shown that the addition of 0.5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  (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  $\text{Ca}^{2+}$  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  $(71.4 \pm 6.9)$  nmol NADPH( $\text{H}^+$ )/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  $(1.42 \pm 0.18)$  nmol NADPH( $\text{H}^+$ )/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) ( $\tau$ ) 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  $(94.0 \pm 7.4)$  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 than 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  $\mu\text{M}$  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  $V_{\text{max}}$  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  $K_{\text{L-Arg}}$  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.  $V_{\text{max}}$  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  $K_{\text{L-Arg}}$  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,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -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  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -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  $\text{Ca}^{2+}$ -активованої,  $\text{Mg}^{2+}$ -залежної АТФ-гідролази ендоплазматичного ретикулулу 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  $\text{Ca}^{2+}$ -залежної та  $\text{Ca}^{2+}$ -незалежної ізоформ 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  $\text{Ca}^{2+}$ -залежної та  $\text{Ca}^{2+}$ -незалежної ізоформ NO-синтази лімфоцитів крові у хворих на рак яєчника. Актуальні питання патології 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.  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФаза плазматичної мембрани лімфоцитів крові жінок хворих на рак яєчника. Актуальні проблеми довкілля та здоров'я людини в умовах екологічних 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. Барияк РВ, Воробець ДЗ, Мельник ОВ, Корчинська ОС, Воробець ЗД. Властивості  $\text{Ca}^{2+}$ -залежної та  $\text{Ca}^{2+}$ -незалежної ізоформ NO-синтази в лімфоцитах крові жінок хворих на рак яєчника. Здобутки клінічної та експериментальної медицини. Підсумкова LXII науково-практична конференція 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. Барияк РВ, Воробець НМ, Воробець ДЗ. Функціональний стан  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФази лімфоцитів крові у жінок хворих на рак яєчника. Медична та клінічна хімія. Матеріали XII Українського біохімічного 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. Барияк 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).*

## ЗМІСТ

Перелік умовних позначень.....	24
<b>ВСТУП.....</b>	<b>25</b>
<b>РОЗДІЛ 1. ПРОБЛЕМИ ПАТОГЕНЕЗУ ТА ФУНКЦІОНУВАННЯ ЯЄЧНИКА І ЛІМФОЦИТІВ КРОВІ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ) ...</b>	<b>31</b>
1.1 Особливості функціонування яєчника .....	31
1.1.1 Морфофункціональна характеристика яєчника .....	31
1.1.2 Функціональні та гормональні зміни в яєчнику за умов неопластичної трансформації .....	33
1.1.3 Маркери рака яєчника .....	38
1.2. Функціональна характеристика лімфоцитів крові .....	39
1.3. Пероксидація ліпідів і система антиоксидантного захису у лімфоцитах периферичної крові .....	41
1.4. Функціональна характеристика та роль $Ca^{2+}$ , $Mg^{2+}$ -АТФаз лімфоцитів крові при раку яєчника .....	44
1.5. Характеристика та роль аргінази лімфоцитів крові при раку яєчника .....	46
1.6. Характеристика та роль $Ca^{2+}$ -залежної та $Ca^{2+}$ -незалежної ізоформ NO-синтази лімфоцитів крові при раку яєчника .....	50
<b>РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ .....</b>	<b>53</b>
2.1. Об'єкт досліджень. Загальна характеристика досліджуваних груп жінок .....	53
2.2. Виділення лімфоцитів периферичної крові .....	55
2.3. Визначення концентрації глікопротеїну СА-125 в сироватці крові .....	56
2.4. Оцінка стану пероксидації ліпідів за визначенням концентрації малонового діальдегіду .....	56
2.5. Визначення вмісту відновленого глутатіону в лімфоцитах крові .....	57

2.6. Визначення глутатіонпероксидазної активності в лімфоцитах периферичної крові .....	57
2.7. Визначення глутатіонредуктазної активності в лімфоцитах периферичної крові .....	58
2.8. Визначення глутатіонтрансферазної активності в лімфоцитах периферичної крові .....	58
2.9. Визначення активності аргінази в лімфоцитах периферичної крові .....	58
2.10. Визначення активності $\text{Ca}^{2+}$ -залежної та $\text{Ca}^{2+}$ -незалежної ізоформ NO-синтази в лімфоцитах периферичної крові .....	59
2.11. Методика визначення $\text{Ca}^{2+}$ -активованої, $\text{Mg}^{2+}$ -залежної АТФазної активності плазматичної мембрани та ендоплазматичного ретикулулу лімфоцитів периферичної крові	61
2.12. Визначення кількості неорганічного фосфату .....	61
2.13. Визначення концентрації протеїну .....	62
2.14. Статистична обробка даних .....	63
<b>РОЗДІЛ 3. ПОКАЗНИКИ КОНЦЕНТРАЦІЇ СА-125 ТА АКТИВНІСТЬ ЕНЗИМІВ ГЛУТАТІОНОВОЇ АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ ПРИ РОЗВИТКУ РАКУ ЯЄЧНИКА ТА ЇХ ЧУТЛИВІСТЬ ДО ІОНІВ КАЛЬЦІЮ .....</b>	
3.1. Рівень антигена СА-125 у сироватці крові жінок хворих на рак яєчника .....	64
3.2. Про- та антиоксидантна система лімфоцитів крові жінок при раку яєчника.....	70
<b>РОЗДІЛ 4. ХАРАКТЕРИСТИКА <math>\text{Ca}^{2+}</math>,<math>\text{Mg}^{2+}</math>-АТФАЗ ЛІМФОЦИТІВ КРОВІ ЖІНОК ПРИ РОЗВИТКУ РАКУ ЯЄЧНИКА .....</b>	
4.1. $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазна активність плазматичної мембрани лімфоцитів крові жінок хворих на рак яєчник.....	80
4.2. $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазна активність ендоплазматичного ретикулулу лімфоцитів крові жінок хворих на рак яєчника .....	87
<b>РОЗДІЛ 5. ХАРАКТЕРИСТИКА СИСТЕМИ ОКСИДУ АЗОТУ</b>	

## **ЛІМФОЦИТІВ КРОВІ ЖІНОК ХВОРИХ НА РАК ЯЄЧНИКА ..94**

5.1. Активність аргінази лімфоцитів крові жінок хворих на рак яєчника .....	94
5.2. Характеристика $\text{Ca}^{2+}$ -залежної та $\text{Ca}^{2+}$ -незалежної ізоформ НО-синтази лімфоцитів крові жінок хворих на рак яєчника .....	101
5.3. Концентрація метаболітів оксиду азоту в лімфоцитах крові жінок хворих на рак яєчника .....	115
<b>РОЗДІЛ 6. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ .....</b>	<b>120</b>
<b>ВИСНОВКИ .....</b>	<b>135</b>
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ .....</b>	<b>138</b>

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АТФ – аденозинтрифосфорна кислота

В-лімфоцити – бурсо-залежні лімфоцити

СА-125 – антиген сироватки крові, специфічний маркер на рак яєчника

ЕПР – ендоплазматичний ретикулум

ІКК – імунокомпетентні клітини

ІЛ – інтерлейкін

ІФ – інтерферон

ЛГ – лютеїнізуючий гормон

ЛПК – лімфоцити периферичної крові

ПМ – плазматична мембрана

ЕПР – ендоплазматичний ретикулум

ПОЛ – пероксидне окиснення ліпідів

РЯ – рак яєчник

Т-лімфоцити – тимус-залежні лімфоцити

ТФР-β – трансформуючий фактор росту бета

ФН – фізіологічна норма

ФНП-α – пухлинний некротичний фактор альфа

ФСГ - фолікулостимулюючий гормон

cGMP – циклічний гуанозинмонофосфат

cNOS – конститутивна синтаза оксиду азоту (NOS-I + NOS-III)

iNOS (NOS-II) – індукбельна ізоформа синтази оксиду азоту

NADPH – нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат

nNOS (NOS-I) – нейрональна ізоформа синтази оксиду азоту

NO – Нітроген (II) оксид

(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) – нітрит-йони

(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) – нітрат-йони

NOS – синтаза оксиду азоту

ONOO<sup>-</sup> – пероксинітрит



## ВСТУП

**Актуальність теми.** Проблема вивчення біохімічних змін і діагностики рака яєчників залишається однією з найбільш актуальних задач біохімії, онкогінекології та медицини в цілому. Це пов'язано з високою частотою захворюваності та смертності від даного захворювання як в Україні, так і за кордоном. Так, у США серед онкологічної патології жінок, рак яєчника займає 9 місце, в Європі – 6, а в Україні - 5 [42, 124]. Тому вивчення біохімічних, молекулярно-біологічних особливостей розвитку рака яєчника має важливе науково-практичне значення.

Одним з актуальних напрямків біохімічних і споріднених біомедичних досліджень є з'ясування механізмів, які регулюють функціонування клітини як у практично здорових осіб, так і при патологічних станах [140, 141, 167, 168, 192].

Для виявлення найбільш ранніх доклінічних стадій розвитку патологічних процесів йде пошук нових маркерів [32, 33, 45, 143, 183, 195]. В цьому аспекті, роль Нітроген (II) оксиду (NO), як універсального клітинного та тканинного метаболіту в регуляції клітинних функцій і паракринного регулятора міжклітинних і міжсистемних взаємодій, не викликає сумніву [18, 50, 51, 80, 81, 84]. Синтез NO здійснюється за участю NO-синтази з *L*-аргініну [95, 145, 154, 155]. *L*-аргінін також метаболізується за участю аргінази. Водночас відомо, що, залежні від концентрації, метаболіти циклу NO можуть виявляти як про-, так і антипроліферативний ефект, порушувати вільнорадикальний гомеостаз [110, 112, 121, 122, 168, 187]. З іншого боку, показано, що градієнт концентрації  $Ca^{2+}$  по обидва боки плазматичної мембрани є інтегральним показником життєдіяльності клітини [20, 158-160, 172, 214]. Контроль  $[Ca^{2+}]_i$  забезпечується суперпозицією функціонування систем пасивного та активного транспорту цього йону, зокрема  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ -АТФазами [25, 100, 158-160, 172, 178]. Порушення кальцієвого гомеостазу, призводить до розвитку клітинних патологій, зокрема, посиленої проліферації клітин [147, 180, 190, 191]. До критеріїв змін функціонального стану практично здорових осіб можуть бути віднесені також активності ензимів антиоксидантного захисту [3, 67, 71, 83].

Рак яєчника відноситься до тяжкої патології жіночої репродуктивної системи, яка широко вивчається з метою удосконалення методів діагностики, виявлення пухлинного процесу на ранніх стадіях і лікування [1, 2, 67, 92, 98].

З метою вивчення біохімічних змін, що відбуваються в організмі при розвитку рака яєчника, найбільш адекватною моделлю можуть слугувати лімфоцити периферичної крові, які здатні об'єктивно відображати зміни генетичного та метаболічного гомеостазу організму [11, 12, 22, 756, 76, 86, 135, 216, 217].

Таким чином, незважаючи на значну кількість досліджень, присвячених вивченню розвитку рака яєчника, роль вказаних регуляторних систем у цих процесах залишаються остаточно не з'ясованими.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота є фрагментом планової науково-дослідної теми Львівського національного медичного університету ім. Данила Галицького «Дослідження ролі системних і паракринних регуляторних механізмів у забезпеченні гомеостатування функціонально-метаболічних параметрів організму за умов адаптації до дії екстремальних чинників різної природи», державний реєстраційний № 0116U004510 (2016-2020 рр.), що виконувалась кафедррою медичної біології, паразитології та генетики. Автор є співвиконавцем згаданої теми, ним особисто проведені лабораторні дослідження, представлені у дисертаційній роботі. Тема дисертації затверджена вченою радою медичного факультету № 2 (протокол № 3 від 21.11.2018 р.).

Комісією з питань біоетичної експертизи Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького (протокол № 2 від 25 лютого 2019 р. та протокол № 1 від 25 січня 2021 р.) порушень морально-етичних норм при виконанні дисертаційної роботи не виявлено.

**Мета роботи.** З'ясування особливостей функціонування основних  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних регуляторних систем лімфоцитів крові жінок хворих на рак яєчника –  $\text{Ca}^{2+}$ -активованих,  $\text{Mg}^{2+}$ -залежних АТФ-гідролазних, аргіназо-NO-синтазної та глутатіонової антиоксидантної.

Для досягнення зазначеної мети у роботі сформульовано наступні

завдання:

1. З'ясувати зміни концентрації антигену СА-125 і активність мієлопероксидази в сироватці крові та співвідношення нейтрофілів до лімфоцитів у жінок хворих на рак яєчника.

2. Дослідити стан пероксидації ліпідів та активність ензимів глутатіонової антиоксидантної системи в лімфоцитах крові жінок, хворих на рак яєчника.

3. Виявити особливості функціонування  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФаз плазматичної мембрани та ендоплазматичного ретикулуму лімфоцитів крові при розвитку раку яєчника.

4. Виявити особливості функціонування конститутивної та індукцибельної ізоформ NO-синтаз та аргінази у лімфоцитах периферичної крові при розвитку раку яєчника.

5. Дослідити кореляційні звязки між активностями ензимів при розвитку раку яєчника.

*Об'єкт дослідження:* регуляторні механізми функціонування лімфоцитів периферичної крові у жінок з раком яєчника за участі  $\text{Ca}^{2+}$ -активованих,  $\text{Mg}^{2+}$ -залежних АТФ-гідролазних, аргіназо-NO-синтазної та глутатіонової антиоксидантної систем.

*Предмет дослідження:* активності  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФаз, аргінази, cNO-синтази, iNO-синтази, активності ензимів системи глутатіону, пероксидація ліпідів лімфоцитів периферичної крві та концентрація антигену СА-125.

*Методи дослідження:* з метою вивчення регуляторних систем лімфоцитів крові різних груп жінок використовувались методи біохімічні, лабораторної діагностики та статистичного аналізу.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Вперше проведено комплексне дослідження ензиматичних активностей  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФаз, аргінази,  $\text{Ca}^{2+}$ -залежної та  $\text{Ca}^{2+}$ -незалежної ізоформ NO-синтази та ензимів системи глутатіону лімфоцитів периферичної крві жінок хворих на рак яєчника.

Показано, що у клінічно (практично) здорових жінок із віком зростає концентрація антигену СА-125. При розвитку рака яєчника (від I до IV стадії) вона зростає від 5 до 95 разів. Доведено, що існує позитивна кореляція між

клінічною стадією РЯ і рівнем СА-125. Розвиток рака яєчника супроводжується зростанням пероксидації ліпідів і зниженням активностей глутатіонпероксидази та глутатіонредуктази в лімфоцитах.

Виявлено зниження ензиматичних активностей  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-залежних транспортувальних систем плазматичної мембрани та ендоплазматичного ретикулумі лімфоцитів крові пацієнтів із раком яєчника, що ймовірно призводить до перевантаження клітин  $\text{Ca}^{2+}$ . Вперше 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 показав, що зростання активності iNOS відбувається за захунок збільшення числа обертів ензиму та зростання його спорідненості до субстрату. Тобто, за умов розвитку онкопатології порушується співвідношення NO-синтазного та аргіназного метаболізму L-аргініну, що супроводжується гіперпродукцією NO.

Результати проведених досліджень розкривають раніше невідомі біохімічні та патофізіологічні механізми змін у лімфоцитах при розвитку рака яєчника і доповнюють відомості про регуляцію функціонування клітин.

**Практичне значення отриманих результатів.** Отримані дані можуть обґрунтовувати розробку нових додаткових методів і підходів для з'ясування механізмів розвитку неопластичних змін в яєчник. Рівень активностей  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФаз, аргінази, індукцибельної ізоформи NO-синтази, концентрації NO та антигена СА-125, поряд з іншими параметрами, можуть свідчити про функціональний стан клітини та бути прогностичними показниками для діагностування та оцінки ефективності онкотерапії. Результати дисертаційної роботи впроваджені в науковий і навчальний процес кафедри біохімії Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького, кафедри клініко-лабораторної діагностики ДВНЗ «Тернопільський державний

медичний університет ім. І.Я. Горбачевського», кафедри біологічної та медичної хімії Івано-Франківського національного медичного університету, кафедри біомедицини ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, в наукову роботу ДУ «Інститут спадкової патології НАМН України».

**Особистий внесок здобувача.** Дисертантом особисто виконані патентні дослідження та аналіз науково-медичної інформації за темою дисертаційної роботи. Самостійно проведено виконання лабораторних досліджень, статистичну обробку даних. Дисертант, разом зі співавторами, проводив оцінку та узагальнення отриманих даних, написання та підготовку праць до друку. Планування досліджень, аналіз даних, їх інтерпретація та зіставлення з літературними даними, формулювання висновків здійснено за участю наукових керівників. Дисертантом особисто розроблено дизайн рукопису дисертаційної роботи.

**Апробація результатів дисертації.** Дисертаційну роботу апробовано на фаховому семінарі кафедр біохімії, медичної біології та біофізики Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького (протокол № 13 від 24 лютого 2021 р.). Результати досліджень та основні положення дисертації були представлені на наукових семінарах кафедри медичної біології (Львів, 2018-2021), X Науково-практичній конференції з міжнародною участю «Актуальні питання патології за умов дії надзвичайних факторів на організм» (Тернопіль, 2017), Науково-практичній конференції з міжнародною участю «Актуальні проблеми довкілля та здоров'я людини в умовах екологічних і соціальних змін у Європі та в Україні» (Тернопіль, 2018), XII Українському біохімічному конгресі (Тернопіль, 2019), Підсумковій LXII науково-практичній конференції присвяченій 165-річчю від дня народження Івана Яковича Горбачевського «Здобутки клінічної та експериментальної медицини» (Тернопіль, 2019), XIII Міжнародній міждисциплінарній науково-практичній конференції «Сучасні аспекти збереження здоров'я людини» (Ужгород, 2020), XVIII Конгресі СФУЛТ (Львів, 2020).

**Публікації.** За темою дисертації опубліковано 11 робіт, з яких 3 статті – у наукових фахових виданнях, рекомендованих МОН України (одна з них включена до міжнародної наукометричної бази «Web of Science»), 3 – у інших виданнях і 5 робіт у матеріалах наукових міжнародних і вітчизняних з’їздів, конгресів, конференцій.

**Структура дисертації.** Дисертація викладена на 158 сторінках друкованого тексту та включає вступ, огляд літератури, опис матеріалів і методів досліджень, власні дослідження, аналіз та узагальнення одержаних результатів, висновки, список використаної літератури, який містить 221 джерело (61 кирилицею і 160 латиницею). Дисертація ілюстрована 9 таблицями та 23 рисунками.

## РОЗДІЛ 1.

### ПРОБЛЕМИ ПАТОГЕНЕЗУ ТА ФУНКЦІОНУВАННЯ ЯЄЧНИКА І ЛІМФОЦИТІВ КРОВІ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

#### 1.1. Особливості функціонування яєчника

##### 1.1.1 Морфофункціональна характеристика яєчника

Міжнародне агенство з вивчення рака причинам смерті від злоякісних пухлин раку яєчника (РЯ) відводить 5-е місце та 7-е місце в загальній онкологічній захворюваності [42, 85, 193]. Прогноз цієї хвороби найчастіше неблагопринємний. Приблизно в половині випадків ця онкопатологія призводить до смерті у зв'язку з несвоєчасною діагностикою, високим рівнем ранніх і пізніх рецидивів [1, 53, 54, 58, 98, 131].

Яєчники (*ovarium*) – це парні жіночі статеві залози, які продукують статеві клітини (яйцеклітини) та статеві гормони (естрогени та прогестерон).

До кінця емріонального періоду онтогенза структура яєчників плоду практично аналогічна структурі яєчників дорослої жінки. Формування більшості структурних компонентів яєчників відбувається під час ембріогенезу, зокрема закладання кількості фолікулів завершується до моменту родів. У постнатальному періоді неофолікулогенез не відбувається. Від народження до початку статевої зрілості поверхня яєчника гладка, протягом репродуктивного періоду – поверхня нерівна, горбиста [54, 57, 142].

Зовні яєчник укритий поверхневим одношаровим мезотелієм – епітелієм, який утворюється з целомічного листка і здатний до метапластичної трансформації в більш диференційований стан. При малігнізації цього епітелію підвищується ступінь його диференціації (що нетипово для інших злоякісних новоутворень), причому клітини можуть диференціюватись у різних напрямках, перетворюючись у клітини, виявлені в мюллерових протоках, характерні для маткових труб, тіла або шийки матки та строми яєчників [99].

Яєчники виконують дві основні функції. Перша з них називається генеративною, друга – ендокринною. Генеративна функція полягає в періодично повторюваному дозріванні фолікулів, всередині яких міститься здатна до

запліднення клітина. Ендокринна функція яєчників зводиться до дії, яку здійснюють на весь організм жінки гормони, вироблені у фолікулах яєчника, естрогени, а також прогестерон [39, 99]. Діяльність яєчників, їх генеративна й ендокринна функції перебувають під контролем гіпофіза, який своєю чергою перебуває під контролем гіпоталамуса. Гормональна функція яєчників змінюється в різні періоди онтогенезу і визначається ступенем морфологічної зрілості яєчника та системи, яка регулює його гормональну функцію [8-10].

Відомо, що більшість новоутворень яєчника (85%) розвивається із поверхневого епітелію або постовуляційних інклюзійних кіст, які зазнали тривалого впливу гормонів або інших хемокінів [142]. В основі пухлинного росту лежать порушення взаємозв'язку внутрішньоклітинної і нейроендокринної регуляції процесів клітинного поділу і диференціювання. На сьогоднішній день роль гормональних факторів у неопластичній трансформації яєчника не викликає сумнівів [39, 57]. Показано, що естрогени можуть прямо або опосередковано впливати на утворення пухлини, в результаті чого виникають спонтанні помилки реплікації ДНК, продукти їх метаболізму містять активні форми кисню, які беруть участь у пошкодженні ДНК. Також естрогени сприяють проліферації клітин з утвореною мутацією [16, 17]. Дисгормональна природа пухлин яєчників пов'язана з первинним ослабленням функції яєчників, що супроводжується зниженням рівня оваріальних естрогенів і спричиняє компенсаторне збільшення рівня гонадотропінів гіпофіза. За умов тривалого підвищення секреції фолікулостимулюючого гормону (ФСГ) в яєчниках виникає спочатку дифузна, потім вогнищева гіперплазія і проліферація клітин епітелію, яка може закінчитися утворенням пухлини. Серед інших етіологічних факторів розвитку пухлин яєчників важливу роль відіграють спадкові, вікові та зовнішні фактори.

Половина епітеліальних пухлин – дброякісні, 33% – злоякісні, 16% – граничні, з низьким потенціалом злоякісності (наявні деякі морфологічні ознаки злоякісності, але інвазивний ріст відсутній). Понад 75% граничних пухлин виявляють на ранній стадії у молодих жінок; прогноз у такому випадку значно кращий, ніж у разі злоякісних пухлин [8-10].



Серед злоякісних новоутворень яєчника епітеліальні пухлини (карциноми) складають 85-95 %, при цьому на долю серозних карцином яєчника високого ступеню злоякісності (high-grade serous carcinoma) припадає майже 70 % пухлин, серозних карцином низької злоякісності – 5 %, на інші гістологічні типи карцином – 25 % [8].

Розрізняють п'ять основних гістологічних типів епітеліальних **злоякісних пухлин** яєчника (ЕЗПЯ): серозні пухлини яєчника (50% випадків), муцинозні пухлини яєчника (25% випадків), ендометріюїдні пухлини яєчника (15%), мезонефроїдні пухлини яєчника (5%) і пухлину Бреннера (1% випадків). Співвідношення цих типів залежить від віку жінок. ЕЗПЯ найчастіше зустрічається у жінок віком понад 40 років. Як правило, це кістозно-солідні утворення, які метастазують імплантаційно по очеревині [8, 9, 94, 104].

Пізня діагностика захворювання обумовлена його протяжним безсимптомним протіканням, відсутністю маркерів ранньої діагностики, або їх низькою специфічністю.

### 1.1.2 Функціональні та гормональні зміни в яєчнику за умов неопластичної трансформації

До факторів, які підвищують ризик розвитку неопластичних змін в яєчнику відносять: підвищення концентрації гонадотропінів у крові, гонадотропну гіперстимуляцію наднирників, порушення гормонального балансу в системі "гіпофіз-яєчник", фіброміому матки, генітальний ендометріоз, ускладнений акушерський анамнез, раннє менархе, пізню або дуже ранню менопаузу, безпліддя, відсутність статевих стосунків з чоловіками, гормонозалежні пухлини в анамнезі, обтяжену спадковість щодо раку органів репродуктивної системи, наявність РЯ у кровних родичів, неадекватне використання гормональних препаратів, цукровий діабет, ожиріння, артеріальну гіпертензію, гіпотиреоїдизм [16, 17, 39]. На даний час найбільша роль в розвитку РЯ відводиться генетичним, гормональним, а звідти і метаболічним факторам. Це, здебільшого, стосується внутрішньоклітинних механізмів, що визначають проліферацію, диференціацію,

апоптоз тощо [44, 53, 127, 140-142, 144, 146, 204, 208, ].

У численних дослідженнях відзначено, що вагітність знижує ризик виникнення РЯ, а велика кількість вагітностей підсилює захисну дію [114, 115]. Повідомлялося про підвищення ризику РЯ, якщо вік першої вагітності був менше 19 років порівняно з першою вагітністю у віці старшому 25 років [114, 115]. Факторами ризику вважають ранній початок менархе (до 11 років), пізній вступ у період постменопаузи (після 55 років), пізній вік першої вагітності (після 35 років) [114, 115]. Безпліддя ж підвищує ризик розвитку РЯ, а препарати, що стимулюють вуляцію впродовж більше 12 циклів, збільшують цей ризик в 2-3 рази [221]. Відомо, що піки захворюваності РЯ припадають на вік гіпергонадотропіємії, зниження якої призводить до зменшення частоти виникнення пухлин яєчників [39, 115]. Саме зниження гіпергонадотропіємії і лежить в основі захисної дії не тільки оральної контрацепції, але і репродуктивної поведінки в цілому [10]. Використання оральних контрацептивів більше 5 років наполовину знижує частоту розвитку РЯ [39]. Овуляція та надмірна маса також, ймовірно, збільшують ризик серозного РЯ [120, 148]. Застосування схем замісної гормональної терапії з чистими естрогенами може значно підвищувати ризик РЯ у постменопаузі, особливо ендометріюїдного і світлоклітинного (мезонефроїдного) [117]. Рак молочної залози в анамнезі збільшує ризик РЯ у 2-4 рази, так само ризик раку молочної залози підвищений у хворих на РЯ. Повідомляється про можливість зниження ризику РЯ у жінок, що піддалися стерилізації шляхом перев'язки маткових труб [117]. Однак до цього часу причини цього явища залишаються незрозумілими.

Гормони і фактори росту відіграють центральну роль в регулюванні клітинної проліферації, диференціюванні та апоптозі. Зміни цих процесів дають змогу клітинам, які несуть у собі мутації в протоонкогенах і генах-супресорах пухлин, виживати і утворювати злоякісний клон [33, 146].

Існує кілька гіпотез, що пояснюють злоякісну трансформацію епітелію яєчників [87], при якій не відзначають генетичної схильності до виникнення РЯ, зумовленої мутаціями генів *BRCA1* і *BRCA2* [107]. Гонадотропні гормони гіпофізу ФСГ і лютеїнізуючий гормон (ЛГ), андрогени, естрогени, прогестерони

та інсуліноподібний фактор росту 1 (ІФР-1) були запропоновані як можливі чинники, що впливають на розвиток РЯ [220, 221].

Вважається, що чим більше число овуляцій, тим вищий потенційний ризик злоякісної трансформації. Припускають, що під час овуляції відбувається занурення і пошкодження клітин поверхневого епітелію, а відхилення в репаративних процесах у таких клітинах підвищують ризик виникнення мутацій з подальшою малігнізацією. Згідно з цією гіпотезою ризик РЯ є нижчим у жінок, які мали багато вагітностей, що завершилися пологам, та у тих, які довго годували грудьми і вживали пероральні контрацептиви [99].

Згідно гонадотропінової гіпотези, стимуляція поверхневого епітелію яєчників ФСГ і ЛГ може підвищувати ризик його малігнізації. Рецептори до ФСГ і ЛГ виявляють у 100% нормальних клітин поверхневого епітелію яєчників і у 60% злоякісних клітин [221]. З'ясувано, що у безплідних жінок, які отримували препарати для стимулювання овуляції, ризик розвитку РЯ виявився вищим у 2,8 рази, а прикордонних пухлин – у 4 рази порівняно з безплідними жінками, які не отримували препарати для підвищення фертильності.

Дослідження показали, що ФСГ, ЛГ і хоріонічний гонадотропін людини можуть стимулювати проліферацію РЯ і активувати мітоген-активовану протеїнкіназу [94]. Індукована гіперекспресія рецептора до ФСГ веде до підвищення експресії рецептора епідермального фактора росту (epidermal growth factor receptor – EGFR), рецептора типу 2 до людського епідермального фактору росту (human epidermal growth factor receptor 2 - HER2) [94]. До інших можливих онкогенів, експресія яких підвищується під впливом ФСГ і ЛГ *in vitro*, належать  $\beta$ -катенін, Meis-1, циклін G2, інсуліноподібний фактор росту 1 і інтегрин  $\beta$ -1.

Щодо гіпотези гормональної стимуляції, то дані епідеміологічних досліджень свідчать, що прогестерон, його похідні і комбіновані пероральні контрацептиви знижують ризик РЯ [8, 9, 96]. Підвищений рівень андрогенів, який спостерігається при синдромі полікістозних яєчників, збільшує ризик розвитку РЯ. Найвища концентрація андрогенів спостерігається всередині фолікулів на стадії росту, які через рецепторний апарат поверхневого епітелію яєчників підсилюють проліферацію клітин [176]. Підвищення концентрації

гонадотропінів у крові з віком жінки позитивно корелює зі збільшенням захворюваності на РЯ [39].

Вивчена етіологічна роль запалення в канцерогенезі РЯ, яке супроводжує кожен овуляційний цикл і призводить до вивільнення цитокінів та викиду продуктів вільнорадикальних реакцій, що мають мутагенні властивості і призводять до злоякісної трансформації поверхневого епітелію [168]. Підтвердженням гіпотези є зниження ризику розвитку РЯ у жінок, які регулярно вживають нестероїдні протизапальні препарати, зокрема ацетилсаліцилову кислоту і парацетамол. Кінцевими мішенями сигнальної системи, що запускають нестероїдні протизапальні препарати, служать NO-синтаза, циклооксигеназа-2, VEGF, NF- $\kappa$ B, які задіяні в механізмі розвитку пухлин [39].

Гіпотеза виснаження фолікулів пояснює залежність частоти появи РЯ від віку. РЯ зазвичай розвивається відразу у період настання менопаузи, коли спостерігається виснаження фолікулів. Цей процес призводить до зростання концентрації гонадотропінів у сироватці крові, які стимулюють розвиток запального процесу в яєчнику, що зумовлює трансформацію клітин поверхневого епітелію та розвиток пухлин. Крім того, безперервна овуляція і гонадотропінова стимуляція прискорюють виснаження фолікулів яєчників. Своєю чергою використання протизаплідних пігулок та інгібіторів циклооксигенази забезпечує збереження фолікулів. Циклооксигенази беруть участь у розвитку фолікулів та овуляції, тому їхнє інгібування може гальмувати дозрівання фолікула і тим самим збільшувати тривалість його життя [196]. Отже, збереження фолікулів та уповільнення процесу репродуктивного старіння може запобігти РЯ або зменшити ризик розвитку цієї хвороби.

Інсулін, як було показано, також впливає на мітогенну і антиапоптотичні властивості і безпосередньо бере участь у розвитку деяких видів раку [146, 206]. При високій концентрації інсулін може зв'язуватися з рецептором ІФР-1 і активувати внутрішньоклітинний сигнальний шлях. Інсулін може також підсилювати розвиток РЯ через його вплив на синтез і метаболізм інших гормонів. Він може стимулювати ЛГ-індукований синтез андрогенів і є потужним десенсибілізатором (даун-регулятором) синтезу глобуліну, що зв'язує

статевий гормон (ГСПГ) та ІФР-1 зв'язуючого протеїну-1, тому, є фактором, який обумовлює наявність вільної біологічно активної фракції стероїдних гормонів і ІФР-1 [146, 206]. Припускають, що ожиріння, яке є частою причиною гіперінсулінемії в розвинених країнах, може також сприяти розвитку РЯ.

Онкомаркери в діагностиці та прогнозуванні РЯ. Не дивлячись на удосконалення методів діагностики та лікування хворих на злоякісні епітеліальні пухлини яєчника, віддалені результати лікування все ще залишаються незадовільними. З одного боку, це може бути пов'язане з високою агресивністю РЯ, а з іншого – з резистентністю пухлин до протипухлинних препаратів, в зв'язку з чим у переважній більшості хворих спостерігається прогресування пухлинного процесу [19]. Рання діагностика РЯ, точне встановлення стадії захворювання, які дозволяють вибрати адекватну програму комбінованого лікування, багато в чому визначають прогноз захворювання. Прихований перебіг захворювання зумовлює пріоритетність ранньої діагностики РЯ, що є найбільш актуальною проблемою біохімії та онкогінекології. Вирішення її, на наш погляд, полягає в пошуку об'єктивних показників, що можуть бути використані при диференційній та ранній діагностиці РЯ. Найбільш успішним напрямком в цьому плані є вивчення маркерів пухлинного процесу [48, 49].

### 1.1.3 Маркери рака яєчника

У наш час відомі чотири основні типи маркерів: плацентарні антигени, метаболічні маркери, онкофетальні антигени та антигени мембранних структур пухлинних клітин [143, 183, 184, 195, 215]. Найбільшого поширення при діагностиці раку яєчника набув антиген сироватки крові СА-125 [5, 7, 33, 48, 49, 151, 174]. Тобто, з метою діагности та постопераційного лікування найчастіше використовують визначення специфічного антигену в сироватці крові СА-125.

Цей антиген - високомолекулярний глікопротеїн, який наявний в епітелії яєчника в нормі. Підвищення рівня СА-125 спостерігають при епітеліальній карциномі яєчника і воно певною мірою корелює з прогресуванням пухлини. Зниження концентрації маркера свідчить про прогресивну реакцію на лікування.

Визначення СА-125 багатьма авторами визнається достатньо інформативним тестом виявлення злоякісних пухлин яєчників ептеліального походження [5, 7, 102, 151]. Верхня межа норми СА-125 не перевищує 35 Од/мл, пограничні значення – 30-40 Од/мл.

Припускається, що інформативними маркерами на рак яєчника також можуть бути співвідношення нейтрофілів до лімфоцитів, лімфоцитів до моноцитів [118, 152, 167, 188, 216], а також активність мієлопероксидази [89, 109, 152, 184, 185]. Слід відмітити, що зміни активності мієлопероксидази можуть бути маркерами і інших патологічних станів [64, 101, 134, 170, 201, 205].

## 1.2 Функціональна характеристика лімфоцитів крові

Імунна система є однією з інтегральних систем організму, що дуже швидко реагує на будь-які впливи, а стан імунологічної реактивності сьогодні розглядається як один з ранніх і чутливих критеріїв несприятливого впливу шкідливих чинників екзо- та ендogenous походження [11, 12, 15, 136, 139, 150].

Імунна система організму є складно організованою системою з точки зору її функціонування. Ензими імунокомпетентних клітин беруть участь на різних рівнях регуляції, проявляючи специфічний і неспецифічний ефект. Для імунологічної реакції характерні всі типи ензиматичної регуляції. У відкритій термодинамічній системі клітини проходять багатостадійні, ланцюгові, хвильові процеси, які забезпечують системність і стабільність адаптивної імунної відповіді клітини (організму). Проте, існують і принципові відмінності ензимології імунокомпетентних систем: їх колосальне біорізноманіття, складний і активно функціональний рецепторний апарат, кооперативні взаємодії, імунологічна пам'ять. Всі ці процеси забезпечуються ензиматичними системами. Для кожної ІКК характерні як загальні, так і специфічні каскади ензиматичних процесів. Водночас, показана імуномодуляторна активність деяких ензимів імунокомпетентних клітин [11, 12, 22].

Лімфоцити є гетерогенною популяцією клітин і центральною ланкою в специфічних імунологічних реакціях. Лімфоцити - представники групи

незернистих лейкоцитів, що характеризуються специфічним співвідношенням ядерно-цитоплазматичного матеріалу: великі, округлої форми ядра на фоні незначного об'єму базofil'ної цитоплазми, яка огортає ядро на зразок перстня.

За функціональними ознаками розрізняють три типи лімфоцитів: В-лімфоцити, Т-лімфоцити, НК-клітини. У крові людини кількість лімфоцитів становить в нормі близько 20-35 % всіх лейкоцитів. Вміст Т-лімфоцитів у ківі людини складає 65-80 % від загальної кількості лімфоцитів, В-лімфоцитів – 8-20 %, НК-лімфоцитів – 5-20 % [11, 15]. Різні типи лімфоцитів походять від загального лімфоїдного попередника, перш ніж диференціюватись в окремі типи [15, 175].

Характерною особливістю лімфоцитів є те, що за умов значної морфологічної подібності цим клітинам властива виразна функціональна гетерогенність, яка забезпечує активну участь лімфоцитів у реакціях як клітинного, так і гуморального імунітету.

Центральну роль в протипухлинному захисті організму відіграють Т-лімфоцити. Вони здійснюють протипухлинний захист шляхом знищення ракових клітин, а також синтезу речовин, що активують інші клітини імунної системи. Т-лімфоцити поділяються на різні типи. Одні Т-лімфоцити вбивають ракові клітини - Т-кілери, інші допомагають останнім вбивати ракові клітини - Т-хелпери. Вважається, що наявність або відсутність певних груп Т лімфоцитів, пов'язана з важливими відмінностями в прогнозі розвитку РЯ у жінок [68]. Дослідження парафінізованих тканин підтвердило це положення і показало, що наявність лімфоїдної інфільтрації ПЛ-лімфоцитами (пухлино-інфільтруючі лімфоцити) такими, як CD3<sup>+</sup> і збільшення кількості цитотоксичних лімфоцитів CD8 пов'язані зі збільшенням тривалості життя пацієнтів. Наприклад, у випадку CD3<sup>+</sup> ПЛ-ів виявлено, що пацієнти з високою кількістю CD3<sup>+</sup> клітин жили на 60 місяців довше за пацієнтів з низьким вмістом цих клітин [206]. Знищення пухлинних клітин яєчників здійснюється також натуральними кілерами (НК-клітинами). Використовуючи імуногістохімічне дослідження, автори довели, що пухлини містили також CD4<sup>+</sup> і CD8<sup>+</sup> клітини, макрофаги становили понад 20% проаналізованих клітин [30, 31, 68].

Наявність CD3<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup> клітин в асцитичній рідині, взятій у пацієнтів з РЯ зворотно корелює з вмістом васкулярного ендотеліального фактора росту (VEGF). На додачу, низький CD3<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup> вміст корелював з поганим прогнозом і резистентністю до препаратів платини [68].

Підсумовуючи вище наведені дані, важливо зазначити, що оскільки внутрішньоклітинний метаболізм лімфоцитів ґрунтується на фізіологічно та біохімічно закріпленій здатності цих клітини швидко реагувати на будь-які зміни гомеостазу в організмі, то модуляція активності ензимів у лімфоцитах настає значно раніше, ніж змінюються їх морфологічні та функціональні показники [12, 33].

Загалом взаємозв'язок змін субпопуляційного складу та функціональної активності лімфоцитів дає змогу використовувати статус лімфоцитів як “метаболічного дзеркала” організму [11, 12, 15, 22, 68, ]. Ми припускаємо, що лімфоцити периферичної крові також можуть бути зручною та адекватною моделлю для вивчення особливостей функціонування регуляторних систем як у практично здорових осіб, так і при неопластичній трансформації яєчника, в яких задіяні аргіназ-NO-синтазна та Ca<sup>2+</sup>,Mg<sup>2+</sup>-АТФ-залежні транспортувальні системи.

### 1.3 Пероксидація ліпідів і система антиоксидантного захисту у лімфоцитах периферичної крові

Патологічні процеси, які відбуваються у клітинах зумовлені перш за все порушенням регуляторних систем, активацією процесів пероксидації ліпідів і порушенням системи антиоксидантного захисту [3, 6, 31, 129, 149, 220].

У результаті окисно-відновних реакцій в організмі тварин постійно проходить генерація активних форм кисню (АФК), які відіграють важливу роль у багатьох фізіологічних і біохімічних процесах: регуляції тонуусу судин, клітинній проліферації, синтезі простагландинів, передачі сигналів від міжклітинних сигнальних молекул на регуляторні системи, які контролюють експресію генів, мікробіцидній дії фагоцитів. До АФК належать вільні радикали,



продукти неповного відновлення атомарного кисню, а також пероксид водню, синглетний кисень, озон, гіпохлорит, пероксинітрит. За умов фізіологічного стану організму концентрація АФК у тканинах є невисокою  $\text{H}_2\text{O}_2$  -  $10^{-8}$  М,  $\text{O}_2^-$  -  $10^{-11}$  М,  $\text{OH}^-$  <  $10^{-11}$  М [3, 6, 192].

Під дією екстремальних факторів різного походження (хімічне забруднення, іонізуюче випромінювання, гіпер- і гіпоксія, токсичні речовини, запальні процеси) утворення АФК у живих організмів інтенсифікується, що спричиняє оксидативний стрес [63]. За нормальних фізіологічних умов АФК не нагромаджуються у клітинах. Будь-яка стресова реакція організму в нормі супроводжується короточасним збільшенням кількості АФК. Під дією АФК у клітинах проходить активація експресії редокс-чутливих генів, багато з яких необхідні для захисту клітин від токсичної дії окиснювального стресу, зокрема глутатіонпероксидази, каталази, супероксиддисмутази, глутатіонредуктази,  $\gamma$ -глутамілцистеїнсинтетази. Одним із проявів токсичної дії метаболітів кисню є інтенсифікація реакцій вільнорадикального окиснення. Вільнорадикальне окиснення є універсальним механізмом, за допомогою якого контролюються найважливіші гомеостатичні фізико-хімічні параметри клітини: в'язкість, вибіркова проникність і цілісність клітинних мембран [6, 35, 36, ].

За участі вільних радикалів відбувається детоксикація чужорідних сполук, що надходять в організм. Радикали й продукти вільнорадикального окиснення впливають на імунітет, структуру й функцію біологічних мембран, акумуляцію й біотрансформацію енергії. Не викликає сумніву, що наявність вільних радикалів в організмі має певне фізіологічне значення. Перебіг багатьох біологічних процесів неможливий без вільних радикалів. Відомо, що вільні радикали відіграють важливу роль у транспорті електронів у дихальному ланцюзі, індукції утворення пор у мітохондріальній мембрані, окисному фосфорилуванні. Окисні процеси за участю активованих кисневих метаболітів - невід'ємна умова існування живих організмів. Вони виконують функцію між- і внутрішньоклітинних месенджерів, модуляторів та індукторів у біохімічній регуляції й реалізації метаболічних процесів, є найпершою і найбільш мобільною ланкою в адаптаційній перебудові організму при екстремальних впливах.

Інтенсифікація процесів вільнорадикального окиснення під дією АФК призводить до посилення пероксидного окиснення ліпідів, окисної модифікації білків (ОМБ), деструкції нуклеїнових кислот, вуглеводів, що спричиняє структурні та метаболічні порушення у клітинах [3]. Однією з основних причин пошкодження і загибелі клітини внаслідок дії АФК на сьогодні вважається пероксидне окиснення ліпідів [3]. Цим шляхом окиснюються ненасичені жирні кислоти, що може бути причиною порушення цілісності та властивостей біологічних мембран. [6]. Це призводить до змін активності аргіназо-NO-синтазної та іон-транспортувальних систем і, відповідно до зміни концентрації NO та  $Ca^{2+}$  в клітині, які є внутрішньоклітинними месенджерами і, прямо чи опосередковано, регулюють більшість клітинних функцій [13, 20, 198, 210].

У знешкодженні вторинних продуктів пероксидації та інших окиснених речовин головну роль відіграють ряд антиоксидантних систем, зокрема глутатіонова антипероксидна система, як найбільш потужна [129]. Завдяки каталітичній активності глутатіонпероксидази в клітинах відбувається відновлення  $H_2O_2$  та гідропероксидів органічних молекул до відповідних гідроксисполук. Цей процес здійснюється з використанням відновленого глутатіону. Глутатіонредуктаза – NADPH-залежний фермент, який забезпечує реакцію відновлення окисненої форми глутатіону та, відповідно, рециркулювання GSH. До складу цієї захисної системи також входить глутатіонтрансфераза, ензим, що каталізує кон'югацію відновленого глутатіону з електрофільними сполуками і також виконує захисну функцію [132, 133].

#### 1.4 Функціональна характеристика та роль $Ca^{2+}$ , $Mg^{2+}$ -АТФаз у лімфоцитах крові при раку яєчника

У лімфоцитах повинна існувати досконала система регуляції клітинного гомеостазу, а також внутрішньоклітинної  $Ca^{2+}$ -сигналізації для виконання ними своїх функцій [214]. Регуляторні механізми підтримання клітинного гомеостазу забезпечується різними ензиматичними системами клітини. Серед них важлива роль належить транспортувальним системам, зокрема АТФ-гідролазним системам ( $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ -АТФазі та  $Na^+$ ,  $K^+$ -АТФазі) [88, 176, 199, 200, 214]. Вивчення

змін АТФазної активності імунокомпетентних клітин при патологічних станах викликає значний інтерес у дослідників медико-біологічного напрямку.

$\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ -АТФаза ( $\text{Ca}^{2+}$ -активована,  $\text{Mg}^{2+}$ -залежна АТФ-гідролаза) є системою енергозалежного переміщення йонів  $\text{Ca}^{2+}$ . Вона здійснює спряжений гідроліз АТФ із транспортуванням йонів  $\text{Ca}^{2+}$  крізь мембрану. Відомо, що  $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ -АТФаза представлена двома ізоензимами, які відрізняються за будовою, локалізацією в клітині і способами регуляції їх активності. В клітинах  $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ -АТФаза локалізована в плазматичній мембрані та мембранах ендоплазматичного ретикулуму [14]. Функціонування  $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ -АТФаз запобігає надлишковому нагромадженню  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозолі. Обидві транспортувальні системи здатні створювати більше, ніж 10 000-кратний градієнт  $\text{Ca}^{2+}$  на своїх мембранах.

Про важливість підтримання внутрішньоклітинного гомеостазу  $\text{Ca}^{2+}$  цілий ряд даних. Так, у лімфоцитах крові щурів з модельованим артритом встановлено зниження  $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазної активності плазматичної мембрани та зростання внутрішньоклітинного кальцію [ $\text{Ca}^{2+}$ ]<sub>i</sub> [178]. Іншими дослідниками [111] виявлене зростання базального рівня [ $\text{Ca}^{2+}$ ]<sub>i</sub> та зниження активності  $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ -АТФази плазматичної мембрани лімфоцитів крові хворих з цукровим діабетом II типу. Як відомо, діабет II типу розглядають як аутоімунне захворювання. Причому найбільше зниження АТФазної активності спостерігається у хворих на цукровий діабет у розгорнутій стадії, з ускладненими ангіопатіями, гангреною ноги і гнійними запальними процесами.

Поліпшення клінічної картини та компенсація вуглеводного обміну супроводжуються тенденцією до нормалізації АТФазної активності. Вивчення АТФазної активності у хворих на цукровий діабет в динаміці дає можливість оцінити ступінь гіпоксії, зрозуміти природу механізмів компенсації, а також оцінити ефективність фармакотерапії.

Порушення активності АТФазних систем лімфоцитів периферичної крові спостерігається також при інших патологіях. Встановлено [146] зростання [ $\text{Ca}^{2+}$ ]<sub>i</sub> у хворих з нирковою недостатністю, викликане зниженням ензиматичної активності  $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ -АТФази. Виявлено, що у лімфоцитів крові хворих на

первинну артеріальну гіпертензію ініціація роботи  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФази плазматичної мембрани лімфоцитів крові здійснюється при вищих значеннях  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ; порівняно з практично здоровими особами [6]. В лімфоцитах крові пацієнтів з ішемічною хворобою серця АТФазна активність підвищується, а відношення екто-АДФазної активності до АТФазної активності знижується [206]. Виявлено пригнічення загальної АТФазної та  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФазної активності в лімфоцитах крові пацієнтів з лімфогранулематозом [26].

Порушення активності АТФазних систем лімфоцитів крові виявлені у пацієнтів з гнійними запаленнями. Максимальне пригнічення активності АТФазної активності лімфоцитів крові було відмічено у хворих із дифузним перитонітом, деструктивним апендицитом та гангренозним холециститом. Після проведеного лікування активність АТФази лімфоцитів периферичної крові зростала. Проте, на момент виписки пацієнтів зі стаціонару, вона не досягала контрольних таких величин, як у здорових осіб [176].

Інгібування активності  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФази плазматичної мембрани і мембран ЕПР лімфоцитів виявлено в чоловіків, які страждають еректильною дисфункцією різної генези. Після проведеного комплексного лікування пацієнтів відмічається зростання АТФазних активностей і наближення їх значень до контрольних [18].

У лімфоцитах крові щурів з експериментальним сепсисом встановлено зростання екто-АТФазної активності [114]. У хворих з хронічним генітальним хламідіозом встановлено [51] зростання  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазної та  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФазної активності лімфоцитів периферичної крові [51].

Таким чином, показники, що характеризують стан біологічних мембран лімфоцитів, а саме – зміни активностей АТФ-гідролаз, є достатньо інформативним для оцінки характеру порушень функціональної активності імунокомпетентних клітин. Ці зміни можуть виступати прогностичним та діагностичним критеріями для визначення ступеня пошкодження імунокомпетентних клітин. Очевидно, що зміни функціональної активності клітин носять універсальний характер, можуть використовуватись для оцінки їх функціонального стану і при ряді патологій.

## 1.5 Характеристика та роль аргінази лімфоцитів крові при раку яєчника

Відомо, що аргіназа (L-аргінін-амідиногідролаза) (КФ. 3.5.3.1) каталізує гідролітичне розщеплення L-аргініну до сечовини і L-орнітину [73, 74, 81, 157, 158, 162, 163]. Крім участі в орнітіновому циклі, аргіназа, як відомо, відіграє важливу роль і в багатьох інших процесах, що відбуваються в різних тканинах живих організмів, зокрема, орнітин є попередником синтезу проліну - амінокислоти, необхідної для синтезу колагену і поліамінів, ключових компонентів клітинного росту і диференціації, які важливі при загоєнні ран, а також є інгібіторами NO-синтаз [18, 21, 50, 51, 115, 162, 202, 203].

В останні роки цікавість до аргінази була стимульована демонстрацією її участі в метаболізмі оксиду азоту [103, 115, 123, 162, 163, 202]. Аргіназа як конкуруючий за субстрат ензим і метаболіти наступного перетворення її продуктів – поліаміни – здатні істотно впливати на активність NO-синтазної реакції.

Аргіназа відноситься до ензимів, які володіють абсолютною специфічністю, діючи тільки на один субстрат. Наприклад, такі подібні з аргініном речовини, як гуанідин і креатин, не підлягають розщепленню аргіназою. Відомо, що аргіназа може слугувати ефективним засобом в ензимотерапії деяких видів раку [113, 162].

Основною функцією аргінази в тваринних організмах є її участь в детоксикації аміаку. Аргіназа, мабуть, є найважливішим ензимом, що регулює швидкість циклу сечовини і забезпечує правильну роботу детоксикації аміаку. Аргіназа позапечінкових тканин підтримує оптимальний рівень L-аргініну в клітинах і може бути одним з факторів, відповідальним за підтримання нормального рівня сечовини в крові у пацієнтів з генетично зумовленими ензиматичними блоками циклу сечовини [161, 162, 163].

Аргіназа також потенційно регулює аргінін-залежні імунні функції, такі як активація Т-лімфоцитів. Показано, що метаболізм L-аргініну у мієлоїдних супресорах є одним з механізмів регуляції цих клітин. Цей механізм полягає у

зміні ензиматичної активності iNOS та аргінази. При цьому цитокіни Th-2 підвищують активність NO-синтази, а цитокіни Th-2 – аргінази. Таким чином, NO-синтаза та аргіназа можуть діяти роздільно і синергічно *in vivo*, контролюючи специфічні клітинні відповіді Т-клітин [68,70, 79].

Нині у ссавців ідентифіковано дві ізоформи цього ензиму: аргіназа 1 і аргіназа 2. Ці ізоформи є продуктами генів, які у людини локалізовані в хромосомах 6q23 (аргіназа 1) и 14q24 (аргіназа 2) [161, 162]. Аргіназа 1 типу знаходиться в цитоплазмі клітин, найбільше - печінки, також виявлена в еритроцитах, в тканині молочної залози в період лактації, в нирках та інших органах. Аргіназа бере участь в детоксикації амонію через уреазний цикл, в опосередкованій макрофагами цитотоксичності. Висока активність ферменту спостерігається в проліферуючих тканинах, у ранах, що гояться проліферуючих лімфоцитах і в пухлинах. Експресія аргінази 1 також відмічається в мононуклеарах після травми і хірургічних втручань [169, 179], що вказує на потенційну роль аргінази в процесах регенерації [169]. Активність аргінази 1 використовують не тільки як маркер ранніх стадій пошкодження печінки, але і як маркер раннього закінчення процесу пошкодження, наприклад, у хворих, яким була зроблена часткова резекція печінки. Підвищення активності аргінази після операції свідчить про відновлення функції печінки, причому аргіназа є більш раннім і чутливим маркером порівняно з амінотрансферазами. Крім того, рівень активності аргінази 1 підвищується при багатьох запальних процесах, що може бути наслідком дії на неї певних медіаторів запалення, а також при алергічних процесах, наприклад, астмі. Аргіназа 1 бере участь в автоімунному запаленні нервових тканин (енцефаломієліті).

Аргіназа 1 експресується в гладком'язових клітинах судин і індукується інтерлейкінами-4 і -13, трансформується тканинним фактором росту ТФР- $\beta$  и лізофосфатидилхоліном [103, 105, 106]. Індукція аргінази типу 1 ТФР- $\beta$  призводить до підвищення конвертування аргініну в пролін і корелює з підвищенням продукції колагену 1 [103]. Підвищення експресії аргінази 1 в гладком'язових клітинах аорти в результаті стабільної трансфекції (трансформації) з аргіназою 1, експресування плазміди або впливу ТФР- $\beta$ ,

лізофосфатидилхоліном призводить до збільшення продукції поліамінів і, що більш важливо — до підвищення ступеня проліферації [218]. Інгібування аргінази призводить до зменшення кількості поліамінів [103]. В ряді досліджень з використанням культури ендотеліальних клітин з підвищеним проявом аргінази 1 і 2 виявлено, що аргіназа допомагає регулювати синтез поліамінів і проліферацію ендотеліальних клітин [103, 218]. Більше того, в другій половині процесу генерації орнітину в ендотеліальних клітинах аргіназа забезпечує утворення проліну, а ступінь перетворення L-аргініну в пролін зростає в міру підвищення активності ендотеліальних клітин [103, 218]. Аргіназа є важливим фактором в регуляції синтезу колагену, багатого проліном протеїну, в ендотеліальних і прилеглих клітинах судини. Зростання експресії аргінази під впливом прозапальних цитокінів IL-4 та IL-13 призводить до зростання синтезу орнітину. Небагато L-аргінін-опосередкованого орнітину перетворюється в глутамат, ця трансформація збільшується в клітинах з підвищеною активністю аргінази, але ступінь цього перетворення, безсумнівно, недооцінюється, оскільки в ендотеліальних клітинах відбувається активний перерозподіл вуглецевого скелету до інших метаболітів за допомогою трансаміназ [103, 218]. Ці дані демонструють, що активність аргінази може обмежувати проліферацію гладком'язевих клітин і розглядається як фактор регулювання гіперплазії інтими. Недостатня активність аргінази 1 призводить до порушень циклу сечовини, що проявляється зростанням рівня L-аргініну в крові – гіпераргінемія. Багаточисельні дослідження показують, що дефіцит аргінази 1 індукує 2 форму аргінази, яка компенсує недостачу першої шляхом регулювання концентрації клітинного L-аргініну. У випадках пацієнтів з гіпераргінемією лікування базується на застосуванні дієти багатой на протеїн.

Аргіназа 1 експресується в еритроцитах людини і забезпечує активний процес гемолізу [138, 162]. Підвищення рівня аргінази може призвести до зменшення концентрації L-аргініну в циркулюючій крові, що може супроводжуватись зниженням продукції NO і судинною дисфункцією, наприклад при легеневій гіпертензії, цукровому діабеті [46, 162].

Аргіназа 2 типу – ензим мітохондріальної локалізації, який виявлено у різних типах клітин, зокрема у лейкоцитах і лімфоцитах периферичної крові [162, 163, 169]. Фізіологічна роль аргінази 2, зумовлена її участю у численних метаболічних процесах у клітині свідчить про те, що ензим належить до важливої ланки у розвитку багатьох патологічних станів організму, зокрема автоімунних захворювань. Відомо, що аргіназа модулює імунну відповідь. Показано [68, 70], що гуморальні протизапальні цитокіни IL-4, IL-10, IL-13 и TGF- $\beta$  спричиняють експресію аргінази. Вважають, що висока експресія аргінази свідчить про гуморальну відповідь з боку імунної системи на антиген.

Експресія аргінази 2 може бути індукована через циклічний АМФ або IL-10. Причиною зростання активності обох ізоформ аргінази можуть бути цитокіни IL-4, -10, 13, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , які виділяються Т-лімфоцитами і макрофагами у відповідь на хворобу, що розвивається [68, 70, 150].

Було доведено, що наявність внутрішньоклітинного аргініну є лімітуючим фактором синтезу оксиду азоту (NO), хоча, також було показано, що позаклітинні концентрації аргініну відіграють важливішу роль у регуляції синтезу NO порівняно з внутрішньоклітинним аргініном.

#### 1.6 Характеристика та роль Ca<sup>2+</sup>-залежної та Ca<sup>2+</sup>-незалежної ізоформ NO-синтази лімфоцитів крові при раку яєчника

За фізіологічних умов синтез оксиду азоту з L-аргініну відбувається за участі ізоензимів NO-синтази. В організмі людини NO синтезується за допомогою трьох ізоформ ензиму синтази оксиду азоту (Nitric Oxide Synthase - NOS; КФ 1.14.13.39.): nNOS (так званий тип 1); iNOS (також відома як тип 2), яка, на відміну від nNOS і eNOS, не експресується постійно (конститутивно); синтез цього ензиму відбувається тільки при патологічних станах і може бути індукований в клітинах різних типів при дії запальних стимулів [4, 29, 62, 77, 153, 157]. eNOS (також відома як тип 3), вперше ідентифікована в клітинах ендотелію кровоносних судин.



Ізоензими NOS є диоксигеназами, які використовують молекулярний кисень і NADPH для трансформації L-аргініну в L-цитрулін і NO. Всі три ізоформи ензиму мають подібну молекулярну структуру і потребують наявності тіолозв'язаного гему, NADPH, флавінаденіндинуклеотиду (ФАД), флавінмононуклеотиду (ФМН), 5,6,7,8-тетрагідробіоптерину, глутатіону [153]. Нейрональна та ендотеліальна NOS активуються при зв'язуванні з кальмодуліном і мають подібну кінетику утворення NO [111, 153]. NO, утворений nNOS і eNOS, забезпечує нейропередачу в нітритергічних нейронах, релаксацію кровоносних судин і гладком'язових органів, пригнічення адгезії та агрегації циркулюючих клітин крові, регуляцію синтезу і секреції гормонів [136]. Активність ендотеліальної та нейрональної NOS залежить від внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію. Їх наявність є необхідною для прояву активності eNOS та nNOS і не обов'язковою для індукційної ізоформи NOS. Збільшення продукції оксиду азоту відбувається пропорційно надходженню в цитоплазму іонів кальцію. Стимулюючими факторами входження кальцію в клітину і в такий спосіб підвищуючи кальціезалежну активність ензиму є ацетилхолін, серотонін, глутамат, АДФ та інші біологічно активні речовини [157, 166].

Нейрональна та індукційна NOS локалізовані у цитозолі, а ендотеліальна ізоформа – мембранозв'язана. 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 ізоензимів NOS. Регулювання та роль кожної ізоформи NOS у біологічних процесах на рівні різних тканинах є предметом досліджень, як і розробка селективних і специфічних інгібіторів NOS [130, 137].

NO розглядають як перший представник нового класу сигнальних молекул, які здійснюють міжклітинну комунікацію і регуляцію багатьох функцій в різних тканинах і системах організму. Зміни інтенсивності синтезу NO притаманні організмам за дії різних факторів і змін умов середовища,

оскільки ця багатофункціональна ефекторна молекула в багатьох випадках сприяє адаптації різних систем організму до шкідливих факторів впливу. Оксид азоту виконує роль нейромодулятора в центральній нервовій системі, а також в нервово-м'язевих синапсах. Впродовж останнього десятиріччя значна увага приділяється вивченню метаболізму оксиду азоту в патогенезі різноманітних захворювань.

Важливу роль у проліферації пухлинних клітин відіграє метаболізм L-аргініну. Перетворення L-аргініну в оксид азоту (NO) за допомогою синтази оксиду азоту або в орнітин за участі аргінази є важливими біологічними шляхами. Щодо оксиду азоту, то за різними літературними даними, він відіграє подвійну роль при злоякісному рості. У високих концентраціях він інгібує, а у низьких – стимулює пухлинний ріст і метастазування [79, 93, 115].

Таким чином, дослідження особливостей змін активностей ензимів аргіназо-NO-синтазної,  $\text{Ca}^{2+}$ -залежної АТФ-гідролазної та антиоксидантної систем при неопластичній трансформації яєчника може слугувати основою для підвищення якості діагностування та ефективності корекції даної патології.

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### 2.1 Об'єкт досліджень. Загальна характеристика досліджуваних груп жінок

Дослідження проводили на лімфоцитах крові практично здорових жінок і пацієток хворих на рак яєчника. Загальна кількість практично (клінічно) здорових жінок, репрезентативних за віком (середній вік  $53,8 \pm 5,4$  років) становила 41 особа. В окремих експериментах цю групу розділяли на дві, віком 20-40 років ( $n=25$ ) та віком 41-60 років ( $n=16$ ). Ці групи формували з осіб волонтерів (добровольців) із числа працівників Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького, а також працівників Львівського державного регіонального онкологічного лікувально-діагностичного центру (рис. 2.1).

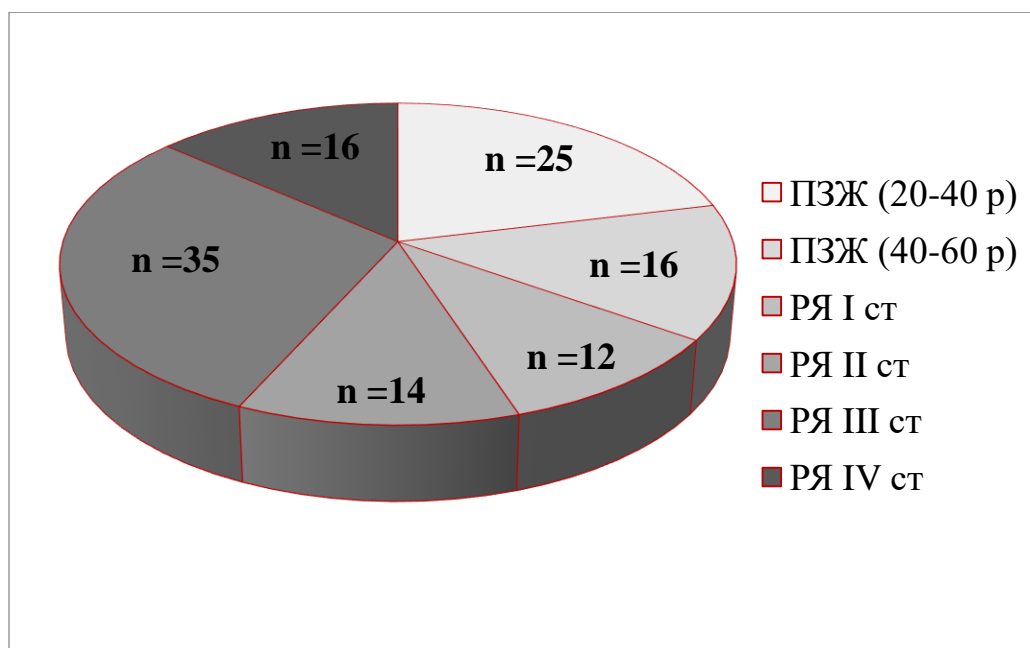


Рис. 2.1. Схема розподілу жінок за досліджуваними групами.

Групу жінок із неопластичними змінами яєчника склали 77 жінок, віком 24-75 років (середній вік  $55,4 \pm 5,3$  років), які перебували на стаціонарному лікуванні

у Львівському державному регіональному онкологічному лікувально-діагностичному центрі в період 2018-2021 роках і пройшли повне клініко-лабораторне обстеження. У дослідження включали пацієток зі встановленим діагнозом раку яєчника без наявності супутніх захворювань на момент початку дослідження (n = 77).

Дослідну групу було розділено на 4 підгрупи, в залежності від стадії розвитку раку яєчника [3, 4].

Підгрупа 1 – стадія 1, що характеризується пухлиною, обмеженою одним яєчником (n=12);

Підгрупа 2 - стадія 2, пухлина вражає один або два яєчника та поширюється в ділянку таза (n=14);

Підгрупа 3 – стадія 3, пухлина поширена на один або два яєчники та дає метастази по очеревині за межі таза (або метастази в заочеревинних лімфатичних вузлах) (n=35);

Підгрупа 4 – стадія 4, пухлина поширена на один або два яєчники з віддаленими метастазами (n=16).

Відповідні діагнози встановлювались на основі широкого комплексу загальноклінічних, лабораторних, інструментальних, спеціальних онкологічних методів досліджень. Окрім того, для диференціювання практично здорових жінок і діагностування раку яєчника визначали рівень пухлинного маркера глікопротеїна СА-125 у сировотці крові [164, 190]. Усі пацієнти з раком яєчника й практично здорові особи були детально поінформовані про мету, завдання та терміни дослідження і дали письмову інформовану згоду на участь у проведенні досліджень на зразках крові.

Комісією з питань біоетичної експертизи Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького (протокол № 2 від 25 лютого 2019 р. та протокол № 1 від 25 січня 2021 р.) порушень морально-етичних норм при виконанні дисертаційної роботи не виявлено.

## 2.2 Виділення лімфоцитів периферичної крові

Для виділення лімфоцитів, забір периферичної крові у жінок дослідних груп, проводили після попереднього завершення їхнього клінічного обстеження, перед призначенням їм курсу лікування.

Забір крові, шляхом венепункції, проводився з ліктьової вени у вранішні години, умовах фізіологічного спокою, натще, у кількості 20 мл в пробірки, які стабілізували гепарином (кінцеве розведення 1:100).

Лімфоцити периферичної крові виділяли за модифікованим методом Воуит А. [30]. Кров, розведену в співвідношенні 1:1 фізіологічним розчином, нашаровували у градієнті густини фікол-тріумбасту ( $\rho = 1,08 \text{ г/см}^3$ ) й центрифугували 20 хвилин при 500 g. Зняті інтерфазні кільця моонуклеарних клітин двічі відмивали впродовж 10 хвилин фізіологічним розчином.

Після останнього центрифугування, до осаду додавали невелику кількість фізіологічного розчину, ресуспензували та, за допомогою трипанового синього, проводили підрахунок кількості живих і мертвих клітин в камері Горяєва [30]. Цілісність і життєздатність лімфоцитів крові в усіх дослідах становила не менше 95 %.

Для пермеабілізації мембран лімфоцитів крові та розкриття латентних ензиматичних активностей до суспензії додавали сапонін. Ця методика ґрунтується на роботах, виконаних на лімфоцитах раніше [20, 23, 56]. Лімфоцити крові інкубували впродовж 10 хв при помірному струшуванні у розчині, який містив сапонін у концентрації 0,2 % (оптимальна концентрація) [27, 56, 210].

### 2.3 Визначення концентрації глікопротеїну (антигену) СА-125 в сироватці крові

З метою діагностування раку яєчника визначали концентрацію антигена СА-125 в сироватці крові [151]. Сироватку крові зберігали протягом двох тижнів при 20° С. Визначення проводили імунохімічним методом з електрохемілюмінесцентною детекцією. Тест систему використовували фірми Roche Diagnostics (Швейцарія), а аналізатор Cobas 6000. Концентрацію антигена СА-125 виражали в Од/мл.

## 2.4 Оцінка стану пероксидації ліпідів за визначенням концентрації малонового діальдегіду

Принцип методу визначення МДА полягає в тому, що при високій температурі в кислому середовищі він реагує з 2-тіобарбітуровою кислотою, створюючи забарвлений триметиленовий комплекс з максимумом поглинання при  $\lambda=532$  нм [52].

Для кількісного визначення МДА до 0,2 мл суспензії клітин додавали 3 мл дистильованої води, 0,5 мл  $KmgO_4$ , суміш перемішували і через 10 хв додавали 0,5 мл  $FeSO_4$ . Через 5 хв реакцію зупиняли додаванням 1 мл 20 % розчину ТХО.

Після центрифугування, впродовж 15 хв, при 200 г надосадкову рідину по 2 мл переносили в пробірки, додавали по 0,5 мл розчину  $HCl$ , 1 мл 0,8 % розчину тіобарбітурової кислоти і залишали на 20 хв в киплячій водяній бані. Як контроль використовували проби, що містили 2 мл дистильованої води. Після появи рожевого забарвлення проби охолоджували до кімнатної температури, додавали 3 мл бутанолу і центрифугували 15 хв при 800 г.

Оптичну густину вимірювали при  $\lambda=532$  нм проти контрольної проби. Розрахунок вмісту МДА проводили використовуючи коефіцієнт молярної екстинції  $1,56 \cdot 10^5 M^{-1} \cdot cm^{-1}$  [52].

## 2.5 Визначення вмісту відновленого глутатіону в лімфоцитах крові

Для дослідження вмісту відновленого глутатіону, використовували інкубаційне середовище ( $37^{\circ}C$ ), що містило 0,2 мл 1,5 мкМ DTNB у 0,1 М калій-фосфатному буфері (рН 7,0), 0,2 мл  $H_2O$ . У цю суміш вносили 0,1 мл суспензії лімфоцитів, перемішували та через 10 хв визначали оптичну густину при  $\lambda=412$  нм. Кількість відновленого глутатіону відображали в нмоль GSH/мг протеїну [55].

## 2.6 Визначення глутатіонпероксидазної активності в лімфоцитах

периферичної крові

Суть методу полягає у розвитку кольорової реакції з 5,5-дітіо-біс(2-нітро-бензойною кислотою (ДТНБК) з утворенням кольорового продукту тіонітрофенільного аніону (ТНФА), кількість якого прямо пропорційна кількості SH-груп, що прореагували з ДТНБК [37, 149].

Для визначення глутатіонпероксидазної активності, 0,1 мл суспензії лімфоцитів вносили в 0,8 мл інкубаційного середовища, що готували на 0,1 М трис-НСІ буфері (рН 8,0) та містило 2 мМ ЕДТА, 12 мМ  $\text{NaN}_3$ , 4,8 мМ GSH. Після 10 хв інкубації, при  $37^\circ\text{C}$ , додавали 100 мкл 20 мМ гідропероксиду трет бутилу та інкубували ще 30 хв. Реакцію зупиняли додаванням 0,2 мл 20 % ТХО охолодженої. Проби центрифугували 10 хв при 800 g. До 50 мкл супернатанту додавали 5 мл 0,1 М трис-НСІ буферу, 50 мкл реактиву Елмана. В контрольні зразки 0,1 мл гемолізату додавали після ТХО. Через 5 хв визначали оптичну густину проб на спектрофотометрі СФ-46 при  $\lambda = 412$  нм в 1 см кюветі проти  $\text{H}_2\text{O}$ . Активність ензиму відображали в нмоль GSH/хв на 1 мг протеїну, враховуючи молярний коефіцієнт екстинції ТНФА  $13,6 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

2.7 Визначення глутатіонредуктазної активності в лімфоцитах периферичної крові

Глутатіонредуктазну активність лімфоцитів периферичної крові визначали спектрофотометрично при  $\lambda = 340$  нм в 0,2 М калій-фосфатному буфері (рН 7,0), що містив 2 мМ ЕДТА. На 1 мл об'єму кювети вносили 0,5 мл калій-фосфатного буферу ( $30^\circ\text{C}$ ), 50 мкл 2 мкМ NADPH, приготовленому на 10 мкМ трис-НСІ буфері (рН 7,0), 50 мкл 20 мкМ GSH. До кінцевого об'єму доводили дистильованою водою. Реакцію ініціювали додаванням до кювети 100 мкл суспензії клітин. Час інкубації становив 10 хв. В якості контролю використовували проби без NADPH, без GSH і без субстрату. ГР-активність виражали в нмолях NADPH/хв на 1 мг протеїну, враховуючи, що молярний коефіцієнт екстинції NADPH  $= 6,22 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  [149].

## 2.8 Визначення глутатіонтрансферазної активності в лімфоцитах периферичної крові

Глутатіонтрансферазну активність лімфоцитів периферичної крові визначали спектрофотометрично при  $\lambda=340$  нм в 0,1 М калій-фосфатному буфері (рН 6,5), що містив 1 мМ ЕДТА 1 мМ 1-хлор-2,4-динітробензол, 5 мМ GSH. Суспензію клітин доводили до 0,4 мг протеїну на 1 мл реакційного середовища. ГТ-активність розраховували в нмоль GSH/хв на 1 мг протеїну [149], враховуючи, що молярний коефіцієнт екстинції 1-хлор-2,4-динітробензолу =  $9,6 \cdot 10^{-3} \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

## 2.9 Визначення аргіназної активності в лімфоцитах периферичної крові

Активність аргінази лімфоцитів периферичної крові визначали за утворенням сечовини, вміст якої вимірювали за допомогою діагностичного набору відповідно до інструкції фірми-виробника (Simko, Україна). Ензиматичну реакцію ініціювали внесенням аліквоти (150 мкл) пермеабілізованих сапоніном лімфоцитів в інкубаційне середовище наступного складу (мМ): 20 Тріс НСІ, 100 L-аргінін, 2  $\text{MnCl}_2$  (рН = 9,5), об'ємом 300 мкл; кількість протеїну у пробі – 50 – 100 мкг/мл. Інкубацію здійснювали 30 хв, при температурі  $37^{\circ} \text{C}$  на шейкер. Реакцію зупиняли внесенням в інкубаційне середовище 40 мкл 50%-ї трихлороцтової кислоти. У контрольні зразки замість лімфоцитарної суміші вносили відповідну аліквоту фізрозчину. Крім дослідних і контрольних, проб готували також пробу, що містить стандартний розчин сечовини (16,65 мМ). Усі зразки спектрофотометрували проти контрольних при  $\lambda=520$  нм. Активність аргінази обчислювали і виражали у нмолях сечовини/хв·мг загального протеїну у пробі [60, 169].

Дослідження кінетичних властивостей ензиматичної реакції аргінази проводили в стандартному середовищі інкубації, що було модифіковане за часом



інкубації, кількістю протеїну лімфоцитарної суміші у пробі та концентрацією субстрату (L-аргініну). Уявні кінетичні параметри, такі як максимальна миттєва швидкість реакції  $V_0$ , максимальна (платова) кількість утворення продукту реакції  $P_{max}$  та характеристичний час реакції (період напівнасичення)  $\tau$  визначали як описано в статті [25, 28].

## 2.10 Визначення активності $\text{Ca}^{2+}$ -залежної та $\text{Ca}^{2+}$ -незалежної ізоформ NO-синтази в лімфоцитах периферичної крові

Визначення NO-синтазної ензиматичної активності сапонін-перфорованих лімфоцитів проводили при  $37^\circ\text{C}$  у середовищі інкубації об'ємом 1,5 мл наступного складу: трис- $\text{HCl}$  – 0,08 M (pH 7,4),  $\text{CaCl}_2$  – 10 mM, L-аргінін – 0,15 mM,  $\text{NADPH}(\text{H}^+)$  – 0,12 mM. Контрольні та безсубстратні зразки (до яких субстрат не вводили) готували аналогічно до дослідних, але вони замість  $\text{NADPH}(\text{H}^+)$  та L-аргініну містили бідистильовану воду. NO-синтазну реакцію ініціювали внесенням до інкубаційного середовища аліквоти лімфоцитарної суміші (70 мкл); кількість лімфоцитарного протеїну у пробі не перевищувала 50–70 мкг/мл.

Дослідні проби спектрофотометрували проти контрольних та безсубстратних зразків при  $\lambda=340$  нм, після чого їх інкубували протягом 20 хв при  $37^\circ\text{C}$ . Реакцію зупиняли внесенням до реакційного середовища  $\text{HClO}_4$  (1,5 M) [40, 41]. Активність NO-синтази виражали в наномолях окисненого  $\text{NADPH}(\text{H}^+)/\text{хв}$  на 1 мг загального протеїну у пробі.

Активність  $\text{Ca}^{2+}$ -незалежної iNOS визначали аналогічно, додаючи в інкубаційне середовище селективний інгібітор індукцйбельної ізоформи аміногуанідин, 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 NO-синтази проводили в стандартному середовищі інкубації, що було модифіковане за складом певних компонентів

(концентрація субстрату – L-аргініну, час інкубації, вміст протеїну в лімфоцитарній суміші).

Уявні кінетичні параметри, що характеризують NO-синтазну реакцію – максимальну миттєву швидкість реакції  $V_0$ , максимальну (платову) кількість утворення продукту реакції  $P_{\max}$  та характеристичний час реакції  $\tau$  визначали як описано у статті [25]. Уявні кінетичні параметри, які характеризують NO-синтазну реакцію – уявну константу спорідненості (аффіності) до L-аргініну  $K_{L-Arg}$  та максимальну швидкість реакції  $V_{\max}$ , визначену за L-аргініном, розраховували у координатах Лайнуївера-Берка [25, 28].

## 2.11 Методика визначення активності $Ca^{2+}$ -активованої, $Mg^{2+}$ -залежної АТФазної активності плазматичної мембрани та ендоплазматичного ретикулулу лімфоцитів периферичної крові

$Ca^{2+}, Mg^{2+}$ -АТФазну активність лімфоцитів крові пацієнтів з РЯ й осіб групи контролю визначали, реєструючи процес гідролізу АТФ за накопиченням  $P_i$ . Визначення загальної  $Ca^{2+}, Mg^{2+}$ -АТФазної активності лімфоцитів крові проводили при 37 °С в інкубаційному середовищі (об'єм – 1 мл) такого складу (мМ): 150 КСІ; 0,05  $CaCl_2$ ; 5  $MgCl_2$ ; 5 АТФ; 1  $NaN_3$  (інгібітор мітохондріальної АТФази); 1 оубаїн (інгібітор  $Na^+$ ,  $K^+$ -АТФази) [20, 23, 25]; 20 Нерес-Трис-буфер (рН = 7,4).

Для розділення загальної  $Ca^{2+}, Mg^{2+}$ -АТФазної активності на компоненти: тапсигаргін-нечутливу  $Ca^{2+}, Mg^{2+}$ -АТФазу плазматичної мембрани і тапсигаргін-чутливу  $Ca^{2+}, Mg^{2+}$ -АТФазу мембран ЕПР до стандартного  $Ca^{2+}$ - та  $Mg^{2+}$ -вмісного середовища інкубації додавали інгібітор  $Ca^{2+}, Mg^{2+}$ -АТФази ЕПР – тапсигаргін (0,1 мкМ). Активність “базальної”  $Ca^{2+}$ -незалежної,  $Mg^{2+}$ -залежної АТФази лімфоцитів крові визначали за тих же умов, але за відсутності  $CaCl_2$  і з додаванням 1 мМ EGTA та 0,1 мкМ тапсигаргіну.

$Ca^{2+}, Mg^{2+}$ -АТФазу плазматичної мембрани розраховували як різницю між  $Ca^{2+}, Mg^{2+}$ -АТФазною активністю в присутності тапсигаргіну та “базальною”  $Ca^{2+}$ -

незалежною,  $Mg^{2+}$ -залежною АТФазною активністю.

$Ca^{2+}, Mg^{2+}$ -АТФазу мембран ЕПР оцінювали як різницю між загальною  $Ca^{2+}, Mg^{2+}$ -АТФазною активністю і  $Ca^{2+}, Mg^{2+}$ -АТФазною активністю в присутності тапсигаргіну.  $Ca^{2+}, Mg^{2+}$ -АТФазну активність виражали в мкмолях  $P_i$  у перерахунку за хв на 1 мг протеїну.

## 2.12 Визначення кількості неорганічного фосфату

Після зупинки ензиматичної реакції “стоп-розчином” суспензію центрифугували (10 хв. 1500 g) і в отриманому супернатанті, який не містив протеїну, визначали вміст неорганічного фосфору  $P_i$  за методом W. Rathbun, V. Betlach [25].

Метод базується на колориметричному визначенні кількості  $P_i$ , який утворюється в результаті ензиматичної реакції гідролізу АТФ. Фосфорна кислота здатна утворювати з молібденовою кислотою комплексну сполуку, яка легко відновлюється хлоридом олова з утворенням забарвленої в синій колір молібденової сині. До проб додавали 50 мкл 0,2 % розчину амоній молібдату, перемішували та додавали 100 мкл 6,75 мМ хлориду олова. Для розвитку забарвлення проби інкубували протягом 20 хв при кімнатній температурі. Вимірювання абсорбції проводили на однопроменевому спектрофотометрії СФ-46 при довжині хвилі  $\lambda = 660$  нм.

Визначення вмісту  $P_i$  проводили за калібрувальним графіком, для побудови якого використовували розчини однозаміщеного ортофосфату калію різної концентрації.

## 2.13 Визначення концентрації протеїну

Вміст протеїну у лімфоцитарній суміші визначали за модифікованим методом Лоурі [38], який базується на вимірюванні інтенсивності забарвлення розчину внаслідок проходження двох біохімічних реакцій: біуретової та реакції реактиву Фоліна. Реактив А: 0,1 н. NaOH; 2%-  $Na_2CO_3$  в 0,1 н. NaOH. Реактив В:

0,5 %  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  в 1 %-му виннокислоу натрію або калію. Реактив С: перед початком аналізу 1 мл реактиву В змішують з 49 мл реактиву А. У пробірки вносять досліджуваний розчин, який містив 10 – 100 мкг білка, доводили дистильованою водою до 0,4 мл, додавали 2 мл реактиву С, перемішували та інкубували при кімнатній температурі 20 хв. Потім додавали 0,2 мл реактиву Фоліна, змішували та інкубували упродовж 30 – 40 хв за кімнатної температури. Вимірювання абсорбції проводили на однопроменевому спектрофотометрі СФ-46 при довжині хвилі  $\lambda = 750$  нм. Значення концентрації протеїну знаходили по калібрувальному графіку. В якості етанолу використовували бичачий сироватковий альбумін (Sigma, США).

#### 2.14 Статистична обробка даних

Варіаційно-статистичне опрацювання даних здійснювали з використанням програмного пакета для персональних комп'ютерів *Microsoft Excel*. Визначали такі основні статистичні показники, як середнє арифметичне значення ( $M$ ), стандартну похибку ( $m$ ) та середнє квадратичне відхилення ( $\sigma$ ). Достовірність змін встановлювали за  $t$ -критерієм Стьюдента. Критичні рівні достовірності при перевірці статистичних гіпотез у дослідженнях брали рівними 0,95, 0,99 та 0,999.

Результати представлені як середнє арифметичне ( $M$ )  $\pm$  стандартна похибка середнього ( $m$ ). Кількість дослідів ( $n$ ) відповідає кількості осіб, досліджених у кожному випадку (кожен раз використовували лімфоцити крові від одного пацієнта або практично здорового донора).

Рівняння прямої лінії, що найкраще апроксимує еспериментальні дані, розраховували із використанням методу найменших квадратів. Абсолютне значення коефіцієнта кореляції  $r$  становило 0,90 – 0,98. Достовірність розрахованих параметрів прямої перевіряли за  $F$ -критерієм Фішера: достовірною вважали апроксимацію за якої  $p \leq 0,05$  [28, 128].

## РОЗДІЛ 3

### ПОКАЗНИКИ КОНЦЕНТРАЦІЇ АНТИГЕНА СА-125 ТА АКТИВНІСТЬ ЕНЗИМІВ ГЛУТАТИОНОВОЇ АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ ПРИ РОЗВИТКУ РАКУ ЯЄЧНИКА ТА ЇХ ЧУТЛИВІСТЬ ДО ІОНІВ КАЛЬЦІЮ

#### 3.1 Рівень антигену СА-125 у сироватці крові жінок хворих на рак яєчника

Рання діагностика захворювань, зокрема раку яєчника, точне встановлення стадії захворювання, які дозволяють вибрати адекватну програму комбінованого лікування, багато в чому визначають прогноз хвороби. Прихований перебіг захворювання обумовлює пріоритетність ранньої діагностики, що є найбільш актуальною проблемою фізіології, біохімії та онкогінекології [7, 47-49, 59, 82, 151, 168]. Відомо, що з віком ймовірність виникнення більшості захворювань зростає [18]. У зв'язку з тим, на виявлення найбільш ранніх донозологічних і доклінічних стадій розвитку патологічних процесів спрямовано застосування цілого ряду фізіологічних, біохімічних, морфологічних досліджень тощо.

З метою діагностики та постопераційного лікування РЯ використовують визначення специфічного антигена в сироватці крові СА-125 [7, 47-49, 59, 151, 189]. Це високомолекулярний глікопротеїн, який наявний в епітелії яєчника в нормі. Підвищення рівня СА-125 спостерігають при епітеліальній карциномі яєчника і воно в певній мірі корелює з прогресуванням росту пухлини. Зниження концентрації маркера свідчить про позитивні зміни в яєчнику внаслідок лікування.

Антиген СА-125 найбільш широко представлений серед маркерів злоякісних пухлин яєчників [47-49, 59, 151]. Визначення СА-125 багатьма авторами вважається достатньо інформативним тестом виявлення злоякісних пухлин яєчників епітеліального походження [48, 49, 152, 174]. Верхня межа концентрації СА-125 за умов фізіологічної норми не перевищує 35 Од/мл, пограничні значення коливаються в межах – 30-40 Од/мл.

Виходячи з того, що антиген СА-125 виявляється як у здорових, так і хворих на РЯ жінок і те, що з віком у жінок ймовірність захворювання на РЯ

зростає, метою даного етапу роботи було з'ясувати чи змінюється концентрація даного антигену в залежності від їх віку і чи може даний показник бути діагностичним критерієм донозологічного стану жінок.

Для з'ясування цього питання практично здорових жінок умовно розділили на дві контрольні групи: 1 – жінки віком 20-40 років, які входили в групу фізіологічної норми, та 2 – жінки віком 41-60 років, які формували групу донозологічного стану (табл. 3.1).

Результати визначення концентрацій пухлинного маркера СА-125 в сироватці крові практично здорових жінок і хворих на рак яєчника наведені в табл. 3.1. Вони свідчать про те, що за фізіологічної норми концентрація антигена складає  $(26,1 \pm 2,2)$  Од/мл ( $n=26$ ).

Таблиця 3.1

Концентрація пухлинного маркера, антигена СА-125 у сироватці крові практично (клінічно) здорових жінок (К 1 і К 2) і хворих на рак яєчника в залежності від стадії захворювання ( $M \pm m$ )

Клінічні групи	Концентрація СА-125 (Од/мл)
Контрольна група 1 (n=25)	$26,1 \pm 2,2$
Контрольна група 2 (n=16)	$35,9 \pm 4,3^*$
1 підгрупа (перша стадія) (n=15)	$146,2 \pm 12,1^{***}$
2 підгрупа (дуга стадія) (n=8)	$463,6 \pm 44,2^{***}$
3 підгрупа (третя стадія) (n=41)	$1303,0 \pm 126,5^{***}$
4 підгрупа (четверта стадія) (n=16)	$2865,0 \pm 217,4^{***}$

Примітка: зміни вірогідні щодо величин в осіб контрольної групи (К1)

\*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

У другій віковій групі (41-60 років), яка була прирівняна до донозологічного стану людини, концентрація антигену складала  $(35,9 \pm 4,3)$  Од/мл ( $n=18$ ).

З розвитком раку яєчника (від 1 до IV стадії) спостерігалось зростання концентрації СА-125 від  $(146,2 \pm 12,1)$  до  $(2865,0 \pm 217,4)$  Од/мл. Статистичний аналіз показав, що на першій стадії розвитку РЯ концентрація СА-

125 складала ( $146,2 \pm 12,1$ ), на другій – ( $463,6 \pm 44,2$ ), третій – ( $1303,0 \pm 126,5$ ) і четвертій стадії – ( $2865,0 \pm 217,4$ ) Од/мл.

Дані літератури свідчать, що підвищений рівень СА-125 у пацієток з різними пухлинами яєчника спостерігається в 40-95 % випадків залежно від стадії захворювання і гістологічного типу пухлини. При доброякісних пухлинах яєчників збільшення рівня цього маркера відбувається лише у 8 % випадків. Значне зростання концентрації СА-125 у плазмі корелює з діаметром пухлини, понад 70% пацієнтів з діаметром пухлин 1–2 см мають підвищений його рівень [2, 59, 69].

Було доведено, що існує позитивна кореляція між клінічною стадією РЯ і рівнем СА-125. Підвищений рівень глікопротеїну частіше спостерігається при III-IV стадії захворювання (>90%), ніж при I-II (лише 50%) [2, 59, 69]. У той же час, ряд авторів встановили зниження рівня СА-125 у хворих в термінальній стадії РЯ, пояснюючи цей феномен надлишковою секрецією протеїну в асцитичну рідину [2]. При РЯ було встановлено, що чим нижчий рівень СА-125 після завершення первинного лікування, тим довший очікуваний безрецидивний період [2, 24].

Найбільш успішно тести на рівень СА-125 в сироватці крові пацієток з карциномою яєчників використовуються при оцінці ефективності хіміотерапії після оперативного втручання і при спостереженні хворих з метою раннього виявлення рецидивів. Можливості використання цього тесту при ранньому виявленні захворювання, диференціальної діагностики, прогнозування перебігу хвороби вкрай обмежені і вимагають подальшого більш детального обґрунтування [59]. Деякі автори вважають, що метод однократного визначення рівня СА-125 в сироватці крові пацієток не володіє ні достатньою чутливістю, ні специфічністю, щоб бути використаним в клінічній і диференціальній діагностиці. Одиначні вимірювання не дозволяють встановити різницю між ранніми (I і II) стадіями РЯ і доброякісними пухлинами. Це пояснюється значним перекиванням рівнів СА-125 в області низьких значень у здорових жінок і у хворих з новоутвореннями яєчників [131].

СА-125 може підвищуватись і при певних негінекологічних злоякісних

новоутвореннях різної локалізації [47-49]. Повідомляється, що сироватковий рівень СА-125, який перевищує дискримінаційний, виявляється у 15% хворих на рак шлунка, у 16,6% на рак товстої кишки, у 16,7% на рак легенів, у 16,6% на рак молочної залози, у 26,3% на рак підшлункової залози [102]. Показано також, що при раку шлунка підвищений рівень СА-125 ( $\geq 350$  Од/мл) на старті лікування служить незалежним фактором поганого прогнозу і може відображати не тільки об'єм пухлинної тканини, але і агресивність процесу [33, 102].

Однак, існують також дані, що визначення СА-125 недостатньо надійне скринінгове дослідження, так як захворюваність на РЯ у популяції мала і більшість позитивних результатів можуть бути помилково-позитивними [142]. Також, рівень антигену нижче від 35 Од/мл не виключає наявності епітеліального РЯ. Приблизно 1% здорових донорів має вищу концентрацію СА-125 ніж 35 Од/мл. Відомо, що ряд інших фізіологічних і патологічних змін, включаючи перший триместр вагітності, менструацію та ендометріоз, які часто супроводжуються підвищеним рівнем СА-125. Своєю чергою, наводяться неспростовні докази на користь доцільності використання комбінації трьох маркерів: TPS (тканинний поліпептидний антиген), СА-125 і СА 72-4 для діагностики, прогнозу і моніторингу у хворих муцинозним РЯ. У зв'язку з цим, не випадково для підвищення діагностичної значущості маркера при діагностиці злоякісних пухлин різного гістогенезу, пропонується використовувати комбінацію із декількох маркерів [33, 47-49].

Антиген СА 19-9 в нормі синтезується підшлунковою залозою і печінкою плода, а також утворюється пухлинними клітинами. Норма цього онкомаркера в крові людини – до 37 Од/мл. Підвищення рівня СА 19-9 – це ознака серйозних онкологічних захворювань: рак підшлункової залози, рак шлунку, рак молочної залози, рак яєчників і матки. Практично усі пацієнти з дуже високими показниками СА 19-9 (вище 10 000 Од/мл) мають віддалені метастази [48].

Припускається, що важливим маркером ранньої діагностики РЯ може бути співвідношення нейтрофілів до лімфоцитів крові [66, 118, 143, 167, 211, 216]. Також важливим показником розвитку рака яєчника є зміна концентрації



нейтрофілів у крові, які виступають першою ланкою захисту у відповідь на патогени чи інші пошкодження тканин [118, 194, 211].

Із проведених нами досліджень можна бачити, що в контрольній групі з низькою концентрацією СА-125 в сироватці крові спостерігається низький рівень співвідношення Н/Л (2,0) (табл. 3.2).

Таблиця 3.2

Порівняльна характеристика параметрів СА-125 та співвідношення кількості нейтрофілів до лімфоцитів у крові хворих на рак яєчника

Параметри	СА-125 (7,5-58,3) Од/мл, n=15	СА-125 (1176,5-3079), n=57	p
Вік, роки	53,9 (24-75)	55,4 (24-75)	0,73
СА-125, Од/мл	32,1±2,6	2084±187	< 0,001
Нейтрофіли, x10 <sup>9</sup> /л	3,28±0,26	4,29±0,38	< 0,05
Моноцити, x10 <sup>9</sup> /л	0,32±0,03	0,41±0,04	< 0,05
Лімфоцити, x10 <sup>9</sup> /л	1,63±0,16	1,49±0,15	> 0,05
Н/Л	2,0	2,9	< 0,001

В той же час висока концентрація антигена позитивно корелює з високим співвідношенням Н/Л (2,9).

Іншим важливим маркером на РЯ може бути мієлопероксидаза [101, 109, 134, 186]. Основною функцією цього ензиму є захист від зовнішньої інфекції. Вона може слугувати маркером інтенсивності запальних процесів. Однак, вона також може викликати пошкодження власних тканин організму в місцях запалення. У клінічній практиці рівень мієлопероксидази в крові може бути перспективним діагностичним і прогностичним показником ряду захворювань та патологічних станів. Основним субстратом МРО є пероксид водню. Продуктами, що каталізуються в мієлопероксидазній реакції є сильні окиснювачі (зокрема, гіпохлорит), реактивні похідні азоту та вільні радикали, що своєю чергою ініціюють пероксидацію ліпідів, модифікацію протеїнів тощо [64, 89, 101].

В результаті проведених нами досліджень встановлено, що рівень МРО в сироватці крові практично здорових жінок становить  $38,2 \pm 6,1$  нг/мл (рис. 3.1).

В процесі розвитку РЯ поступово знижується. Так, при РЯ I-II-III-IV стадії кількість мієлопероксидази знижується в 1,2, 1,3, 1,5 та 1,6 раза, відповідно.

Таким чином, за даними літератури неопластичні процеси в яєчнику залишаються дуже актуальною медико-соціальною проблемою. Частота патології (різних стадій) дуже велика. Не дивлячись на удосконалення методів діагностики та лікування хворих на злоякісні епітеліальні пухлини яєчника, віддалені результати лікування все ще залишаються незадовільними. З одного боку, це може бути пов'язано з високою агресивністю РЯ, а з іншого – з резистентністю пухлин до протипухлинних препаратів, в зв'язку з чим у переважній більшості хворих спостерігається прогресування пухлинного процесу.

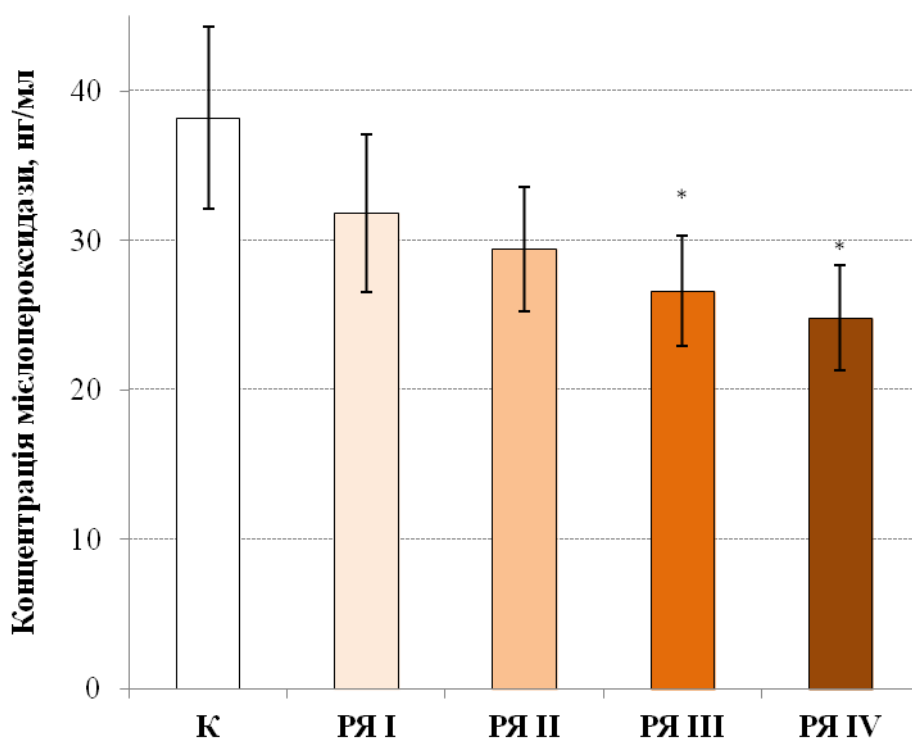


Рис. 3.1. Рівень мієлопероксидази в сироватці крові хворих жінок на різних стадіях раку яєчника ( $M \pm m, n = 6$ ).

Примітка: \*  $p < 0,05$  щодо групи контролю.

Судячи з отриманих нами даних, окрім визначення концентрації антигена СА-125 у жінок різних вікових груп, що може слугувати прогностичним тестом на ймовірний розвиток РЯ і свідчити про донозологічний стан організму, прогностичними тестами також можуть бути співвідношення нейтрофілів до лімфоцитів і концентрація мієлопероксидази.

Таким чином, вивчення концентрації глікопротеїну СА-125 у сироватці крові практично здорових жінок і хворих на рак яєчника дають основу стверджувати, що тест визначення даного онкомаркера є інформативним діагностичним показником ступеня злоякісності раку яєчника. Прогностичним тестом на РЯ також може слугувати співвідношення нейтрофілів до лімфоцитів і кількість мієлопероксидази.

### 3.2 Про- та антиоксидантна система лімфоцитів крові жінок при раку яєчника

Згідно сучасних уявлень вікові зміни в організмі та розвиток патологічних процесів супроводжуються порушенням механізмів антиоксидантного захисту клітин [3, 6, 90, 91, 119, 192]. При пухлинному рості окиснювальні вільнорадикальні процеси ініціюються в фосфоліпідах клітинних мембран, що містять поліненасичені жирні кислоти. Інтенсифікація пероксидації ліпідів призводить до накопичення токсичних продуктів, що призводить до зниження резистентності організму [34, 91, 119, 192,]. В той же час буферна ємність антиоксидантної системи достатньо велика та забезпечується різними складовими. Важливе місце серед АОС клітини займає система глутатіону, компоненти якої приймають участь як в ензиматичних (глутатіонпероксидаза, глутатіонредуктаза, глутатіон-трансфераза), так і в неензиматичних (глутатіон) реакціях АОС [119, 129, 149]. Хоча система глутатіону є об'єктом багатьох досліджень, в літературі немає одностайної думки щодо її ролі в вікових змінах організму, розвитку патологічних станів, зокрема злоякісного росту. У зв'язку з тим аналіз функціонального стану системи глутатіону при раку яєчника дозволить виявити її роль в патогенезі та прогнозі захворювання.

Нами проведено порівняльне дослідження процесів ПОЛ і системи глутатіону в жінок контрольної групи і хворих на рак яєчника. Показано активацію процесів ПОЛ, за визначенням концентрації малонового діальдегіду, який є вторинним продуктом пероксидації ліпідів, при РЯ. У сироватці крові контрольної групи вона сягає  $(7,5 \pm 0,4)$  мкмоль/л (рис. 3.2).

При РЯ процеси ПОЛ інтенсифікуються в 1,6 раза щодо показників у групі і сягають  $12,0 \pm 0,8$  мкмоль/л ( $p < 0,001$ ).

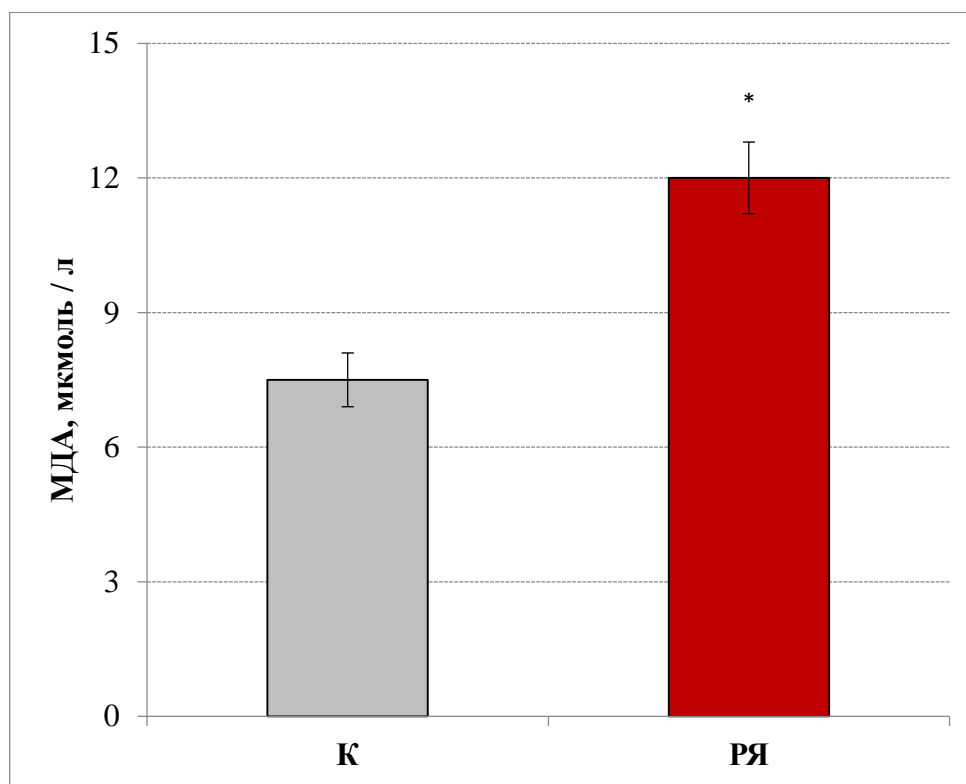


Рисунок 3.2. Концентрація малонового діальдегіду у сироватці крові практично здорових жінок (К) та жінок хворих на рак яєчника (РЯ).

Примітка: зміни вірогідні щодо величин в осіб контрольної групи \*  $p < 0,001$ .

Подібна ситуація спостерігається і при визначенні концентрації МДА у лімфоцитах крові. Так, у групі К концентрація МДА у лімфоцитах крові складає  $(63,2 \pm 5,5)$  мкмоль/мг протеїну (рис. 3.3). При РЯ ця величина статистично достовірно зростає до  $(98,1 \pm 8,2)$  мкмоль/мг протеїну ( $p < 0,001$ ).

Таким чином, при РЯ процеси ПОЛ суттєво інтенсифікуються, в плазмі крові – в 1,6 раза ( $p < 0,001$ ), і лімфоцитах крові – в 1,5 раза ( $p < 0,001$ ).

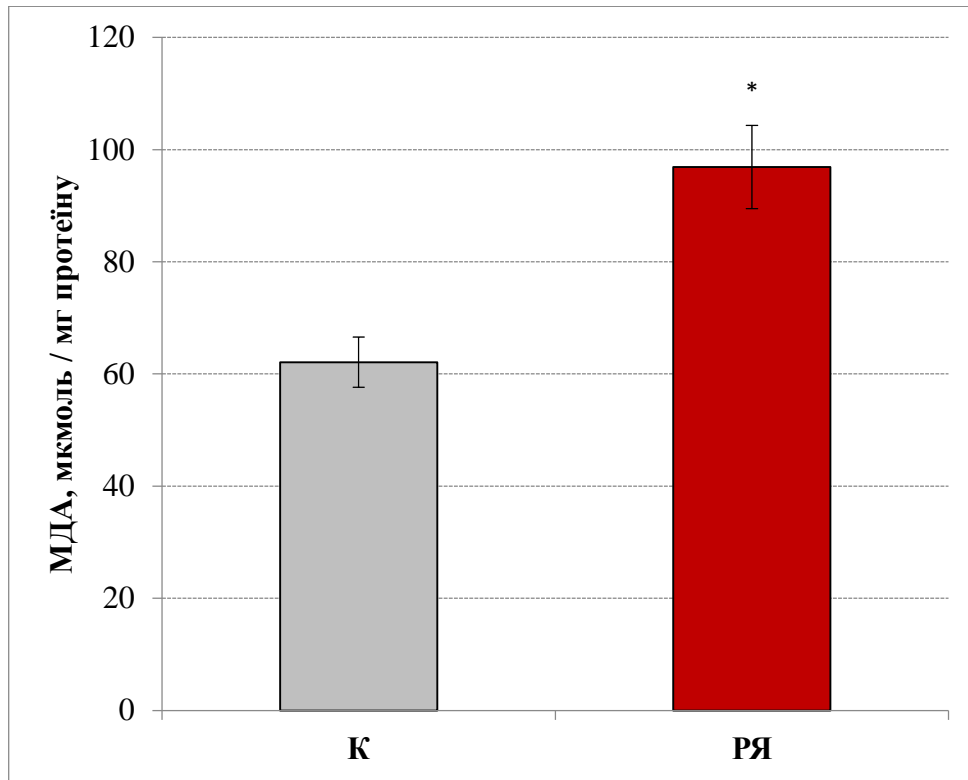


Рисунок 3.3. Концентрація малонового діальдегіду у лімфоцитах крові практично здорових жінок (К) та жінок хворих на рак яєчника (РЯ).

Примітка: зміни вірогідні щодо величин в осіб контрольної групи, \* $p < 0,001$

Слід відмітити, що пероксидація ліпідів чутлива до концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в інкубаційному середовищі (рис. 3.4).

Так, за присутності  $0,5 \text{ мМ } \text{Ca}^{2+}$  в інкубаційному середовищі пероксидація ліпідів інтенсифікується в 1,6 раза ( $p < 0,001$ ). Однак, слід відмітити, що це не є фізіологічні внутрішньоклітинні концентрації іонізованого кальцію. Вони перевищують їх більш як на два порядки.

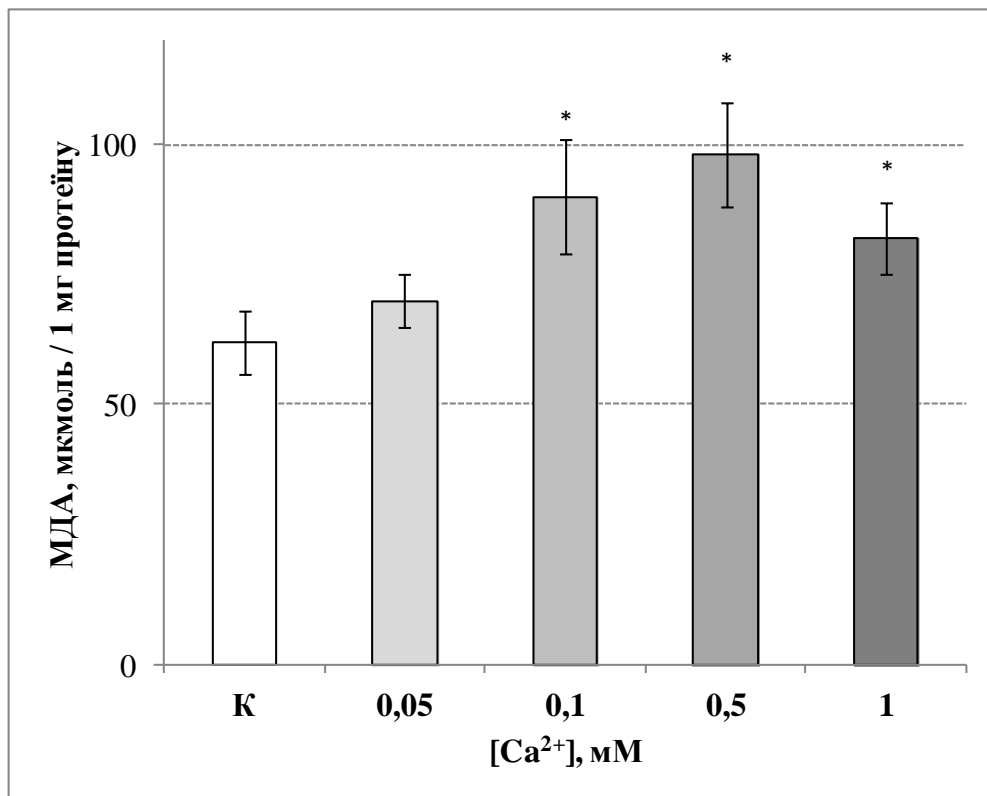


Рис. 3.4. Залежність вмісту МДА у лімфоцитах крові від концентрації йонів  $\text{Ca}^{2+}$  ( $M \pm m$ ,  $n = 6$ ).

Примітка: зміни вірогідні щодо величин в осіб контрольної групи, \* $p < 0,05$ .

Одночасно з інтенсифікацією процесів ПОЛ, виявлені відповідні зміни і в активності ензимів системи глутатіону (табл. 3.3). Так, показано, що в практично здорових жінок концентрація відновленого глутатіону складає  $(17,8 \pm 1,6)$  нмоль/мг протеїну. При РЯ ця величина зростає в 1,4 раза щодо контролю і сягає  $(25,3 \pm 2,1)$  нмоль/мг протеїну ( $p < 0,05$ ).

Також, виявлено, що при РЯ активність глутатіонпероксидази статистично достовірно знижується в 1,6 раза – з  $(161,8 \pm 12,7)$  до  $(96,1 \pm 8,8)$  нмоль GSH/хв·мг протеїну ( $p < 0,001$ ). Щодо активності глутатіонредуктази, то при РЯ ця активність знижується з  $(51,9 \pm 5,1)$  до  $(35,1 \pm 3,1)$  нмоль NADPH/ хв·мг протеїну, тобто в 1,4 раза щодо контролю ( $p < 0,05$ ).

Таблиця 3.3

Стан глутатіонової антиоксидантої системи та пероксидації ліпідів у практично здорових жінок і хворих на рак яєчника ( $M \pm m$ ,  $n=18-22$ ).

Показники	Практично здорові жінки (К)	Жінки хворі на рак яєчника, III+IV стадії
GSH, нмоль/мг протеїну	17,8±1,6	25,3±2,1**
ГП, нмоль GSH/хв·мг протеїну	161,8±12,7	96,1±8,8***
ГР, нмоль NADPH/ хв·мг протеїну	51,9±5,1	35,1±3,1**
Г-S T, нмоль GSH/хв·мг протеїну	114,9±9,2	138,8±11,6

Примітка: зміни вірогідні щодо величин в осіб контрольної групи, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

При розвитку РЯ (III-IV стадія) активність глутатіон-S трансферази зростає з (114,9±9,2) до (138,8±11,6) нмоль GSH/хв·мг протеїну, тобто в 1,2 раза, проте ці зміни не є статистично достовірними ( $p > 0,05$ ).

При з'ясуванні впливу іонів  $Ca^{2+}$  на активність ГП було виявлено, що із збільшенням концентрації  $Ca^{2+}$  в інкубаційному середовищі до 0,01 мМ активність зростала до 242,1±21,4 нмоль GSH/хв·мг протеїну (рис. 3.5). Більші концентрації  $Ca^{2+}$  (0,5 мМ) зумовлювали зниження ГП-активності до 13,2±1,4 нмоль GSH/хв·мг протеїну. Наявність додаткового піку ГП-активності можна пояснити існуванням двох форм ГП – мембранозв'язаної та цитозольної, що виявляють різну безпосередню чи опосередковану чутливість до  $Ca^{2+}$ .

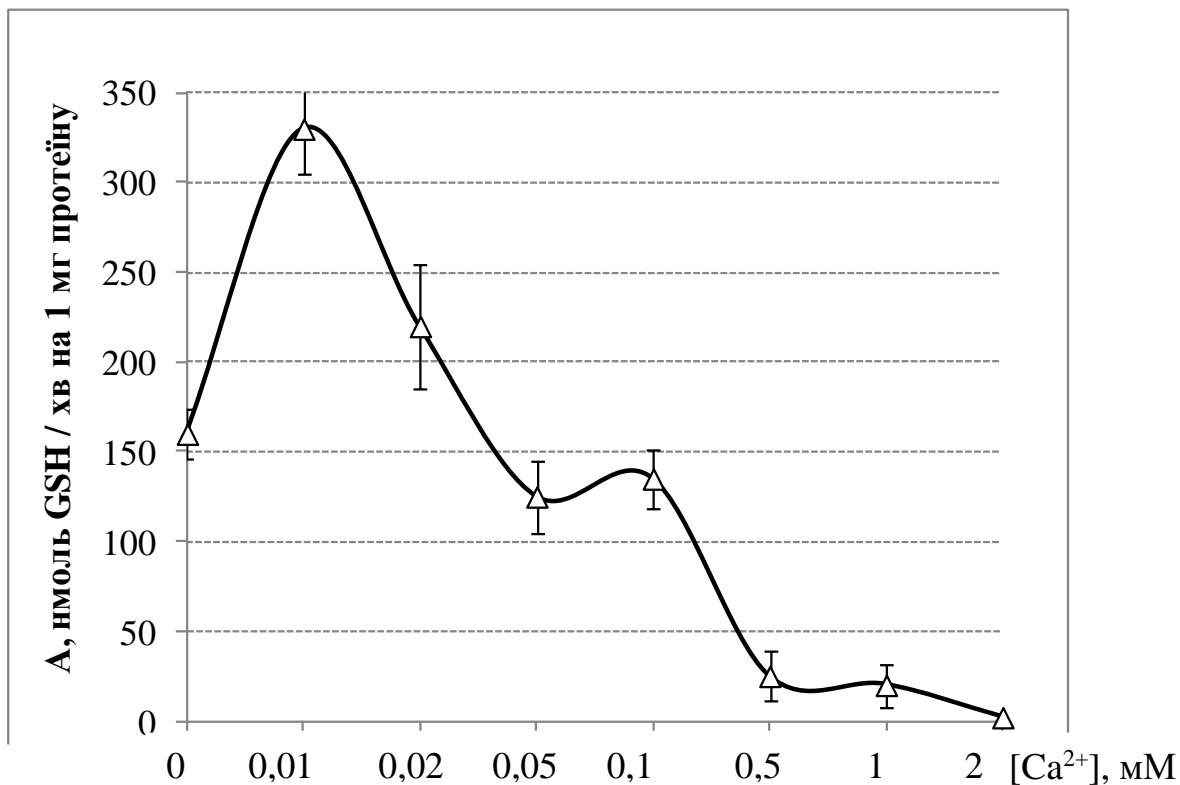


Рис. 3.5. Залежність глутатіонпероксидазної активності від концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  ( $M \pm m$ ,  $n=4$ ).

Глутатіонредуктазна активність при 0,01 мМ  $\text{Ca}^{2+}$  виявляла тенденцію до зниження, щодо контрольних значень (рис. 3.6). Однак зі зростанням концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  0,1 мМ спостерігалось зростання ГР-активності до  $61,2 \pm 5,9$  NADPH/хв·мг протеїну. Подальше збільшення концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в інкубаційному середовищі призводило до зниження ГР-активності.



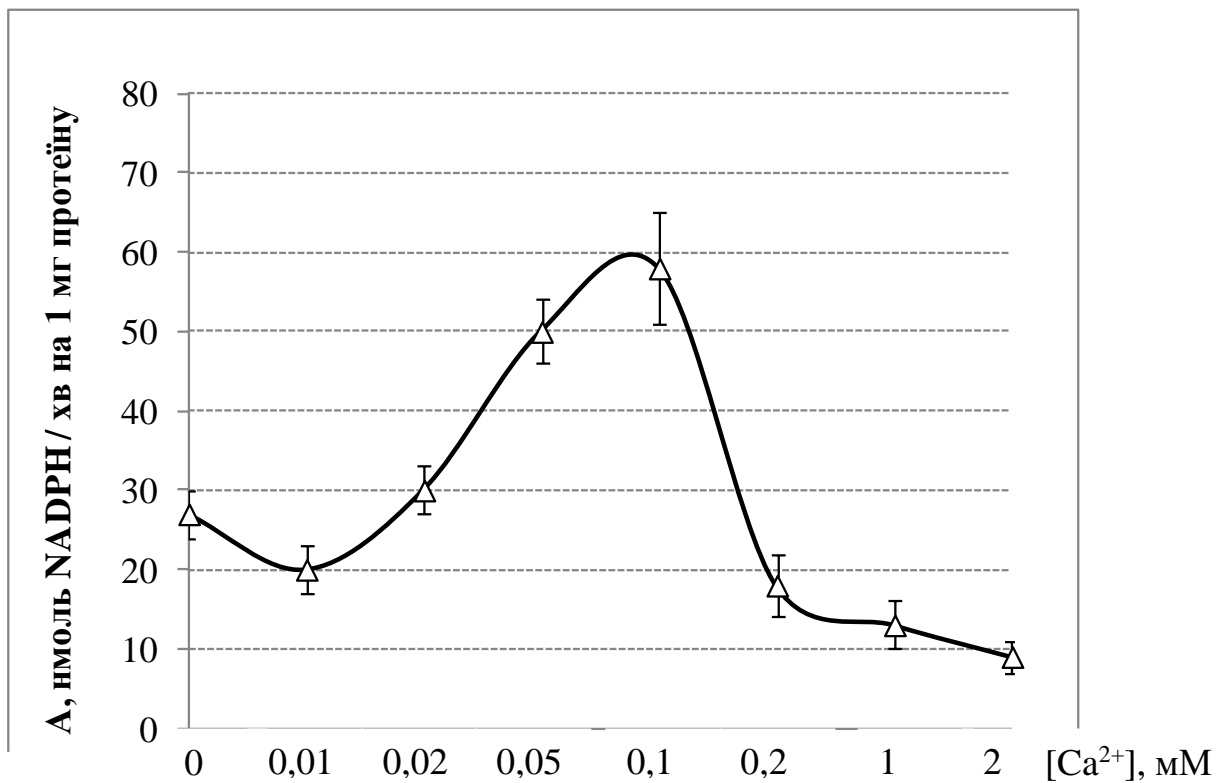


Рис. 3.6. Залежність глутатіонредуктазної активності від концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  ( $M \pm m$ ,  $n=4$ ).

Додавання в інкубаційне середовище  $\text{Ca}^{2+}$  пригнічувало ГТ-активність (рис. 3.7). За відсутності іонів  $\text{Ca}^{2+}$  активність становила  $115,9 \pm 10,4$  нмоль GSH/хв·мг протеїну. Концентрація  $\text{Ca}^{2+}$  0,1 ... 2 мМ зумовлювала зниження активності ензиму до  $45,9 \pm 4,4$  нмоль GSH/хв·мг протеїну.

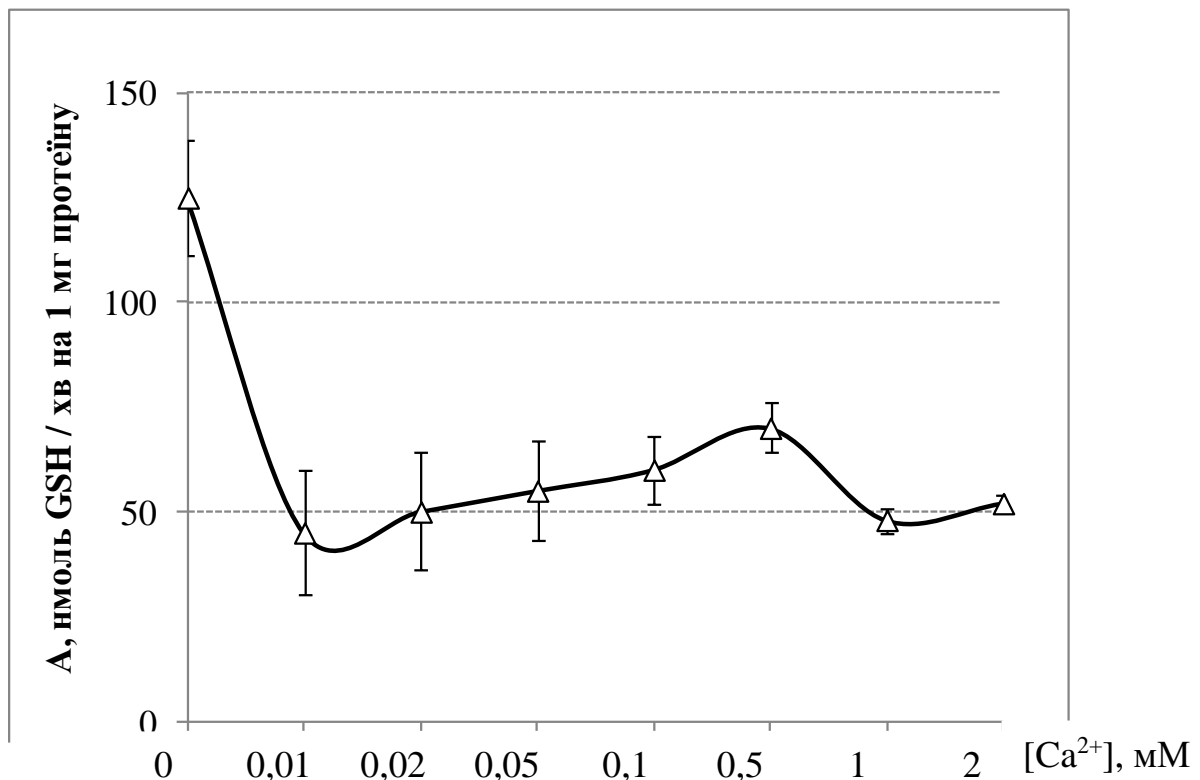


Рис. 3.7. Залежність глутатіон-S трансферазної активності від концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  ( $M \pm m$ ,  $n=4$ ).

Таким чином, при розвитку РЯ суттєво знижуються активності двох основних антиоксидантних ензимів – глутатіонпероксидази та глутатіонредуктази. Оба ензими чутливу до  $\text{Ca}^{2+}$

**Висновок.** Отримані результати щодо змін концентрації глікопротеїну СА-125 у сироватці крові практично здорових жінок дають основу стверджувати, що вказаний тест визначення даного онкомаркера є інформативним діагностичним, що корелює з віком жінок, і ступенем злоякісності раку яєчника. Разом з тим, отримані дані свідчать, що в якості потенційних маркерів на РЯ можна розглядати співвідношення ннейтрофілів до лімфоцитів, а також рівень мієлопероксидази в лімфоцитах крові. При РЯ процеси ПОЛ суттєво інтенсифікуються як в плазмі, так і в лімфоцитах крові.

Паралельно знижуються активності основних антиоксидантних ензимів – глутатіонпероксидази та глутатіонредуктази. Активності цих ензимів чутливі до зміни концентрації іонізованого кальцію в інкубаційному середовищі.

Матеріали до даного розділу представлені в публікаціях:

1. 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.
2. Баріляк 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.
3. 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;

## РОЗДІЛ 4

### ХАРАКТЕРИСТИКА $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ -АТФаз ЛІМФОЦИТІВ КРОВІ ПРИ РОЗВИТКУ РАКА ЯЄЧНИКА

#### 4.1 Властивості $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ -АТФази плазматичної мембрани лімфоцитів крові жінок хворих на рак яєчника

Іонізований  $\text{Ca}^{2+}$  відіграє ключову роль в регуляції практично всіх внутрішньоклітинних процесів, включаючи пухлинний ріст, проліферацію клітин, апоптоз тощо [72, 78, 100, 108]. Важлива роль у підтриманні внутрішньоклітинного гомеостазу  $\text{Ca}^{2+}$  відводиться  $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазі плазматичної мембрани, функція якої полягає у зниженні концентрації даного іону в цитозолі, тобто транспорті його проти концентраційного градієнта в позаклітинне середовище [199, 200]. Нами досліджені активності  $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ -АТФази плазматичної мембрани лімфоцитів практично здорових жінок, а також хворих на рак яєчника III і IV стадії.

Відомо, що  $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ -АТФаза здійснює перенесення йонів  $\text{Ca}^{2+}$  крізь мембрану проти їх електрохімічного градієнта. Цей процес спряжений з гідролізом АТФ.  $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазу лімфоцитів крові дослідниками продемонстровано раніше [172, 173, 177, 198, 214]. Фізіологічна роль цієї ензиматичної системи в регуляції  $\text{Ca}^{2+}$ -гомеостазу клітини визначається її високою афінністю до субстрату транспортування, яким є  $\text{Ca}^{2+}$ .

Порушення активності  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних АТФ-гідролазних систем свідчить про структурно-функціональні зміни біологічних мембран при розвитку патологічних процесів. Зміни активностей цих систем клітини ведуть до перерозподілу йонів між цитоплазмою клітини та зовнішньоклітинним середовищем, зміни величини мембранного потенціалу. При пухлинному рості порушення функціональної активності мембрано-зв'язаних ензиматичних систем набувають загальног (системного) характеру [19, 21, 24, 26 72, 88, 100, 108].

У результаті проведених досліджень встановлено, що  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФазна активність плазматичної мембрани лімфоцитів крові практично здорових жінок становила  $(2,79 \pm 0,27)$  мкмоль  $\text{P}_i/\text{хв} \cdot \text{мг}$  протеїну (рис. 4.1).

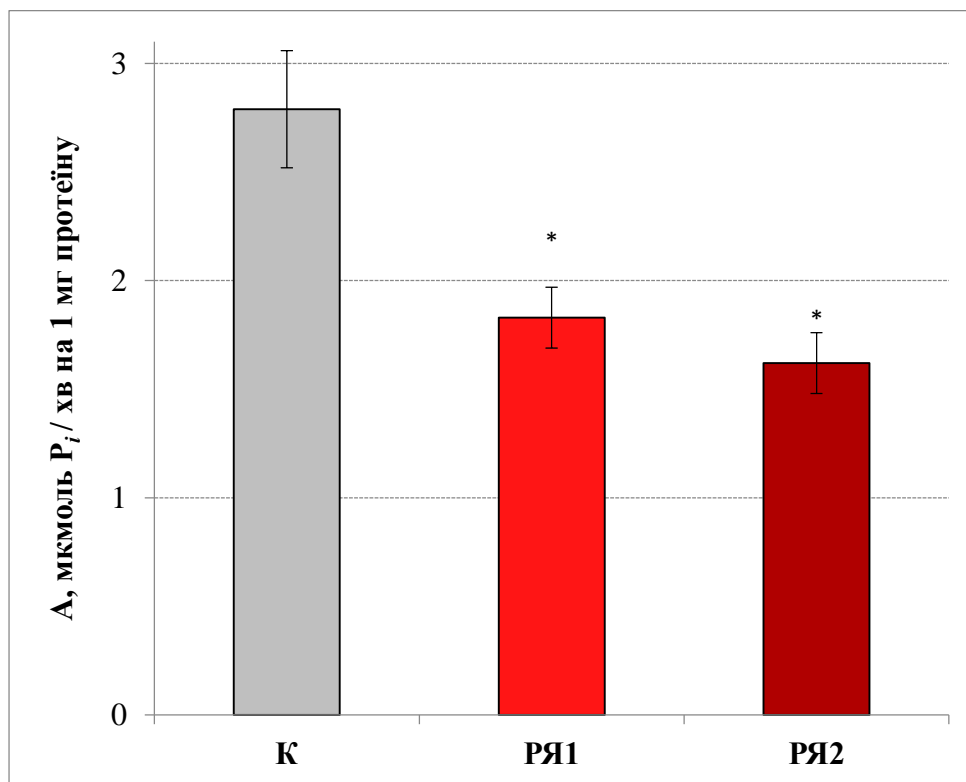


Рис. 4.1.  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФазна активність плазматичної мембрани лімфоцитів крові жінок за фізіологічної норми (К) і хворих на рак яєчника III (РЯ1) та IV стадії (РЯ2),  $M \pm m$ ,  $n=8-12$ .

Примітка: зміни вірогідні щодо величин за фізіологічної норми,  $*p < 0,001$ .

У пацієнтів з РЯ (III і IV стадія)  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФазна активність плазматичної мембрани лімфоцитів крові достовірно відрізнялась від фізіологічної норми та становила  $(1,83 \pm 0,14)$  і  $(1,62 \pm 0,14)$  мкмоль  $\text{P}_i/\text{хв}$  на 1 мг протеїну, тобто знижувалась в 1,6 та 1,8 раза, відповідно, ( $p < 0,05$ ), порівняно з фізіологічною нормою. Зниження  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФазної активності плазматичної мембрани лімфоцитів крові пацієнтів з РЯ свідчить про зростання  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  у цитозолі лімфоцитів.

$\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФаза, як і  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -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.

Залежність  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазної активності від концентрації субстрату (АТФ) в інкубаційному середовищі визначається величиною константи афінності до субстрату ( $K_{\text{АТФ}}$ ). Її обчислювали визначаючи величину питомої  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазної активності у середовищі інкубації, що містило субстрат в діапазоні концентрацій від 1 до 5 мМ (за сталої концентрації йонів  $\text{Ca}^{2+}$  – 0,05 мМ і йонів  $\text{Mg}^{2+}$  – 5 мМ).

Показано, що збільшення концентрації АТФ в інкубаційному середовищі в діапазоні концентрацій від 1 до 4,0 мМ призводить до поступового зростання  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазної активності плазматичної мембрани лімфоцитів крові практично здорових осіб з наступним виходом на плато (рис. 4.2). Максимальні значення АТФ-гідролазної активності  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФази плазматичної мембрани лімфоцитів крові здорових осіб та пацієнтів з РЯ відмічались при концентрації АТФ 4 мМ в середовищі інкубації. Вивчення концентраційної залежності  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазної активності від АТФ свідчить, що у всьому діапазоні досліджуваних концентрацій субстрату активність  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФази плазматичної мембрани пацієнтів із РЯ була зниженою порівняно з контрольними групами.

Для визначення основних кінетичних параметрів гідролізу АТФ за участі  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -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 Лайнуївера-Берка.

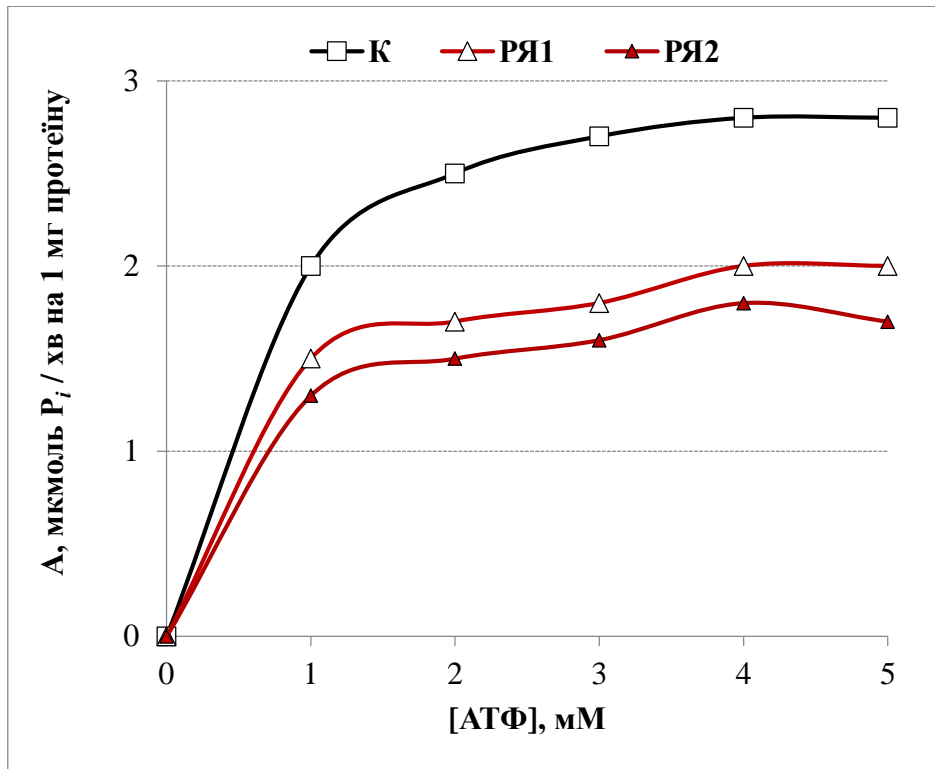


Рис. 4.2. Залежність  $\text{Ca}^{2+},\text{Mg}^{2+}$ -АТФазної активності плазматичної мембрани лімфоцитів крові жінок за фізіологічної норми (ФН), хворих на рак яєчника III (РЯ1) та IV стадії (РЯ2) від концентрації АТФ в інкубаційному середовищі ( $M \pm m$ ,  $n=8-12$ ).

Встановлен, що значення максимальної швидкості гідролізу АТФ  $\text{Ca}^{2+},\text{Mg}^{2+}$ -АТФазою плазматичної мембрани лімфоцитів крові практично здорових жінок становила ( $2,89 \pm 0,27$ ) мкмоль  $\text{P}_i$ / хв·мг протеїну (табл. 4.1).

Максимальна швидкість АТФазної реакції за участі  $\text{Ca}^{2+},\text{Mg}^{2+}$ -АТФази плазматичні мембрани лімфоцитів крові пацієнтів з РЯ III стадії становила ( $1,95 \pm 0,20$ ), а IV стадії ( $1,77 \pm 0,15$ ) мкмоль  $\text{P}_i$ / хв·мг протеїну. Можна бачити, що максимальна швидкість гідролізу АТФ  $\text{Ca}^{2+},\text{Mg}^{2+}$ -АТФазою лімфоцитів крові пацієнтів з РЯ обох стадій й осіб групи контролю відрізняються і різниця є статистично достовірною ( $p < 0,05$ ). З'ясування значень констант спорідненості (афінності) показало, що ці величини знаходяться в субмілімолярному діапазоні концентрацій, що відповідає фізіологічній концентрації  $[\text{Mg} \cdot \text{АТФ}]$  у цитоплазмі клітин (0,5 – 5 мМ).

Кінетичні параметри  $\text{Ca}^{2+}$ -активованого,  $\text{Mg}^{2+}$ -залежного гідролізу АТФ у лімфоцитах крові жінок за фізіологічної норми (ФН), хворих на рак яєчника III (РЯ1) та IV стадії (РЯ2), визначені за АТФ ( $M \pm m$ ,  $n=8-12$ ).

Кінетичні параметри	Група контролю	Пацієнти з РЯ	
	ФН	III стадія (РЯ1)	IV стадія (РЯ2)
$V_{\text{АТР}}$ , мкмоль $P_i$ / хв на 1 мг протеїну	2,89±0,27	1,95±0,20 *	1,77±0,15 *
$K_{\text{АТР}}$ , мМ	0,16±0,02	0,32±0,03 *	0,35±0,03 *

Примітка: зміни вірогідні щодо величин за фізіологічної норми, \* $p < 0,01$ .

У здорових осіб за умов ФН константа спорідненості  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФази плазматичної мембрани до АТФ становила (0,16±0,02) мМ. Константа спорідненості  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФази плазматичної мембрани лімфоцитів до АТФ у пацієнтів з РЯ (III стадія) становила (0,31±0,03) мМ, а при РЯ (IV стадія) (0,35±0,03) мМ. Тобто величина константи афінності до АТФ для  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФази плазматичної мембрани лімфоцитів крові пацієнтів з РЯ у 2,0-2,1 рази перевищували ці значення для лімфоцитів крові осіб групи фізіологічної норми.

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  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФаз до субстрату (константа спорідненості до АТФ зростала).

На рис. 4.2 наведена  $\text{Ca}^{2+}$ -залежність  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФази. Можна бачити, що оптимальні концентрації  $\text{Ca}^{2+}$ , що активують ензим близькі до фізіологічно значимих.



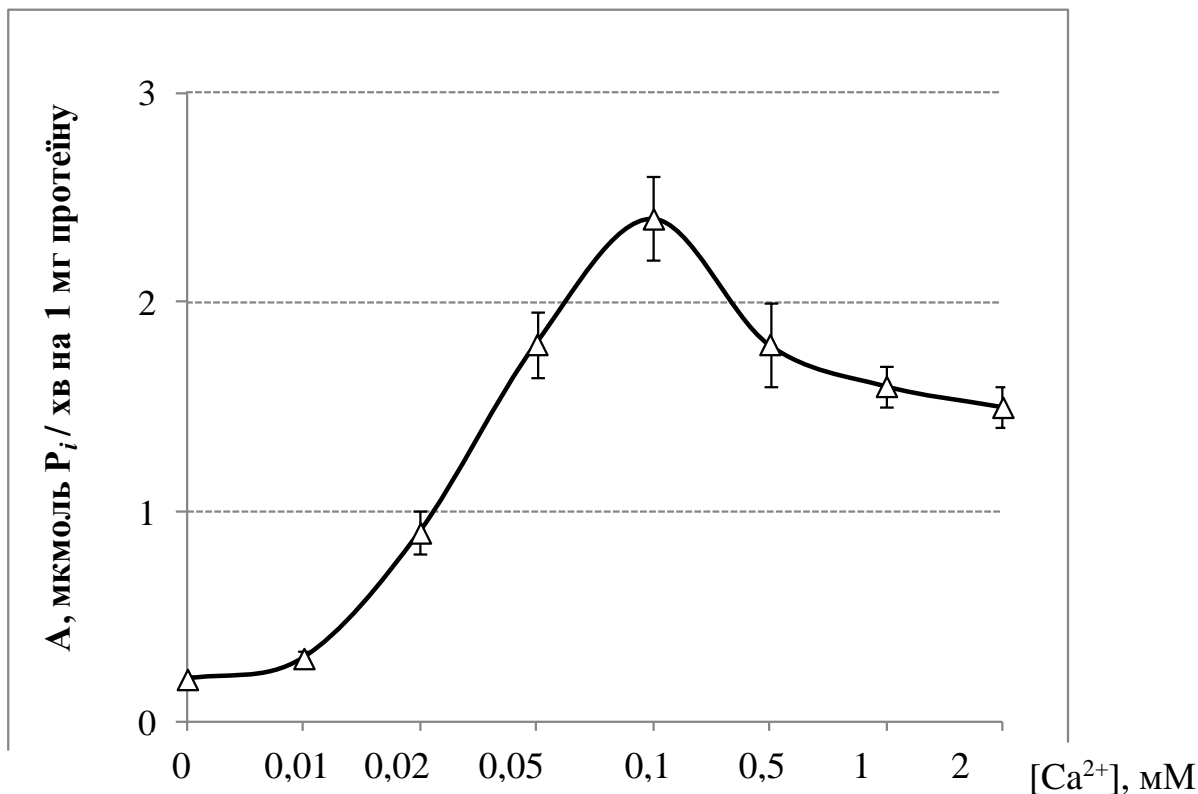


Рис. 4.3. Залежність АТФазної активності від концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  ( $M \pm m$ ,  $n = 6$ ).

Відомо, що вихід  $\text{Ca}^{2+}$  з клітини через плазматичну мембрану назовні здійснюється двома основними механізмами:  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФазою та  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінником, однак більшість дослідників демонструють, що при канцерогенезі основним механізмом є  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФаза, яка підтримує концентрації цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  на рівні  $\sim 100$  нМ [158-160].

Для досягнення точного контролю  $\text{Ca}^{2+}$  над кількома процесами в тій же клітині першорядним є те, що гомеостаз  $\text{Ca}^{2+}$  строго контролюється в часі та просторі. Амплітудно-тимчасові та просторові аспекти  $\text{Ca}^{2+}$  сигналу повинні точно регулюватися для досягнення конкретних результатів, таких як, наприклад, регулювання клітинного циклу, апоптоз або проліферація клітин [160].  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФаза плазматичної мембрани не тільки сама задіяна в контроль внутрішньоклітинної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$ , але й також контролює утворення інозитол-1,4,5-трифосфату і, відповідно, зниження виходу  $\text{Ca}^{2+}$  з ендоплазматичного ретикулу. Показані зміни в експресії даної АТФази в процесі пухлинного росту, що призводить до незбалансованого гомеостазу в пухлинних клітинах.

Наші дані щодо зниження активності  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФази погоджуються з такими, що при раку яєчника зростає концентрація  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозолі і навіть спостерігається гіперкальцемія [108, 172, 177, 191]. Зростання концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  пояснюється першою чергою тим, що зменшується вихід цього іону з клітини за рахунок зниження активності  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФази. Зростання концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  за рахунок інгібування активності АТФаз при РЯ також індукує апоптоз [176]. Про зниження виходу  $\text{Ca}^{2+}$  із цитозоля при пухлинному рості свідчать також дані отримані при вивченні експресії  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФази ендоплазматичного ретикулуму клітинами при карциномі товстої кишки та раку молочної залози [158, 160, 172, 176]. Показано, експресія даного ензиму знижується, а пошук лікувальних препаратів скерований на їх дію по зниженню концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозолі.

Переносячи іони Са в позаклітинне середовище через плазматичну мембрану  $\text{Ca}^{2+}$ -помпа знижує рівень цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  і тим самим сприяє контролю над активністю клітин.

$\text{Ca}^{2+}$ -помпи може бути не тільки біомаркерами, вони можуть також слугувати протираковими терапевтичними мішенями [177]. Однією з важливих особливостей  $\text{Ca}^{2+}$ -помп у порівнянні з іншими існуючими або потенційними терапевтичними мішенями при раку є наявність фармакологічних активаторів та інгібіторів  $\text{Ca}^{2+}$ -помп. З хемогенної точки зору багато  $\text{Ca}^{2+}$ -помп є потенційними фармакологічними мішенями, а з біологічної точки зору – модуляторами  $\text{Ca}^{2+}$  сигналів, що може впливати на пухлиногенні регуляторні шляхи. Модулюючи активність  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів і помп, які експресуються в ракових клітинах, їх активатори чи інгібітори можуть цілеспрямовано змінювати  $\text{Ca}^{2+}$  гомеостаз ракових клітин.

Таким чином, при раку яєчника активність  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФази плазматичної мембрани лімфоцитів крові достовірно знижується щодо контрольної групи, однак достовірної різниці в активності даного ензиму між III і IV стадіями розвитку РЯ не виявлено. Кінетичний аналіз  $\text{Ca}^{2+}$ -активованого,  $\text{Mg}^{2+}$ -залежного гідролізу АТФ у лімфоцитах крові жінок показав, що зниження

активності  $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ -АТФази ПМ обумовлено зниженням спорідненості ензиму до субстрату ( $K_{\text{АТР}}$  зростає у 2 рази).

#### 4.2. Властивості $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ -АТФази мембрани ендоплазматичного ретикулуму лімфоцитів крові жінок хворих на рак яєчника

Зростання концентрації кальцію в клітині є ключовим тригером або регулятором клітинних процесів, що мають відношення до прогресування росту пухлини, включаючи проліферацію, міграцію та апоптоз. Практично всі клітини для швидкого зростання концентрації в цитозолі іонів  $\text{Ca}^{2+}$  здатні звільняти їх із внутрішньоклітинних депо, зокрема з ендоплазматичного ретикулуму. ЕПР є великим внутрішньоклітинним депо  $\text{Ca}^{2+}$  і мультифункціональною органелою, що виконує різноманітні  $\text{Ca}^{2+}$ -залежні функції, задіяні в гомеостатичні та сигнальні механізми [173].

Відомо, що  $\text{Ca}^{2+}$  є цитоплазматичним сигнальним посередником, внутрішньоклітинним месенджером, який передає інформацію від спеціалізованих структур плазматичної мембрани та ендоплазматичного ретикулуму до внутрішньоклітинних структур [173, 178]. Концентрація  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  повинна бути чітко контрольована в часі, просторі та за амплітудою сигналу.

$\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ -АТФази плазматичної мембрани та ендоплазматичного ретикулуму здійснюють перенесення йонів  $\text{Ca}^{2+}$  крізь мембрани проти їх електрохімічного градієнта. Цей процес спряжений з гідролізом АТФ. Фізіологічна роль цієї ензиматичної системи в регуляції  $\text{Ca}^{2+}$ -гомеостазу клітини визначається її високою афінністю до субстрату транспортування, яким є  $\text{Ca}^{2+}$ .

У результаті проведених досліджень встановлено, що  $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ -АТФаза активність мембран ЕПР лімфоцитів крові практично здорових осіб становила  $(2,25 \pm 0,17)$  мкмоль  $\text{P}_i/\text{хв}$  на 1 мг протеїну (рис. 4.4).

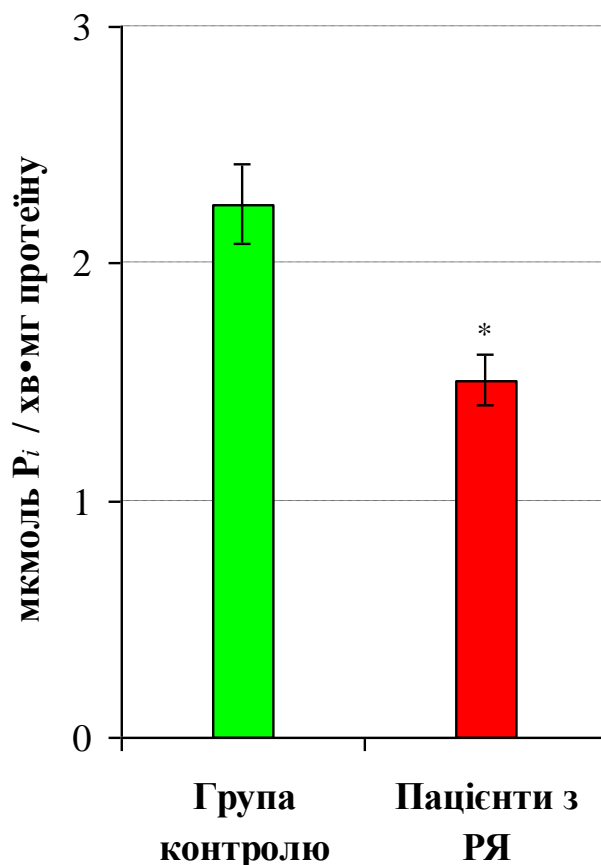


Рис. 4.4. Активність  $Ca^{2+},Mg^{2+}$ -АТФази мембран ЕПР лімфоцитів крові пацієнтів із раком яєчника ( $n = 28$ ) й осіб групи контролю ( $n = 30$ ),  $M \pm m$ . Примітка. \* $p < 0,001$  щодо величин в осіб групи порівняння (практично здорові особи).

У пацієнтів з РЯ  $Ca^{2+},Mg^{2+}$ -АТФазна активність мембран ЕПР лімфоцитів крові статистично достовірно відрізнялась від контрольної групи та становила  $(1,51 \pm 0,11)$  мкмоль  $P_i$ /хв на 1 мг протеїну, тобто знижувалась в 1,5 раза ( $p < 0,001$ ), порівняно з практично здоровими особами. Отримані нами раніше дані свідчать про те, що пригнічення АТФ-гідролазної активності  $Ca^{2+},Mg^{2+}$ -АТФази плазматичної мембрани лімфоцитів крові мало більш виражений характер, ніж  $Ca^{2+},Mg^{2+}$ -АТФази мембран ЕПР.

Зниження  $Ca^{2+},Mg^{2+}$ -АТФазної активності плазматичної мембрани, яке ми продемонстрували раніше і мембран ЕПР лімфоцитів крові пацієнтів з РЯ свідчить про зростання  $[Ca^{2+}]_i$  у цитозолі лімфоцитів.

$\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФаза, як і  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -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.

Залежність  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФазної активності від концентрації субстрату (АТФ) в інкубаційному середовищі визначається величиною константи афінності до субстрату ( $K_{\text{АТФ}}$ ). Її обчислювали визначаючи величину питомої  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФазної активності у середовищі інкубації, що містило субстрат в діапазоні концентрацій від 0,1 до 5 мМ (за сталої концентрації йонів  $\text{Ca}^{2+}$  – 0,05 мМ і йонів  $\text{Mg}^{2+}$  – 5 мМ).

Показано, що збільшення концентрації АТФ в інкубаційному середовищі в діапазоні концентрацій від 0,1 до 4,0 мМ призводить до поступового монотонного збільшення  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФазної активності мембран ЕПР лімфоцитів крові практично здорових осіб з наступним виходом на плато (рис. 4.5).

Максимальні значення АТФ-гідролазної активності  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФази мембран ЕПР лімфоцитів крові здорових осіб та пацієнтів з РЯ відмічались при концентрації АТФ 4 мМ в середовищі інкубації. Вивчення концентраційної залежності  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФазної активності від АТФ свідчить, що у всьому діапазоні досліджуваних концентрацій субстрату активність  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФази мембран ЕПР пацієнтів із РЯ була зниженою порівняно з групою контролю.

Для визначення основних кінетичних параметрів гідролізу АТФ за участі  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФази мембран ЕПР лімфоцитів крові пацієнтів з РЯ та з'ясування можливого механізму зміни ензиматичної активності цих АТФ-гідролазних систем криві концентраційних залежностей лінеаризовано у координатах Лайнуівера-Берка.

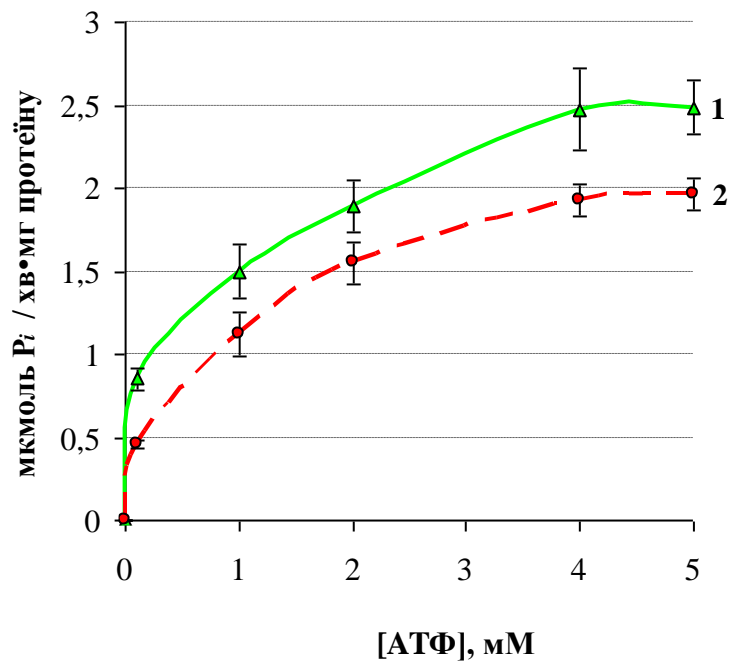


Рис. 4.5. Вплив концентрації АТФ на активність  $\text{Ca}^{2+},\text{Mg}^{2+}$ -АТФази мембран ЕПР лімфоцитів крові практично здорових осіб (1) та пацієнтів із раком яєчника (2) ( $M \pm m$ ,  $n = 12$ ).

Встановлено, що у здорових осіб максимальна швидкість  $\text{Ca}^{2+},\text{Mg}^{2+}$ -АТФазної реакції мембран ЕПР становила  $(2,2 \pm 0,2)$  мкмоль  $\text{P}_i/\text{хв}$  на 1 мг протеїну (рис. 4.6).

Максимальна швидкість АТФазної реакції за участі  $\text{Ca}^{2+},\text{Mg}^{2+}$ -АТФази ЕПР лімфоцитів крові пацієнтів з РЯ становила  $(1,71 \pm 0,16)$  мкмоль  $\text{P}_i/\text{хв}$  на 1 мг протеїну, тобто знижувалась щодо контрольних значень в 1,3 раза ( $p < 0,05$ ).

Такі зміни були статистично достовірними також для  $\text{Ca}^{2+},\text{Mg}^{2+}$ -АТФази плазматичної мембрани лімфоцитів крові пацієнтів з РЯ.

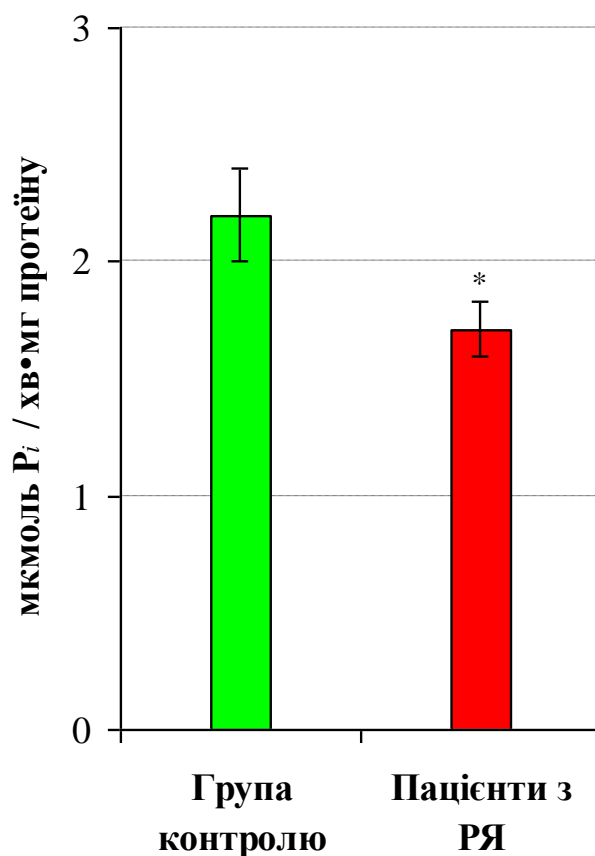


Рис. 4.6. Максимальна швидкість  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -залежного гідролізу АТФ ЕПР лімфоцитів крові осіб групи контролю та пацієнтів з раком яєчника ( $M \pm m$ ,  $n = 8$ ). Примітка. \* $p < 0,05$  щодо величин в осіб групи порівняння (практично здорові особи).

Водночас значення константи афінності  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФаз до АТФ обох досліджуваних груп також статистично достовірно відрізнялись між собою, що свідчить про різну їх спорідненість до субстрату (рис. 4.7). Так, у здорових осіб спорідненість  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФази мембран ЕПР до АТФ становила  $(0,13 \pm 0,04)$  мМ, а при РЯ вона становила  $(0,28 \pm 0,02)$  мМ. Тобто величина константи афінності до АТФ  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФази мембран ЕПР лімфоцитів крові пацієнтів з РЯ у 2,15 раза перевищувала ці значення для лімфоцитів крові практично здорових осіб.

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

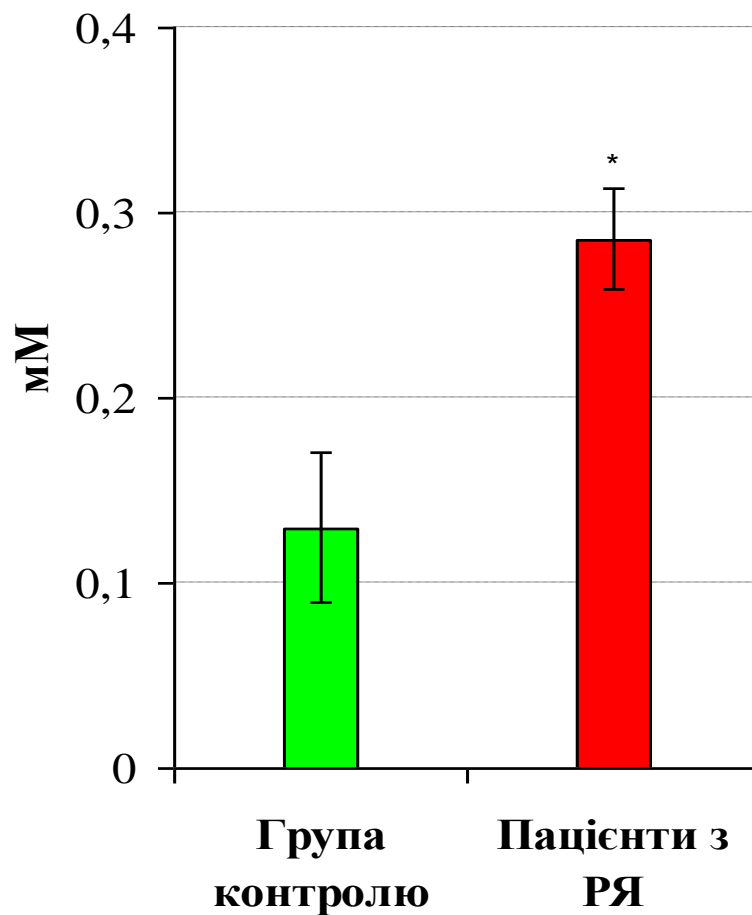


Рис. 4.7. Константа афінності  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФази ЕПР лімфоцитів крові осіб групи контролю та пацієнтів з раком яєчника до АТФ ( $M \pm m$ ,  $n = 8$ ).

Примітка. \* $p < 0,001$  щодо величин в осіб групи порівняння (практично здорові особи).

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  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФаз до субстрату (константа спорідненості до АТФ зростала).

### **Висновки:**

1. При раку яєчника знижується активність  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФази плазматичної мембрани та мембран ендоплазматичного ретикулуму



лімфоцитів крові у порівнянні з практично здоровими особами, що є одним із свідчень зростання концентрації іонізованого кальцію в цитозолі клітин.

2. Інгібування активності  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФаз ПМ та ЕПР лімфоцитів крові відбуваються як за рахунок зменшення кількості обертів ензимів, так і за рахунок зниження спорідненості ензимів до субстрату реакції.

Матеріали до даного розділу представлені в публікаціях:

1. Barylyak RV, Iefremova UP, Onufrovych OK, Melnyk OV., Vorobets D.Z, Vorobets ZD. Characterization of  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase of blood lymphocytes in women with ovarian cancer. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2018;9(1):85–89 (*Web of Science*).
2. Бариляк РВ, Воробець ДЗ, Онуфрович ОК, Воробець ЗД. Особливості зміни активності  $\text{Ca}^{2+}$ -активованої,  $\text{Mg}^{2+}$ -залежної АТФ-гідролази ендоплазматичного ретикулулу лімфоцитів крові при раку яєчника. *Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія*. 2018;2(82):64-70.
3. Бариляк РВ, Воробець ДЗ, Воробець ЗД.  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФаза плазматичної мембрани лімфоцитів крові жінок хворих на рак яєчника. Актуальні проблеми довкілля та здоров'я людини в умовах екологічних і соціальних змін у Європі та в Україні. *Матеріали наук.-практ. конф. з міжнародною участю (24-26.05.2018, Тернопіль)*. Тернопіль, 2018:3.
4. Бариляк РВ, Воробець НМ, Воробець ДЗ. Функціональний стан  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФази лімфоцитів крові у жінок хворих на рак яєчника. *Медична та клінічна хімія. Матеріали XII Українського біохімічного конгресу (30.09-04.10. 2019, Тернопіль)*. Тернопіль, 2019;3(80):61-62.

## РОЗДІЛ 5

### ХАРАКТЕРИСТИКА СИСТЕМИ ОКСИДУ АЗОТУ ЛІМФОЦИТІВ КРОВІ ЖІНОК ХВОРИХ НА РАК ЯЄЧНИКА

#### 5.1 Активність аргінази лімфоцитів крові жінок хворих на рак яєчника

Вивчення активності аргінази при патологічних станах викликає значний інтерес у дослідників медико-біологічного напрямку. Аргіназа – металоензим, що каталізує гідроліз L-аргініну до L-орнітину та сечовини. У переважній більшості досліджень використовують визначення метаболітів окисного та неокисного метаболізму L-аргініну у плазмі крові. Дослідження активності аргінази в практично здорових осіб і при різних патологічних станах організму у клітинах, зокрема лімфоцитах периферичної крові, є незначними та обмеженими.

Показано, що аргіназна активність в лімфоцитах крові практично здорових осіб становить  $(131,3 \pm 9,7)$  нмоль сечовини/хв на 1 мг протеїну (рис. 5.1). У пацієток з РЯ вона підвищується в 3,1 раза щодо фізіологічної норми і становить  $(407,6 \pm 32,1)$  нмоль сечовини/хв на 1 мг протеїну ( $p < 0,001$ ). Отримані дані узгоджуються з результатами отриманими іншими авторами. Показано зростання активності аргінази-2 в клітинній лінії епітеліального РЯ. Зростання аргіназної активності відмічається при цілому ряді інших онкопатологій, причому характер змін активності аргінази часто залежить від стадії новоутворення та типу тканини [113].

При визначенні оптимальних умов функціонування аргінази у лімфоцитах як у контрольних групах, так і при РЯ, яка є не тільки цитозольної, але й мітохондріальної локалізації, та з'ясування ряду кінетичних параметрів необхідно було спочатку підібрати оптимальні умови для функціонування ензиму при пермеабілізації клітин сапоніном.

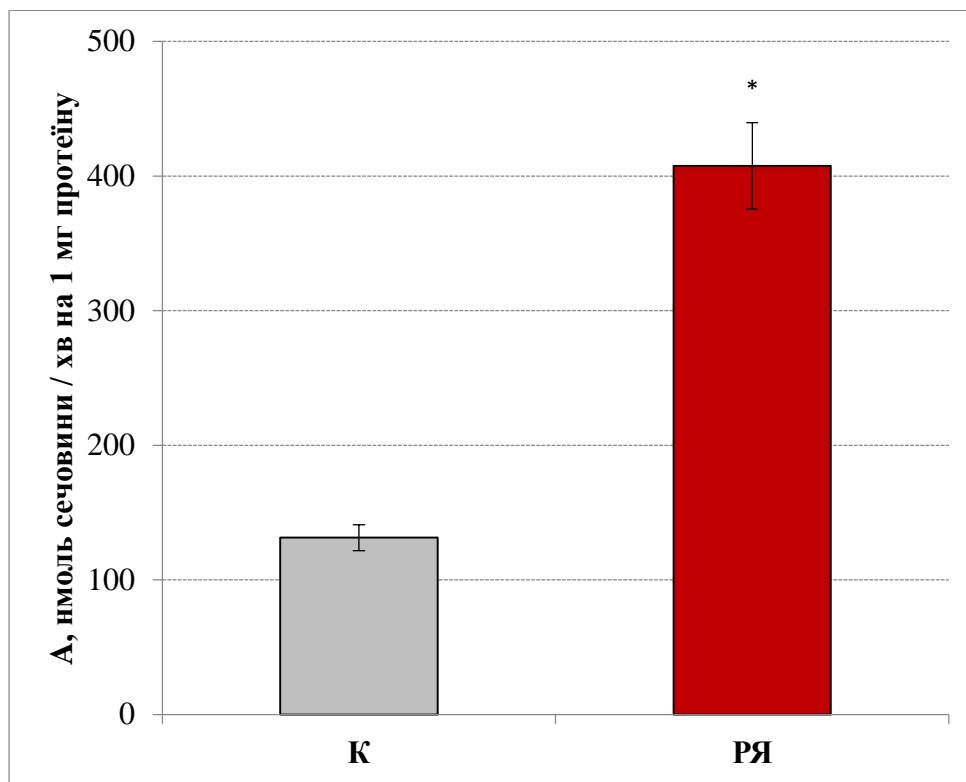


Рис. 5.1. Активність аргінази в лімфоцитах периферичної крові за умов фізіологічної норми (К) та при розвитку раку яєчника (РЯ),  $M \pm m$ ,  $n=6$ .

Примітка: зміни вірогідні щодо величин в осіб контрольної групи,  $*p < 0,001$ .

Для визначення оптимальних концентрацій субстратів для функціонування аргінази ЛПК та з'ясування ряду кінетичних параметрів для ензиматичної реакції аргінази L-аргінін вносили в середовище інкубації в діапазоні концентрацій від 1 до 200 мМ (за сталої концентрації  $Mn^{2+}$  2 мМ). При цьому спостерігається лінійне збільшення ензиматичної активності аргінази з наступним виходом на плато. У всьому діапазоні досліджуваних концентрацій L-аргініну активність аргінази хворих на РЯ була підвищена у порівнянні з такою величиною в контрольній групі (рис. 5.2.)

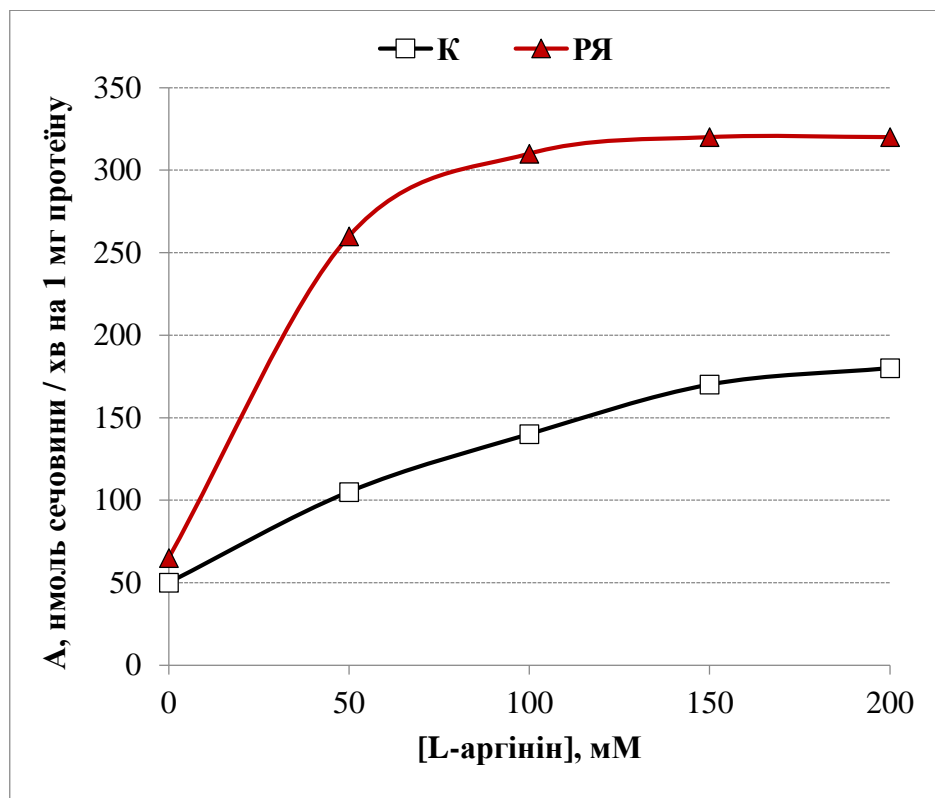


Рис. 5.2. Вплив концентрації L-аргініну на активність аргінази лімфоцитів крові за умов фізіологічної норми (К), та при розвитку раку яєчника (РЯ),  $n=6$ .

На основі лінеаризації отриманих даних у координатах Лайнуівера- Берка показаний змішаний тип інгібування активності ензиму та визначено основні кінетичні параметри гідролізу L-аргініну сапонін-пермеабілізованими лімфоцитами крові контрольних груп і хворих на РЯ (табл. 5.1). Розрахунок кінетичних параметрів активності аргінази свідчить про те, що максимальна швидкість гідролізу L-аргініну сапонін-пермеабілізованими лімфоцитами хворих на РЯ, визначена за L-аргініном, становить різницю стосовно фізіологічної норми (К) 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 ( $p<0,001$ ).

Кінетичні параметри, що характеризують гідроліз L-аргініну лімфоцитами крові практично здорових жінок і хворих на рак яєчника від концентрації L-аргініну ( $M \pm m, n = 6$ )

Кінетичні параметри \ Групи пацієнтів	Практично здорові жінки (К)	Хворі на рак яєчника
$V_{max}$ , нмоль/хв на 1 мг протеїна	140,3±6,6	358,9±17,4 *
$K_{L-arg}$ , мМ	1,6±0,2	3,4±0,3 *

Примітка:  $V_{max}$  – початкова максимальна активність ензиму,  $K_{L-arg}$  – константа Міхаеліса за L-аргініном.

Зміни вірогідні стосовно величин у лімфоцитах в осіб груп контролю (К), \* $p < 0,001$ .

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. Іншими дослідниками показано подібні результати спорідненості аргінази до субстрату [194, 195].

Відомо, що крім L-аргініну, для функціонування аргінази необхідними є іони марганцю, які є активною складовою ензиму та діють як кофактор. Досліди з вивчення впливу  $Mn^{2+}$  на аргіназну активність сапонін-пермеабілізованих ЛПК проводили в діапазоні концентрацій  $MnCl_2$  від 0 до 4 мМ. З'ясовано, що оптимальна концентрація  $Mn^{2+}$  складає 2 мМ.

Криві, які віддзеркалюють залежність активності аргінази лімфоцитів крові від вмісту йонів  $Mn^{2+}$  в інкубаційному середовищі в обох контрольних групах мають типовий куполоподібний вигляд (рис. 5.3).

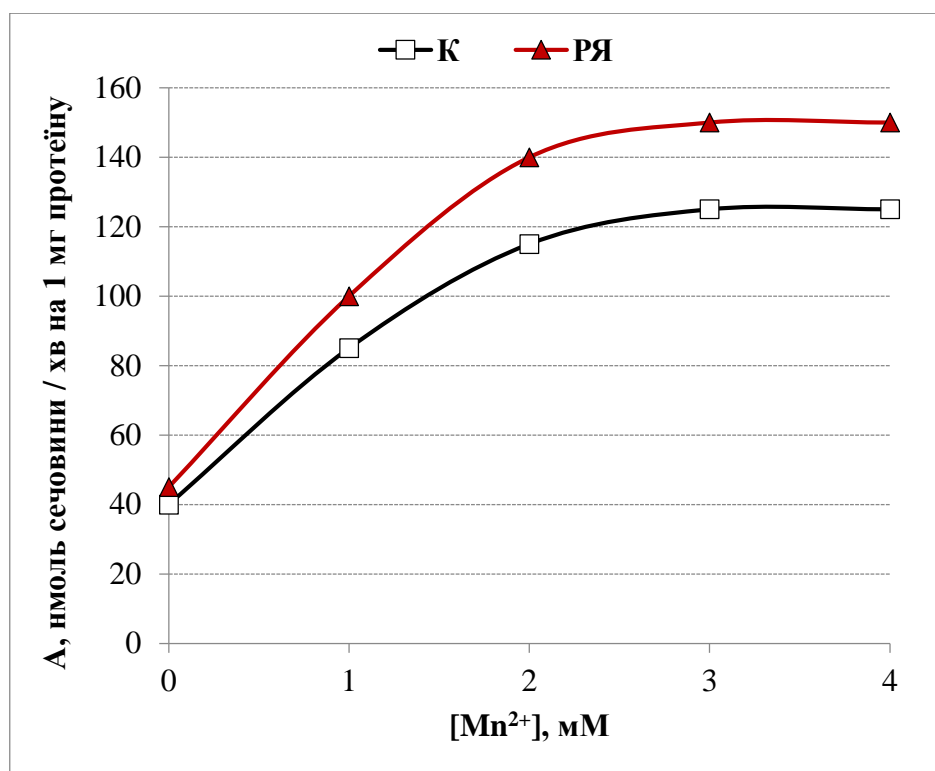


Рис. 5.3. Вплив концентрації йонів  $Mn^{2+}$  на активність аргінази лімфоцитів крові за умов фізіологічної норми (К) та при розвитку раку яєчника (РЯ),  $n=6$

Графіки залежності аргіназної активності сапонін-пермеабілізованих ЛПК хворих на РЯ мають аналогічний вигляд.

Ці результати свідчать про те, що максимальне значення активності аргінази спостерігається при 2 мМ  $MnCl_2$  в інкубаційному середовищі. Графіки залежності аргіназної активності лімфоцитів контрольних груп і хворих на РЯ від концентрації  $Mn^{2+}$  у висхідній частині кривих лінеаризовано у координатах Лайнуівера-Берка. Розрахунок кінетичних характеристик аргіназної активності свідчить, що початкова максимальна швидкість гідролізу *L*-аргініну у хворих на РЯ істотно відрізняються від практично здорових осіб, зростає в 2,1 раза.

Оптимальні концентрації  $Mn^{2+}$ , які активують ензим в нормі та при патології однакові та становлять 2 мМ. Уявна константа активації йонами  $Mn^{2+}$  практично однакова у хворих і контрольних груп (табл. 5.2).

Кінетичні параметри, що характеризують гідроліз L-аргініну сапонін-пермеабілізованими лімфоцитами крові практично здорових жінок і хворих на рак яєчника від концентрації йонів  $Mn^{2+}$  ( $M \pm m, n = 6$ ).

Кінетичні параметри \ Групи пацієнтів	Практично здорові жінки (К)	Хворі на рак яєчника
$V_{max}$ , нмоль / хв на 1мг протеїну	267,6±19,3	557,5±29,2*
$K_{Mn^{2+}}$ , мМ	1,86±0,13	1,88±0,14

Примітка:  $V_{max}$  – початкова максимальна активність ензиму,  $K_{Mn^{2+}}$  – уявна константа активації йонами  $Mn^{2+}$ .

Зміни вірогідні стосовно величин у лімфоцитах в групі контролю, \* $p < 0,001$ .

Отже, судячи з отриманих даних, максимальна швидкість реакції при патології зростає, а  $Mn^{2+}$ -зв'язувальна ділянка аргінази лімфоцитів залишається нативною.

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, відповідно 3,3 ( $p < 0,001$ ) і 1,2 ( $p < 0,05$ ) рази (рис. 5.4). Ймовірно іони  $Ca^{2+}$  призводять до зростання ензиматичної активності опосередковано через інші ензиматичні системи.

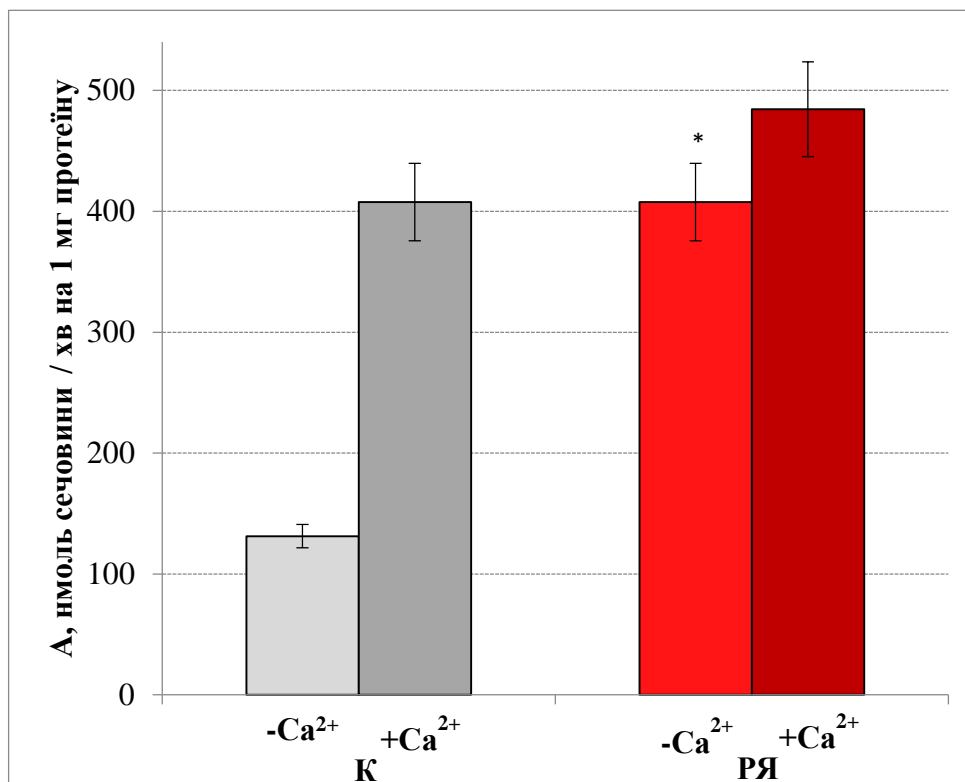


Рис. 5.4. Активність аргінази лімфоцитів крові при наявності іонів  $\text{Ca}^{2+}$  ( $M \pm m, n = 6$ ).

Примітка: зміни вірогідні стосовно величин у лімфоцитах в групі контролю,  $*p < 0,001$ .

Із даних літератури відомо, що помірний рівень аргіназної активності конститутивно представлений в ендотеліальних клітинах. Активність підвищується при дії ліпополісахаридів і фактора некрозу пухлин- $\alpha$  або з віком організму. Катаболізм L-аргініну за допомогою аргінази переважає катаболізм за участі NOS приблизно в 200 разів в нестимульованих ендотеліальних клітинах коронарних судин щурів [212, 213]. Аргіназа 2, експресія якої істотно не представлена в нестимульованих ендотеліальних клітинах людини, індукується під дією ліпополісахаридів і представляє собою мінімальну фракцію загальної кількості аргіназної активності в стимульованих ендотеліальних клітинах.

Дослідження показали, що інгібування активності аргінази призводить до підвищення продукції NO ендотелієм, а наявність аргінази в ендотеліальних



клітинах слугує обмежувачем доступності субстрату для NO за умов артеріальної гіпертензії та ішемічно-реперфузійного пошкодження. В судинах старих тварин щурів активність ендотеліальної аргінази підвищується і, відповідно, може зумовити дисфункцію ендотелію у вигляді зниження здатності до синтезу NO. Висока активність аргінази може також впливати на процеси, які відповідають за статеві розлади чоловіків і жінок. Аргіназа шляхом гальмування утворення оксиду азоту може впливати на процеси кровообігу, а статеві розлади у жінок пов'язані саме зі змінами кровообігу.

Таким чином, тримані результати доводять, що при РЯ суттєво зростає аргіназна активність лімфоцитів крові, що перш за все обумовлено збільшенням спорідненості ензиму до субстрату та зростанням максимальної швидкості реакції. Аргіназна активність також чутлива до іонів кальцію.

## 5.2 Характеристика $Ca^{2+}$ -залежної та $Ca^{2+}$ -незалежної ізоформ NO-синтази лімфоцитів крові жінок хворих на рак яєчника

Згідно даних літератури в лімфоцитах крові ідентифіковані як конститутивні, так і індукцйбельна ізоформи NOS [79 126, 150].

В результаті проведених досліджень встановлено, що активність cNOS лімфоцитів крові практично здорових жінок становить  $(71,4 \pm 6,9)$  нмоль NADPH( $H^+$ )/хв на 1 мг протеїну (рис. 5.5).

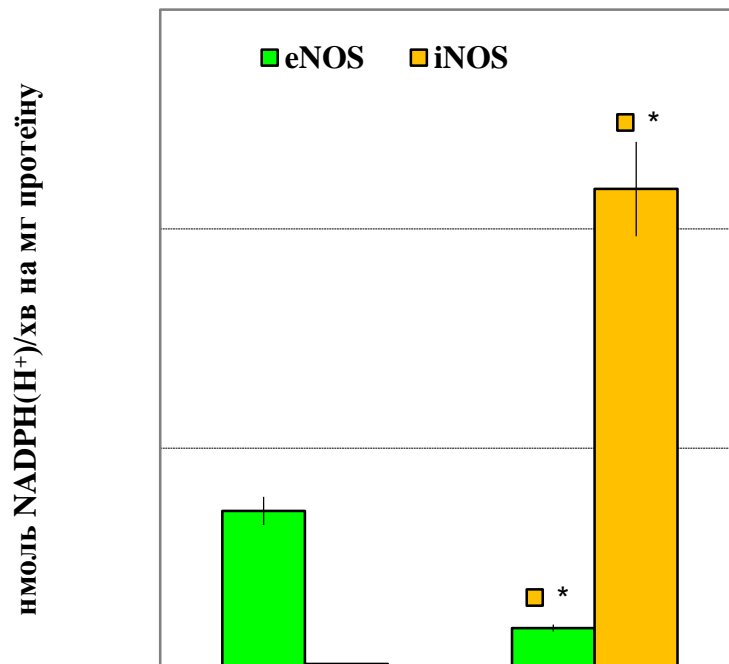


Рис. 5.5. Зміни активності конститутивної (1) та індукційної (2) ізоформ NO-синтази в лімфоцитах крові практично здорових жінок і хворих на рак яєчника ( $M \pm m$ ,  $n=6$ ).

Примітка: зміни вірогідні стосовно величин у лімфоцитах в осіб групи фізіологічної норми,  $*p < 0,001$ .

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 пацієнок з РЯ активність cNOS знижується в 4,1 раза щодо контрольної групи і становить  $(18,0 \pm 1,6)$  нмоль NADPH(H<sup>+</sup>)/хв на 1 мг протеїну ( $p < 0,001$ ).

Відомо, що cNOS продукує низькі концентрації NO, в той час як iNOS синтезує високі концентрації NO ( $>300$  нМ) [63, 79. 81. 168].

Індукційна ізоформа NOS є кальцій-незалежною і, на відміну від конститутивної ізоформи NOS, не експресується постійно (конститутивно).

Встановлено, що активність iNOS лімфоцитів крові практично здорових жінок ідентифікується в незначній мірі, практично на межі похибки, та становить  $(1,42 \pm 0,18)$  нмоль NADPH(H<sup>+</sup>)/хв на 1мг протеїну. На фоні інгібування cNOS у лімфоцитах крові пацієнок з РЯ спостерігається різке зростання активності iNOS до величини  $(220,1 \pm 24,4)$  нмоль NADPH(H<sup>+</sup>)/хв на мг протеїну, тобто в 155 раз ( $p < 0,001$ ).

Ці результати узгоджуються з даними отриманими дослідниками раніше, де також встановлено зростання активності та експресії iNOS у пацієнок з РЯ [79]. Показано, що у хворих на РЯ експресія iNOS корелює з стадією диференціації пухлини, а внутрішньоклітинний NO – з стадією хвороби. Встановлено, що інгібування iNOS може бути потенційною терапевтичною мішенню при лікуванні РЯ [79]. Гіперекспресія iNOS виявлена в різних типах злоякісних пухлин. Показано, що селективні інгібітори iNOS гальмують ріст пухлин, розвиток яких індукований дією різних канцерогенів [80]. Раніше вважали, що NOS-залежний синтез фізіологічно необхідного NO (“базальний NO”) здійснюється за участю eNOS і nNOS, а NOS-залежний синтез додаткових кількостей NO в клітині за розвитку різних патологічних станів реалізується за участю iNOS.

Тому активація iNOS є складовою ланкою численних адаптаційно-захистних реакцій клітини й організму. Проте, деякими авторами доказується участь iNOS в фізіологічному (“базальному”) синтезі NO, а також участь eNOS і nNOS при гіперсинтезі NO за інфекційних, алергічних та автоімунних захворювань. Тому, говорять про “базальну” NO-синтазну активність iNOS в регуляції фізіологічних функцій, зокрема в регуляції судинного тонуусу [63, 79, 103, 110, 123, 126, 145].

Отримані нами результати вказують на порушення аргіназо-NO-синтазної системи лімфоцитів крові, що ведуть до дисбалансу регуляторних систем лімфоцитів, зокрема регуляторної функції NO. Зростання активності iNOS очевидно викликає компенсаторне зниження активності cNOS та свідчить про гіперпродукцію NO в лімфоцитах крові за умов розвитку онкопатології. NO, 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 [84, 207, 209]. Показано, що клітини, в яких відмічено зростання концентрації NO мають підвищену швидкість росту [115].

Аргіназа регулює концентрацію L-аргініну в клітині та інгібує активність NOS (шляхом конкурування за спільний субстрат), безпосередньо регулюючи синтез NO [21, 43, 145]. Інгібіторами NOS виступають також поліаміни, що утворюються з L-орнітину – продукту аргіназної реакції [74, 84, 157, 218].

З огляду на те, що продукування клітиною NO в імунокомпетентних клітинах повністю залежить від наявності L-аргініну [75, 76, 123], різке зростання активності iNOS та аргінази в лімфоцитах крові пацієнтів з онкопатологією, імовірно, 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 не здатні синтезувати L-аргінін і потребують його екзогенного надходження. L-аргінін виступає ключовою молекулою у низці інших метаболічних, а також регуляторних і сигнальних шляхів, які зазнають серйозних змін під час злоякісної трансформації клітин і впливають на хід канцерогенезу [95, 169, 179, 182, 212, 213].

Водночас, показано, 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 при деяких онкопатологіях, так і зниження його рівня [95, 97]. Зниження концентрації L-аргініну в плазмі крові пов'язують саме з високими потребами пухлинних клітин в цій амінокислоті, які поглинають значну його кількість з 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 клітини крізь плазматичну мембрану та активності аргінін-деградуючих ензимів. Катаболізм протеїнів та/або ресинтез L-аргініну з цитруліну в L-цитруліновому циклі можуть в тій чи іншій мірі 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 “біодоступності” L-аргініну для NOS у клітині [97].

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 особливостями регуляції експресії генів метаболізму аргініну [65, 97].

З іншого боку, відомо, підвищена активність аргінази та iNOS при патологічних станах може викликати таке зниження доступності аргініну, яке ставить під загрозу T-лімфоцитарну функцію та продукцію NO, що веде до збільшеної сприйнятливості до інфекції [81].

Таким чином, зростання активності аргінази та iNOS лімфоцитів крові пацієнток з РЯ свідчить про загальну потребу клітин при пухлинному рості в L-аргініні. Патологічне зростання швидкості аргіназної та iNO-синтазної реакції на фоні зниження швидкості cNO-синтазної реакції пов'язані зі збільшенням біодоступності ендogenous пула L-аргініну.

Зміни активностей аргіназної та NOS ензиматичних систем лише вказують на спрямованість дисметаболических порушень в системі NO-гомеостазу. Проте, біохімічні механізми, що ведуть до змін функціональної активності досліджуваних ензиматичних систем при донозоологічному стані та при розвитку РЯ залишаються не з'ясованими. Тому наступний етап нашого

дослідження був присвячений вивченню кінетичних властивостей cNOS та iNOS ізоформ 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.).

Результати досліджень показали, що кінетичні криві утворення NO у процесі NO-синтазної реакції лімфоцитів крові мають тенденцію до насичення (рис. 5.6). З цього рис. видно, що кінетика утворення NO, за участю cNOS 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 у подальших експериментах тривалість інкубації лімфоцитів і, відповідно, NO-синтазної реакції становила 20 хв. Видно, що динаміка і кількість утворення NO за участю cNOS лімфоцитів крові пацієнток з РЯ є суттєво нижчими ніж у практично здорових осіб обох вікових груп.

Водночас, у всьому діапазоні фактора часу утворення NO за участю iNOS лімфоцитів крові хворих з РЯ значно перевищує ці величини для cNOS.

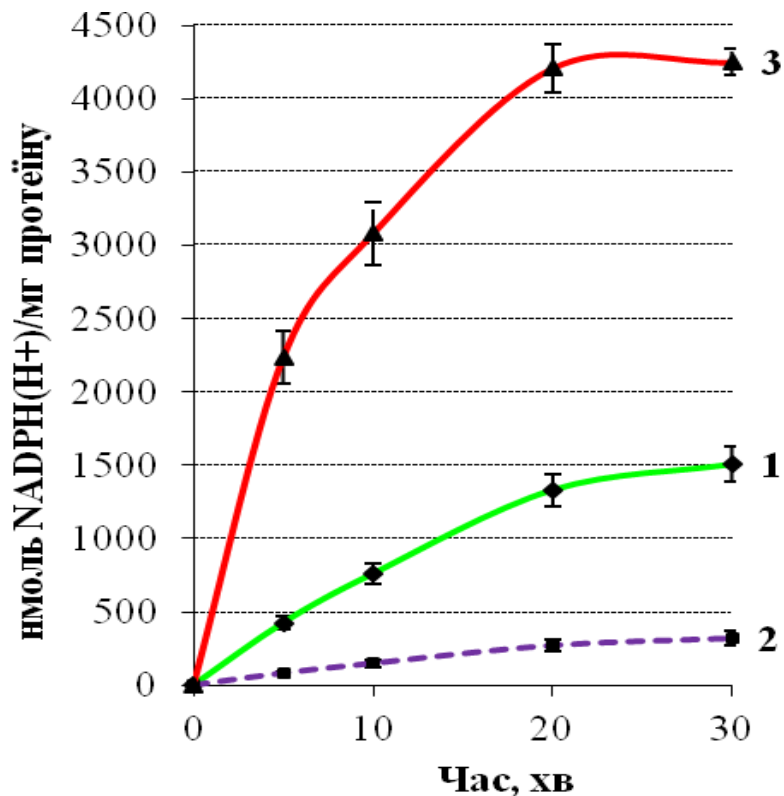


Рис. 5.6. Динаміка споживання NADPH(H<sup>+</sup>) у процесі NO-синтазної реакції лімфоцитів крові практично здорових жінок (1 – cNOS) і хворих на рак яєчника (2 – cNOS, 3 - iNOS),  $M \pm m$ ,  $n = 8$ .

Шляхом лінеаризації отриманих даних у координатах  $P/t$  від  $P$  обчислено основні кінетичні характеристики NOS реакції лімфоцитів крові (табл. 5.3).

Значення кінетичних параметрів для cNOS та iNOS лімфоцитів крові практично здорових жінок і хворих на РЯ істотно відрізняються між собою. Так,  $V_0$  контрольній групі складає  $(94,0 \pm 7,4)$  нмоль NADPH(H<sup>+</sup>)/хв на 1 мг протеїну. У хворих на РЯ  $V_0$  суттєво знижувалось, до  $(18,5 \pm 1,5)$  нмоль NADPH(H<sup>+</sup>)/хв на 1 мг протеїну ( $p < 0,001$ ). Як видно з рис. 5.6 і даних табл. 5.3 синтез NO за участю iNOS, яка активується при РЯ, відбувається значно інтенсивніше ніж за участю cNOS,  $V_0$  сягає  $(739 \pm 59,6)$  нмоль NADPH(H<sup>+</sup>)/хв на 1 мг протеїну.

Таблиця 5.3

Кінетичні параметри NO-синтазних реакцій лімфоцитів крові практично здорових жінок обох вікових груп і хворих на рак яєчника ( $M \pm m$ ,  $n = 6$ )

Кінетичні параметри	Практично здорові жінки	Хворі на РЯ
<b>cNOS</b>		
$V_0$ , нмоль NADPH(H <sup>+</sup> )/хв на 1 мг протеїну	94,0±7,4	18,5±1,5 *
$P_{max}$ , нмоль NADPH(H <sup>+</sup> )/мг протеїну	3413±315	908,6±186,2 *
$\tau$ , хв	36,7±4,6	50,6±12,9
<b>iNOS</b>		
$V_0$ , нмоль NADPH(H <sup>+</sup> )/хв на мг протеїну		739,0±59,6
$P_{max}$ , нмоль NADPH(H <sup>+</sup> )/мг протеїну		5536,4±57,7
$\tau$ , хв		7,6±0,7

Примітка: зміни вірогідні стосовно величин у лимфоцитах крові в осіб групи фізіологічної норми, \* $p < 0,001$ .

Синтез NO за участю cNOS при онкопатології відбувається повільніше і менш активно, ніж у нормі. 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 в обох контрольних вікових групах він був практично однаковим, а при РЯ зростав в 1,4 раза ( $p < 0,05$ ).

Отримані кінетичні параметри підтверджують дані, що у лимфоцитах 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. У цьому плані важливою характеристикою NOS є залежність активності ензиму від концентрації субстрату в середовищі інкубації, яка визначається величиною уявної константи спорідненості (аффіності) до субстрату  $K_{L-Arg}$ . Останню різраховували шляхом визначення питомої NOS активності у середовищі інкубації, яке містили L-аргінін



в діапазоні концентрацій від 0,1 до 30 мкМ (за сталої кінцентрації  $\text{CaCl}_2$  – 10 мМ та NADPH – 0,12 мМ).

З'ясовано, що підвищення кінцентрації *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 ізофірм NOS з виходом на плато (рис. 5.7).

Максимальна активність cNOS лімфоцитів крові практично здорових осіб та iNOS лімфоцитів крові хворих на РЯ тестується за наявності 20 мкМ *L*-аргініну в інкубаційному середовищі. Активність cNOS лімфоцитів крові пацієток з РЯ виходить на плато за значно нижчих концентрацій субстрату.

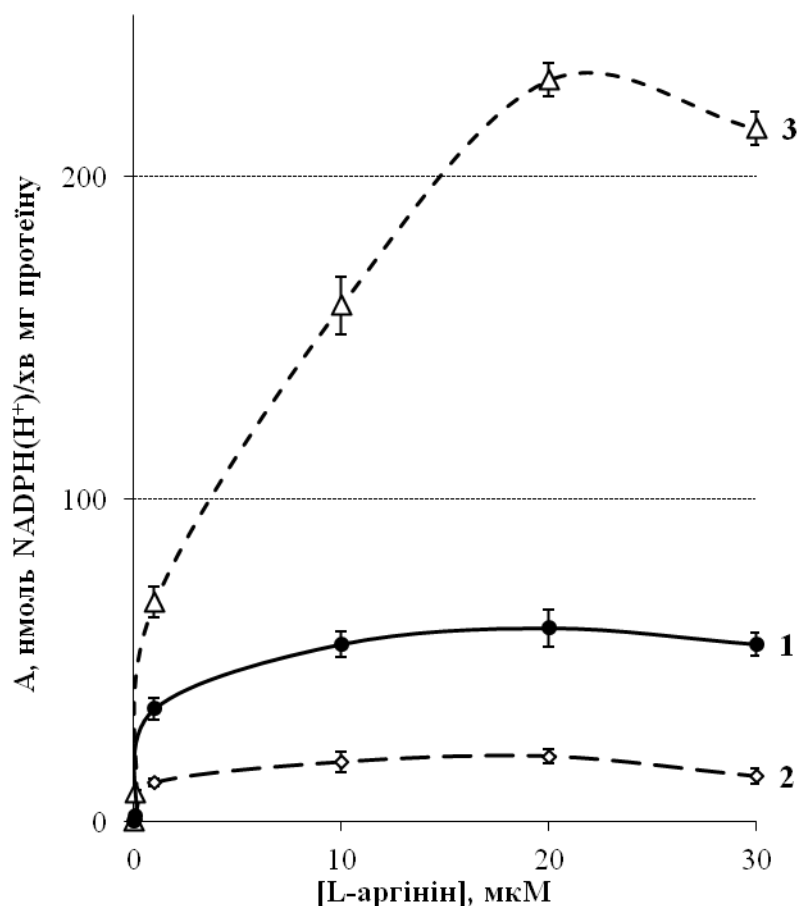


Рис. 5.7. Концентраційна залежність впливу *L*-аргініну на активність окремих ізоформ NOS лімфоцитів крові практично здорових жінок (1 – cNOS) і хворих на рак яєчника (2 – cNOS, 3 – iNOS),  $M \pm m$ ,  $n=6$ .

Шляхом лінеаризації отриманих концентраційних залежностей у координатах Лайнуівера-Берка визначено основні кінетичні параметри NOS лімфоцитів крові (табл. 5.4).

Як впливає з даних табл. 5.4, значення  $V_{\max}$  для cNOS лімфоцитів крові осіб групи контролю в 1,8 рази перевищує цю величину для cNOS лімфоцитів крові пацієток з РЯ ( $p < 0,001$ ). Водночас, значення  $K_{L-Arg}$  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.

Таблиця 5.4

Кінетичні параметри NO-синтаз лімфоцитів крові порактично здорових жінок і хворих на рак яєчника, визначені за L-аргініном ( $M \pm m, n = 6-8$ )

Кінетичні параметри	Практично здорові жінки	Хворі на РЯ
	<b>cNOS</b>	
$V_{\max}$ , нмоль NADPH( $H^+$ )/хв на мг протеїну	235,6±44,0	131,2±30,7*
$K_{L-Arg}$ , мкМ	14,6±2,7	21,2±4,1
	<b>iNOS</b>	
$V_{\max}$ , нмоль NADPH( $H^+$ )/хв на мг протеїну	–	244,3±6,9
$K_{L-Arg}$ , мкМ	–	2,7±0,2 **

Примітка: зміни вірогідні стосовно величин у cNOS лімфоцитів крові в осіб групи фізіологічної норми, \*  $p < 0,05$ .

Проте, iNOS лімфоцитів крові пацієнток з РЯ характеризується значно вищою спорідненістю до *L*-аргініну: величина  $K_{L-Arg}$  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 дисметаболичні зміни в системі синтезу NO, а саме його гіперпродукцію.

З даних літератури відомо, що NO бере участь в промоції канцерогенезу як модифікатор метаболізму ксенобіотиків і як агент, який порушує про- і антиканцерогенний генетичний баланс, викликаючи одно- і двониткові розриви ДНК. Метаболіт оксиду азоту пероксинітрит ( $ONOO^-$ ) є сильним мутагеном [197]. Оскільки, NO є фактором, який регулює проникність судин, і відіграє важливу роль в ангіогенезі та рості пухлин, дослідження його властивостей дає важливу інформацію для оцінки клінічного перебігу захворювання. При цьому не тільки сам оксид азоту, але й його похідні здійснюють важливі фізіологічні функції, беруть участь в регуляції апоптозу, ангіогенезу, вільнорадикальних процесів [4, 197, 203].

Орнітин, один із продуктів обміну *L*-аргініну, є безпосереднім попередником поліамінів, які важливі для проліферації клітин [162, 163]. На додачу до конкуренції за субстрат, *L*-аргінін, існують інші взаємодії між двома шляхами метаболізму аргініну, такі як інгібування аргінази NG-гідрокси-*L*-аргініном, проміжним продуктом біосинтезу NO [103, 161]. Поліаміни є важливими для проліферації неопластичних клітин, виснаження їх рівня призводить до зупинки пухлинного росту [181]. Індуцибельна NO-синтаза каталізує утворення NO, який вносить вклад в протипухлинну активність активованих макрофагів. iNOS експресія індукується цитокінами, передусім прозапальним цитокіном  $\text{IFN-}\alpha$  [175], який може продукуватись певними Т-

лімфоцитами і природними кіллерами (NK-клітинами), що є важливими в адаптивній та природній імунній відповіді, в свою чергу [4]. iNOS та аргіназа по-різному регулюються про- і протизапальними цитокінами [162, 163]. На додачу, rIFN- $\gamma$ (rIFN) може мати прямий антипроліферативний ефект на пухлинні клітинні лінії *in vitro*, включаючи ряд клітинних ліній раку яєчників [112]. Ця антипроліферативна активність в деяких експериментальних системах залежить від катаболізму іншої амінокислоти, L-триптофану, ензимом індоламін 2,3-діоксигеназою (IDO). Протипухлинна активність rIFN- $\gamma$ , що контролюється або інтраперітонеально, або системно [179, 213], також була досліджена в клінічних випробуваннях епітеліальної карциноми яєчників (EOC).

В. Melichar та інші, досліджували метаболізм L-аргініну в клітинних лініях епітеліальної карциноми яєчників. Експресія і активність аргінази варіювали серед EOC клітинних ліній. Аргіназна активність знижувалась після обробки клітин rIFN- $\gamma$  у трьох клітинних лініях і зростала в 2008 і 2008.C13 клітинах. Механізм інгібування аргінази виявився не залежним від синтезу NO. Аргіназа 2 є ізоензимом, який відповідає за аргіназну активність в клітинах EOC, тоді як синтез аргінази 1 виявлений не був [153].

Попередні дослідження показали, що прозапальні цитокіни індуюють експресію iNOS та апоптоз в клітинах РЯ [182]. Було продемонстровано, що проапоптичний ефект iNOS частково міг бути опосередкований через p53-залежний шлях. Цю гіпотезу підтверджують спостереження, що в нормальних фібробластах людини та епітеліальних клітинах печінки, індукція iNOS стимулює акумуляцію p53 та апоптоз [165]. Хоча, на сьогоднішній день, доказів зв'язку NO, p53, і чутливості ракових клітин яєчника до хіміотерапевтичних препаратів практично немає. Більшість епітеліальних ракових клітин жінок також експресують iNOS, позитивна експресія якої виступає індикатором виживання хворих [63]. Експресія NOS II в пухлинах відіграє важливу роль при метастазуванні. Експерименти з трансфекції показали, що надекспресія гену NOS II інгібує метастазування в клітинах ниркового епітелію, частково за рахунок пришвидшення смерті клітин. У той час, низька експресія NOS II сприяла росту ракових клітин товстої кишки у людини.

Вивчалась роль eNOS, iNOS, і nNOS у регуляції і акумуляції p53 та резистентності до хіміотерапевтичного препарату цисплатину (CDDP) в клітинах РЯ [39]. Отримані дані підтвердили, що iNOS задіяна в CDDP-індукованому апоптозі в CDDP-чутливих клітинах, тоді як eNOS/nNOS беруть участь (p53-незалежний шлях) в розвитку хіміорезистентності шляхом пригнічення CDDP-індукованого апоптозу в ізогенних CDDP-резистентних клітинах. Блокування в CDDP-резистентних клітинах всіх NO-синтаз за допомогою NG-аміно-L-аргініну різко змінювало ці клітини з цисплатин-резистентних на цисплатин-чутливі, значно збільшуючи цисплатин-індукований апоптоз. Наведені дані свідчать про важливу роль всіх трьох NO-синтаз в регуляції хіміорезистентності до цисплатину в трансформованих клітинах, і передбачають потенційно новий шлях зміни їх резистентності до терапевтичного ефекту фармпрепаратів.

Індукція iNOS в імунних, ендотеліальних та інших клітинах може бути ініційована запальними цитокінами – інтерфероном, фактором некрозу пухлин (ФНП) або інтерлейкіном-1 [153, 175]. Проте, найпотужнішими індукторами експресії iNOS є ліпополісахариди та ендотоксини. Ензим синтезується впродовж 6-8 годин у відповідь на їх дію і продукує велику концентрацію NO. Активність iNOS зберігається впродовж тривалого періоду і кількість NO, синтезованого таким чином, значно перевищує кількість NO, виробленого за участі конститутивного ізоензиму eNOS. Надлишок NO пригнічує активність eNOS, пошкоджує ендотеліальні клітини і порушує нормальну функцію ендотелію артерій.

Дія NO на клітини залежить від його концентрації, що, своєю чергою залежить від різних ізоформ NOS, однак, пов'язана, зазвичай, з iNOS. Основною функцією NO, продукованого iNOS, є участь в імунних процесах, включно з антипатогенними реакціями, неспецифічна цитотоксичність, протопухлинний захист, відторгнення трансплантантів тощо [150]. Висока активність цього ензиму призводить до накопичення NO та ініціації патологічних процесів в клітині (інгібування мітохондріальних ензимів, пошкодження ДНК тощо). Надмірне продукування NO відбувається при відторгненнях трансплантатів,

артритах, септичному шоці, запальних процесах; є фактором, що зумовлює руйнування нервових клітин і може призводити до хвороби Альцгеймера, пригнічує проліферацію та збільшує апоптоз лімфоцитів і макрофагів та спричиняє виникнення вторинних імунодефіцитів [138]. Даний механізм, вірогідно, пов'язаний з реакцією нітрифікації ДНК чи РНК клітин безпосередньо NO. Тому особливо актуальною є проблема селективного інгібування кожної з ізоформ ензиму, і, першою чергою, індукцибельної. У зв'язку з цим значні зусилля дослідників і спрямовані на вивчення механізмів регуляції активності ізоформ NOS.

Наслідком підвищення активності індукцибельної NOS є збільшення кровотоку в місцях запалення. Оскільки великі дози NO токсичні для клітин, ця форма ензиму вважається паталогічною на відміну від конститутивних форм ензиму.

### 5.3 Концентрація метаболітів оксиду азоту в лімфоцитах крові жінок хворих на рак яєчника

Для оцінки інтенсивності функціонування NO-синтазного шляху метаболізму L-аргініну при розвитку РЯ визначали вміст стабільних метаболітів NO: нітрит- ( $\text{NO}_2^-$ ) і нітрат- ( $\text{NO}_3^-$ ) аніонів у сироватці крові. Виявлено, що у практично здорових жінок концентрація нітрит-аніонів складає ( $4,42 \pm 0,51$ ) мкмоль/л. Щодо концентрації нітрат-аніонів, то їх концентрація складала ( $6,91 \pm 0,67$ ) мкмоль/л.

У пацієнтів з РЯ спостерігалось достовірне зниження концентрації  $\text{NO}_2^-$  з ( $4,42 \pm 0,51$ ) (контроль) до ( $2,93 \pm 0,27$ ) мкмоль/л, тобто у 1,5 раза ( $p < 0,01$ ) (табл. 4.5). Щодо  $\text{NO}_3^-$ , то його концентрація достовірно зростала, з ( $6,91 \pm 0,67$ ) (контроль) до ( $9,87 \pm 0,92$ ) мкмоль/л, тобто в 1,4 раза ( $p < 0,01$ ). Важливо відмітити, що при РЯ суттєво зростає співвідношення  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ , у 3,4 раза. В той час як у нормі це співвідношення дорівнює 1,6 раза. Відомо, що не тільки сам оксид азоту, але й його похідні здійснюють важливі фізіологічні функції, беруть участь в регуляції апоптозу, ангіогенезу, вільно радикальних процесів [4].

Таблиця 5.5

Концентрація метаболітів оксиду азоту в сироватці крові практично здорових жінок і хворих на рак яєчника ( $M \pm m, n=6$ ).

Показники	Практично здорові жінки	Жінки хворі на рак яєчника
$\text{NO}_2^-$ , мкмоль/л	4,42±0,51	2,93±0,27*
$\text{NO}_3^-$ , мкмоль/л	6,91±0,67	9,87±0,92*

Примітка: зміни вірогідні щодо величин у практично здорових осіб, \* $p < 0,05$

Так, NO з високою спорідненістю взаємодіє з супероксид-аніоном, в результаті чого утворюється пероксинітрит ( $\text{ONOO}^-$ ), який має виражені цитотоксичні та мутагенні властивості [168, 171]. Зазвичай утворення  $\text{ONOO}^-$  незначне, оскільки надлишок супероксиду видаляється супероксиддисмутазою, але за наявності оксидативного стресу в організмі складаються всі передумови для продукції  $\text{ONOO}^-$  у кількості достатній для виникнення та розвитку патологічних процесів [171].

Пероксинітрит має набагато більшу реакційну здатність в порівнянні з супероксидним радикалом та NO. Він бере участь в багатьох хімічних реакціях, зокрема у нітруванні залишків тирозину у протеїнах, ініціації пероксидного окиснення ліпідів, порушенні структури ДНК, що спричиняє виникнення мутацій, пригніченні транспорту електронів в мітохондріях тощо. Окрім того, він активує циклооксигеназу, яка є ключовим ферментом синтезу простагландинів, які є потужними медіаторами запалення [4, 171].

Хоча ізоензими NO є продуктами різних генів і їм властиві різні функції, поділ на індукцибельний і конститутивний синтез NO є умовним, оскільки вони утворюють один продукт – молекулу NO, яка легко дифундує через клітинні мембрани і не потребує рецепторів для реалізації своїх ефектів. Баланс між фізіологічними, регуляторними і/або цитотоксичними

властивостями значною мірою зумовлений локальною концентрацією NO, а також оксидантним статусом тканин, в яких синтезується і реалізує свої ефекти NO [138].

Особливу цікавість до механізмів регуляції кожної з ізоформ ензиму зумовлена тим, що NO зумовлює плеiotропні фізіологічні ефекти.

Клітинні ефекти NO здійснюються шляхом зв'язування з гемовмісним ензимом гуанілатциклазою, NO реагує з гемоглобіном еритроцитів з утворенням метгемоглобіну. Внаслідок цього NO перетворюється в йон нітриту ( $\text{NO}^{2-}$ ), а в присутності гемового  $\text{Fe}^{2+}$   $\text{NO}^{2-}$  перетворюється в більш стабільний йон нітрату ( $\text{NO}^{3-}$ ), тому в організмі переважають нітрати [23, 224].

NO також легко вступає в реакцію з супероксидним аніон-радикалом. Реакція NO з супероксид-аніоном ( $\text{O}_2^-$ ) з наступним утворенням пероксинітриту ( $\text{OONO}^-$ ) і гідроксил-радикала ( $\text{OH}^-$ ) — це другий шлях метаболізму NO. Дані сполуки є високо реакційними вільними радикалами, володіють прооксидантними властивостями та спричиняють деструктивні ефекти щодо білків і ліпідів [14, 125]. Пероксинітрит опосередковує цитотоксичні ефекти NO, такі як пошкодження ДНК, окиснення ліпопротеїдів низької щільності, формування ізопростану, нітрування тирозину, інгібування аконітази і мітохондріального дихання [125, 138]. Третій шлях — утворення нітрозотіолів і динітрозольних комплексів негемового заліза, які є депо-формою NO.

Оскільки, NO є фактором, який регулює проникність судин, і відіграє важливу роль в ангіогенезі та рості пухлин, дослідження його властивостей дає важливу інформацію для оцінки клінічного перебігу захворювання.

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 фармакотерапії в онкотерапії.

**Висновок.** Таким чином, результати проведених нами досліджень показали, що в обох вікових групах практично здорових жінок достовірної



різниці між активностями аргінази та cNOS не виявлено. За умов розвитку онкопатології в лімфоцитах крові відбувається зростання активності аргінази, суттєве зниження активності cNOS і багатократне зростання активності iNOS. Ймовірно, зміна активності аргінази та рівня функціонування циклу NO можуть бути використані в якості маркерів для діагностики РЯ і мати важливе прогностичне значення. Більше того, інгібітори iNO-синтази та аргінази можуть застосовуватись для підсилення лікувального ефекту ряду протипухлинних препаратів. Співставлення даних показників з іншими фізіологічними та біохімічними характеристиками може мати значення у з'ясуванні вікових особливостей функціонування аргіназо-NO-синтазної системи та механізмів розвитку РЯ.

Матеріали даного розділу представлені в публікаціях:

1. Бариляк РВ, Воробець ДЗ, Фафула РВ, Онуфрович ОК, Мельник ОВ, Воробець ЗД. Рак яєчника: функціонування  $\text{Ca}^{2+}$ -залежної та  $\text{Ca}^{2+}$ -незалежної ізоформ NO-синтази в лімфоцитах крові жінок. Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. 2019;4(88):63-72.
2. 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.
3. Бариляк РВ, Воробець ДЗ, Воробець ЗД. Активність  $\text{Ca}^{2+}$ -залежної та  $\text{Ca}^{2+}$ -незалежної ізоформ NO-синтази лімфоцитів крові у хворих на рак яєчника. Актуальні питання патології за умов дії надзвичайних факторів на організм. Матеріали X Науково-практ. конф. з міжнародною участю (05-06.10.2017, Тернопіль). Тернопіль, 2017:5.
4. Бариляк РВ, Воробець ДЗ, Мельник ОВ, Корчинська ОС, Воробець ЗД. Властивості  $\text{Ca}^{2+}$ -залежної та  $\text{Ca}^{2+}$ -незалежної ізоформ NO-синтази в лімфоцитах крові жінок хворих на рак яєчника. Здобутки клінічної та експериментальної медицини. Підсумкова LXII науково-практична конференція присвячена 165-річчю від дня народження Івана Яковича Горбачевського (30.06.2019, Тернопіль). Тернопіль, 2019:35-36.

5. Баріляк Р.В., Воробець Д.З., Воробець З.Д. Індуцибельна ізоформа NO-синтази, як потенційний додатковий маркер раку яєчника. СФУЛТ. 2020;

## РОЗДІЛ 6

### АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Рак яєчника відноситься до тяжкої патології жіночої репродуктивної системи, яка широко вивчається з метою як удосконалення методів діагностики і виявлення пухлинного процесу на ранніх стадіях, так й оптимізації лікування на підставі сучасних уявлень про його патогенез.

Одним з найважливіших напрямків біохімічних та інших біомедичних досліджень є з'ясування механізмів, що регулюють функціонування клітини при злоякісній трансформації. В цьому плані, роль оксид азоту та іонізованого кальцію, як універсальних внутрішньоклітинних месенджерів, а також оксидативного стресу не викликають сумніву [63, 67, 71, 100, 105, 108].

Відомо, що синтез NO здійснюється за участю окремих ізоформ NO-синтази шляхом окисного метаболізму L-аргініну [112, 114, 138]. Також L-аргінін є субстратом для аргінази, яка неокисним шляхом метаболізує його до сечовини та орнітину [103, 154, 155]. Співвідношення між цими ензимами забезпечує у клітинах певний фізіологічний пул NO. Більшість типів клітин організму людини мають одну або три ізоформи NOS. Існують дані, що NO виявляє про- або антипроліферативний ефект, зокрема антионкогенний, залежно від його концентрації [105, 115, 130]. Крім того, NO виступає фактором, який відіграє важливу роль в ангіогенезі та рості пухлин.

З іншого боку, важлива роль у підтриманні йонного гомеостазу та фізіологічної функції клітини належить йонам  $Ca^{2+}$ , концентрація яких є інтегральним показником життєдіяльності клітини та її функціонування [78, 88, 160]. Контроль  $[Ca^{2+}]_i$  забезпечується суперпозицією функціонування систем пасивного та активного транспорту цього йону, зокрема  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ -АТФазам плазматичної мембрани та ендоплазматичного ретикулулу [72, 100, 172].

Важливим фактором, що впливає на порушення регуляторних систем клітини є активацією процесів пероксидації ліпідів і порушенням системи антиоксидантного захисту [71, 119, 129, 133]. За дії екстремальних факторів різного походження (хімічне забруднення, іонізуюче випромінювання, гіпер- і

гіпоксія, токсичні речовини, запальні процеси) утворення АФК у живих організмів інтенсифікується. За нормальних фізіологічних умов АФК не нагромаджуються у клітинах. Будь-яка стресова реакція організму в нормі супроводжується короточасним збільшенням кількості АФК і реакцією на це різних ензимів антиоксидантної системи.

З метою діагностики та постопераційного лікування РЯ використовують визначення специфічного антигена в сироватці крові СА-125 [14, 71, 82, 190]. Це високомолекулярний глікопротеїн, який наявний в епітелії яєчника в нормі. Підвищення рівня СА-125 спостерігають при епітеліальній карциномі яєчника і воно певною мірою корелює з прогресуванням росту пухлини. Зниження концентрації маркера свідчить про позитивні зміни в яєчнику внаслідок лікування.

Антиген СА-125 найбільш широко представлений серед маркерів злоякісних пухлин яєчників [26, 72, 82, 190]. Визначення СА-125 багатьма авторами визнається достатньо інформативним тестом виявлення злоякісних пухлин яєчників епітеліального походження [167, 177, 190, 217].

Результати визначення концентрацій пухлинного маркера СА-125 в сироватці крові практично здорових жінок і хворих на рак яєчника в наших дослідженнях свідчать про те, що з розвитком раку яєчника (від I до IV стадії) спостерігається поступове багатократне зростання концентрації СА-125. Доведено, що існує позитивна кореляція між клінічною стадією РЯ і рівнем СА-125.

В клініці, найбільш успішно тести на рівень СА-125 в сироватці крові пацієнток з карциномою яєчників використовуються при оцінці ефективності хіміотерапії після оперативного втручання і при спостереженні хворих з метою раннього виявлення рецидивів. Можливості використання цього тесту при ранньому виявленні захворювання, диференціальної діагностики, прогнозування перебігу хвороби вкрай обмежені і вимагають подальшого більш детального обґрунтування [82].

Інтенсифікація пероксидації ліпідів призводить до накопичення токсичних продуктів, що призводить до зниження резистентності організму [100, 117, 122,

250]. В той же час буферна ємність антиоксидантної системи достатньо велика та забезпечується різними складовими. Важливе місце серед АОС клітини займає система глутатіону, компоненти якої приймають участь як в ензиматичних (глутатіонпероксидаза, глутатіонредуктаза, глутатіон-трансфераза), так і в неензиматичних (глутатіон) реакціях АОС [150, 170, 188]. Хоча система глутатіону є об'єктом багатьох досліджень, в літературі немає одностайної думки щодо її ролі в вікових змінах організму, розвитку патологічних станів, зокрема злоякісного росту. У зв'язку з тим аналіз функціонального стану системи глутатіону при раку яєчника дозволить виявити її роль в патогенезі та прогнозі захворювання.

Нами проведено порівняльне дослідження процесів ПОЛ і системи глутатіону в жінок контрольної групи і хворих на рак яєчника. Показано активацію процесів ПОЛ, за визначенням концентрації малонового діальдегіду, який є вторинним продуктом пероксидації ліпідів, при РЯ в 1,6 раза. Подібна ситуація спостерігається і при визначенні концентрації МДА у лімфоцитах крові.

Таким чином, при РЯ процеси ПОЛ суттєво інтенсифікуються, в плазмі крові – в 1,6 раза ( $p < 0,001$ ), і лімфоцитах крові – в 1,5 раза ( $p < 0,001$ ).

Слід відмітити, що пероксидація ліпідів чутлива до концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в інкубаційному середовищі. Так, за присутності 0,5 мМ  $\text{Ca}^{2+}$  в інкубаційному середовищі пероксидація ліпідів інтенсифікується в 1,6 раза ( $p < 0,001$ ). Однак, слід відмітити, що це не є фізіологічні внутрішньоклітинні 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, показано, що при РЯ концентрація відношеного глутатіону зростає в 1,4 раза щодо контролю ( $p < 0,05$ ). Слід відмітити, що підвищені рівні GSH спостерігаються у багатьох пухлинах, що робить їх більш резистентними до хіміотерапії. GSH діє як антиоксидант завдяки наявності активної тіолової групи в цистеїновому залишку. Іншим варіантом дії GSH є безпосередня взаємодія з активними формами кисню чи азоту та інших електрофілів. Окрім цього, GSH виступає як кофактор для різноманітних ензимів.

Також, виявлено, що при РЯ активність глутатіонпероксидази статистично 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.

Виникає запитання щодо невідповідності зростання концентрації GSH при РЯ та зниженням активності ГР. Тут слід відмітити, що контроль внутрішньоклітинного гомеостазу глутатіону є складним процесом, який відбувається за рахунок його синтезу, споживання й деградації. Постійна присутність GSH в організмі людини забезпечується трьома шляхами: внутрішньоклітинним синтезом, потраплянням екзогенного глутатіону через плазматичні мембрани, а також відновленням окисненої форми (GSSH) глутатіонредуктазою. Основним резервуаром GSH у ссавців є печінка, звідки він виділяється в значній кількості в кров. Тобто ГР виконує одну із трьох функцій підтримання гомеостазу GSH.

Як уже відмічалось, іонізований  $Ca^{2+}$  відіграє ключову роль в регуляції практично всіх внутрішньоклітинних 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, тобто транспорті його з цитозоля проти концентраційного градієнта в позаклітинне середовище та цистерни ЕПР.

Нами досліджені активності  $Ca^{2+}, Mg^{2+}$ -АТФази плазматичної мембрани лімфоцитів практично здорових жінок, а також хворих на рак яєчника III і IV стадії. У результаті проведених досліджень встановлено, що  $Ca^{2+}, Mg^{2+}$ -АТФаза активність плазматичної мембрани лімфоцитів крові у пацієнтів з РЯ (III і IV

стадія) достовірно відрізнялась від фізіологічної норми, тобто знижувалась в 1,6 та 1,8 рази, відповідно ( $p < 0,05$ ).

Для визначення основних кінетичних параметрів гідролізу АТФ за участі  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -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 Лайнуївера-Берка.

Встановлено, що значення максимальної швидкості гідролізу АТФ  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазою плазматичної мембрани лімфоцитів крові у пацієнтів з РЯ III стадії знижується в 1,5 рази, а IV стадії – в 1,6 рази і ці значення є статистично достовірними ( $p < 0,05$ ).

З'ясування значень констант спорідненості (афінності) показало, що ці величини знаходяться в субмілімолярному діапазоні концентрацій, що відповідає фізіологічній концентрації  $[\text{Mg} \cdot \text{АТФ}]$  у цитоплазмі клітин (0,5 – 5 мМ). Показано, що величина константи афінності до АТФ для  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФази плазматичної мембрани лімфоцитів крові пацієнтів з РЯ (III і IV стадії) у 2,0-2,1 рази перевищували ці значення для лімфоцитів крові осіб групи фізіологічної норми.

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  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФаз до субстрату (константа спорідненості до АТФ зростала).

Окрім  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазної активності плазматичної мембрани, вивчалась ця активність і в мембранах ендоплазматичного ретикулуму. Встановлено, що  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазна активність мембран ЕПР лімфоцитів крові при РЯ знижувалась в 1,5 рази ( $p < 0,001$ ), порівняно з практично здоровими особами.

Зниження  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазної активності плазматичної мембрани і мембран ЕПР лімфоцитів крові пацієнтів з РЯ свідчить про зростання  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  у цитозолі лімфоцитів.

$\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФаза, як і  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -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.

Залежність  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФазної активності від концентрації субстрату (АТФ) в інкубаційному середовищі визначається величиною константи афінності до субстрату ( $K_{\text{АТФ}}$ ). Її обчислювали визначаючи величину питомої  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФазної активності у середовищі інкубації, що містило субстрат в діапазоні концентрацій від 0,1 до 5 мМ (за сталої концентрації йонів  $\text{Ca}^{2+}$  – 0,05 мМ і йонів  $\text{Mg}^{2+}$  – 5 мМ).

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

Для визначення основних кінетичних параметрів гідролізу АТФ за участі  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФази мембран ЕПР лімфоцитів крові пацієнтів з РЯ та з'ясування можливого механізму зміни ензиматичної активності цих АТФ-гідролазних систем криві концентраційних залежностей лінеаризовано у координатах Лайнуівера-Берка.

Встановлено, що максимальна швидкість  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФазної реакції мембран ЕПР у пацієнтів з РЯ знижувалась щодо контрольних значень в 1,3 раза ( $p < 0,05$ ).

Водночас, значення константи афінності  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФаз до АТФ обох досліджуваних груп також статистично достовірно відрізнялись між собою, що свідчить про різну їх спорідненість до субстрату. Так, величина константи



афінності до АТФ  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФази мембран ЕПР лімфоцитів крові пацієнтів з РЯ у 2,15 раза перевищувала ці значення для лімфоцитів крові практично здорових осіб.

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  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -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 у пацієнток з РЯ 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 [139].

Для визначення оптимальних концентрацій субстратів для функціонування аргінази та з'ясування ряду кінетичних параметрів для ензиматичної реакції аргінази L-аргінін вносили в середовище інкубації в діапазоні концентрацій від 1 до 200 мМ (за сталої концентрації  $\text{Mn}^{2+}$  2 мМ). У всьому діапазоні досліджуваних концентрацій L-аргініну активність аргінази хворих на РЯ була підвищена у порівнянні з такою величиною в контрольній групі.

На основі лінеаризації отриманих даних у координатах Лайнуівера- Берка показаний змішаний тип інгібування активності ензиму та визначено основні кінетичні параметри гідролізу L-аргініну сапонін-пермеабілізованими лімфоцитами крові хворих на РЯ. Розрахунок кінетичних параметрів активності аргінази свідчить про те, що максимальна швидкість гідролізу L-аргініну сапонін-пермеабілізованими лімфоцитами хворих на РЯ, визначена за L-аргініном, зростає 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. Іншими дослідниками показано подібні результати спорідненості аргінази до субстрату [185, 194-196].

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.

Аналіз літературних даних свідчить про значну варіабельність абсолютних значень ензиматичної активності NOS лімфоцитів крові, що, ймовірно, обумовлено різноманітними методологічними підходами до вивчення активності ензиму.

Нами продемонстровано, що в лімфоцитах крові пацієток з РЯ активність cNOS знижується в 4,1 раза щодо контрольної групи ( $p < 0,001$ ).

Відомо, що cNOS продукує низькі концентрації NO, в той час як iNOS синтезує високі концентрації NO ( $> 300$  нМ) [90, 108, 110, 217].

Індуцибельна ізоформа NOS є кальцій-незалежною і, на відміну від конститутивної ізоформи NOS, не експресується постійно (конститутивно).

Встановлено, що активність iNOS лімфоцитів крові практично здорових жінок ідентифікується в незначній мірі, практично на межі похибки. На фоні інгібування cNOS у лімфоцитах крові пацієток з РЯ спостерігається різке зростання активності iNOS, в 155 раз ( $p < 0,001$ ).

Отримані нами результати вказують на порушення аргіназо-NO-синтазної системи лімфоцитів крові, що ведуть до дисбалансу регуляторних систем лімфоцитів, зокрема регуляторної функції NO. Зростання активності iNOS свідчить про гіперпродукцію NO в лімфоцитах крові за умов розвитку онкопатології. NO, 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 [113, 123, 260]. Показано, що клітини, в яких відмічено зростання концентрації NO мають підвищену швидкість росту [143].

Таким чином, зростання активності аргінази та iNOS лімфоцитів крові пацієнток з РЯ свідчить про загальну потребу клітин при пухлинному рості в L-аргініні.

З метою вивчення особливостей і механізму функціонування 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.).

Результати досліджень показали, що кінетичні криві утворення NO у процесі NO-синтазної реакції лімфоцитів крові мають тенденцію до насичення. Кінетика утворення NO, за участю cNOS 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.

Водночас, у всьому діапазоні фактора часу утворення NO за участю iNOS лімфоцитів крові хворих з РЯ значно перевищує ці величини для cNOS.

Шляхом лінеаризації отриманих даних у координатах  $P/t$  від  $P$  обчислено основні кінетичні характеристики NOS реакції лімфоцитів крові.

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 у лімфоцитах крові хворих на РЯ суттєво знижувалось, у 3,8 рази ( $p < 0,001$ ). Синтез NO за участю iNOS, яка активується при РЯ, відбувається значно інтенсивніше ніж за участю cNOS,  $V_0$  зростає в понад 200 разів.

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 в обох контрольних вікових групах він був практично однаковим, а при РЯ зростав в 1,4 рази ( $p < 0,05$ ).

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. 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  $K_{L-Arg}$ .

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. Максимальна активність cNOS лімфоцитів крові практично здорових осіб та iNOS лімфоцитів крові хворих на РЯ тестується за наявності 20 мкМ L-аргініну в інкубаційному середовищі. Активність cNOS лімфоцитів крові пацієнток з РЯ виходить на плато за значно нижчих концентрацій субстрату.

Шляхом лінеаризації отриманих концентраційних залежностей у координатах Лайнуівера-Берка визначено основні кінетичні параметри NOS лімфоцитів крові. 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  $K_{L-Arg}$  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 пацієток з РЯ характеризується значно вищою спорідненістю до L-аргініну: величина  $K_{L-Arg}$  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 дисметаболичні зміни в системі синтезу NO, а саме його гіперпродукцію.

Отримані результати наших досліджень та аналіз даних наукової літератури дозволяють запропонувати узагальнюючу схему, що ілюструє причинно-наслідкові зв'язки між порушеннями глутатіонової антиоксидантної,  $Ca^{2+}$ - та NO-регуляторних процесів у лімфоцитах крові пацієнтів з онкопатологією (рис. 6.1).

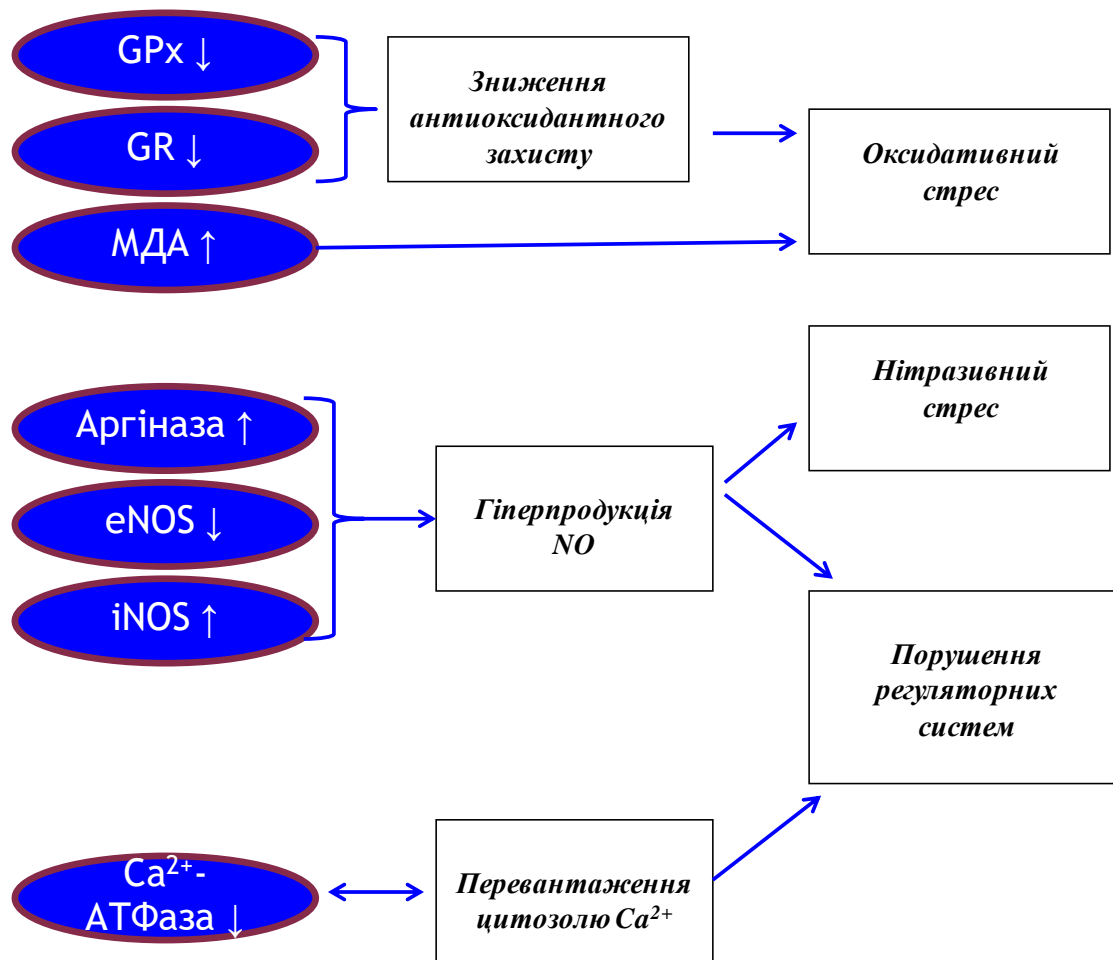


Рис. 6.1. Гіпотетична схема причинно-наслідкових зв'язків між порушеннями глутатіонової антиоксидантної,  $\text{Ca}^{2+}$ - та NO-регуляторних процесів у лімфоцитах крові пацієнтів із раком яєчника.

Із запропонованої схеми патобіохімічних процесів випливає, що у пацієнтів з РЯ в лімфоцитах крові активуються вільнорадикальні процеси, внаслідок чого розвивається оксидативний стрес, який проявляється у зростанні вмісту продуктів ліпопероксидації (МДА) та зниженні активності ензимів глутатіонової ланки антиоксидантного захисту (GP і GR).

Відомо, що оксидативний стрес тісно пов'язаний із нітразивним стресом, зумовленим гіперпродукцією NO. Останній зумовлений активацією iNOS та утворенням цитотоксичного пероксинітриду (продукту взаємодії NO і супер-оксид аніонного радикалу,  $(\text{NO} + \text{O}_2^- \rightarrow \text{ONOO}^-)$ ). Паралельно до активації iNOS компенсаторно знижується активність її конститутивної ізоформи.

Гіперпродукція агресивних АФК та активних форм азоту має мембранодеструктивну дію, яка проявляється у зниженні активностей  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФаз, що призводить до перевантаження цитоплазми йонами  $\text{Ca}^{2+}$ .

Гіперпродукція NO та його токсичні ефекти в надлишкових концентраціях є однією з найважливіших ланок в патогенезі цілого ряду захворювань. NO як поліфункціональний фізіологічний месенджер регулює функціональний стан клітин і залучений в складні патофізіологічні механізми онко- та канцерогенезу. У високих концентраціях NO ініціює процеси оксидативного стресу та нітрозивного стресу, які призводять до порушення прооксидантно-антиоксидантної рівноваги. Відомо, що зниження активності глутатіонпероксидази значно підвищує ризик виникнення онкологічних захворювань.

Крім того, пероксинітрит здатний безпосередньо ушкоджувати структуру ДНК, ліпідне оточення іонних каналів мембран клітин і впливати на їх функцію. Відомо, що порушення йонного гомеостазу призводить до інгібування дихального ланцюга мітохондрій, за рахунок чого відбувається додаткове посилене утворення активних форм Оксигену з наступним окисненням тіолових груп білків мітохондріальних мембран.

Механізм пригнічення гіперпродукції NO полягає у зростанні активності аргінази. Остання, конкуруючи з NO-синтазою, за спільний субстрат, яким є L-аргінін, знижує його біодоступність.

Отже, в лімфоцитах існує тісний функціональний зв'язок між  $\text{Ca}^{2+}$ -залежними АТФазними, аргіназа/NO-синтазою та прооксидантно-антиоксидантною системами лімфоцитів крові у пацієнтів з онкопатологією. Порушення функціональної активності однієї з систем призводить до дисбалансу інших.

## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі наведено теоретичне узагальнення та нове вирішення актуального наукового завдання щодо з'ясування особливостей функціонування в лімфоцитах крові  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-залежних гідролазних, аргіназо-NO-синтазної та глутатіонової антиоксидантної регуляторних систем і показників пухлинних маркерів при розвитку раку яєчника. Запропоновано модель, яка описує причинно-наслідковий зв'язок між гомеостазом  $\text{Ca}^{2+}$  та NO і дисфункцією ензиматичних систем лімфоцитів крові. В результаті вирішення наукового завдання зроблені наступні висновки:

1. Виявлено, що з розвитком раку яєчника (від I до IV стадії) зростає концентрація маркера СА-125 в сироватці крові з 4,1 до 79,8 раза щодо концентрації цього маркера у практично здорових жінок ( $p < 0,001$ ). Одночасно зростає співвідношення нейтрофілів до лімфоцитів з 2,0 до 2,9 та знижується активність мієлопероксидази у сироватці крові.

2. За визначенням концентрації малонового діальдегіду, при раку яєчника (III-IV стадія) виявлено достовірну активацію процесів пероксидації ліпідів, яка зростає щодо фізіологічної норми в 1,6 раза як в лімфоцитах, так і в сироватці крові ( $p < 0,001$ ). При цьому, при раку яєчника активність глутатіонпероксидази знижується в 1,6 раза ( $p < 0,001$ ), активність глутатіонредуктази – в 1,4 раза ( $p < 0,05$ ), а активність глутатіон-S трансферази зростає в 1,2 раза ( $p > 0,05$ ) щодо групи фізіологічної норми. Виявлено, що активність усіх ензимів в системі *in vitro* є  $\text{Ca}^{2+}$ -залежною.

3. У пацієнтів з раком яєчника (III і IV стадія)  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазна активність плазматичної мембрани лімфоцитів крові достовірно знижується щодо фізіологічної норми, в 1,6 та 1,8 раза, відповідно ( $p < 0,001$ ). На основі кінетичного аналізу з'ясовано, що інгібування активності досліджуваних ензиматичних систем відбувається як за рахунок зменшення числа обертів ензиму (максимальна швидкість гідролізу АТФ знижується), так і за рахунок



зниження афінності  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФаз до субстрату (константа спорідненості до АТФ зростає).

4. У пацієнтів з раком яєчника  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФазна активність мембран ендоплазматичного ретикулуму лімфоцитів крові достовірно знижувалась в 1,5 раза ( $p < 0,001$ ) порівняно з практично здоровими особами. Виявлено, що інгібування активності цієї АТФази відбувається як за рахунок зменшення числа обертів ензиму (максимальна швидкість гідролізу АТФ знижується), так і за рахунок зниження афінності  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФаз до субстрату (константа спорідненості до АТФ зростає).

5. Показано, що у пацієток з раком яєчника аргіназна активність лімфоцитів крові підвищується в 3,1 раза щодо фізіологічної норми ( $p < 0,001$ ). З'ясовано, що зростання активності ензиму відбувається за рахунок збільшення числа обертів ензиму (величина  $V_{max}$  зростає), хоча спорідненість субстрату до ензиму достовірно зменшується.

6. Хоча аргіназа є  $\text{Mn}^{2+}$ -залежним ензимом, виявлено, що додавання в інкубаційне середовище 0,5 мМ  $\text{Ca}^{2+}$  (оптимальна концентрація, що активує пероксидацію ліпідів) призводить до достовірного зростання активності аргінази в лімфоцитах як у контрольній групі, так і при раку яєчника – в 3,3 ( $p < 0,001$ ) і 1,2 ( $p < 0,05$ ) раза, відповідно.

7. В лімфоцитах крові пацієток із раком яєчника активність конститутивної ізоформи NO-синтази знижується в 4,1 раза щодо контрольної групи ( $p < 0,001$ ). На фоні інгібування cNOS у лімфоцитах крові пацієток з раком яєчника спостерігається різке зростання активності її індукцйбельної ізоформи, в 155 раз ( $p < 0,001$ ).

8. З'ясовано, що індукцйбельна ізоформа NO-синтази лімфоцитів крові пацієток з раком яєчника характеризується в 5,4 раза вищою спорідненістю до L-аргініну на відміну від конститутивної ізоформи ( $p < 0,001$ ), а інгібування активності cNOS відбувається за конкурентним типом – за рахунок зниження числа обертів ензиму.

9. При раку яєчника має місце зниження концентрації  $\text{NO}_2^-$  у сироватці крові в 1,5 раза ( $p < 0,01$ ) та зростання концентрації  $\text{NO}_3^-$  в 1,4 раза ( $p < 0,01$ ).

щодо фізіологічної норми. При раку яєчника зростає співвідношення  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  у 3,4 раза, в той час як у нормі це співвідношення становить 1,6 раза.

10. Запропонована гіпотетична модель, що ілюструє причинно-наслідкові зв'язки між порушеннями, прооксидантно-антиоксидантною,  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазних та аргіназа/NO-синтазної систем лімфоцитів крові у пацієнтів з онкопатологією. Встановлено, що зміни активностей досліджуваних ензиматичних систем та інших показників корелюють зі стадією розвитку раку яєчника, однак найчутливішим параметром розвитку хвороби були показники концентрації антигену СА-125, активності індукцибельної ізоформи NO-синтази та співвідношення  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ .

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Антонеева ИИ, Генинг ТП, Абакумова ТВ, и др. Алгоритм диагностики прогрессирующих форм рака яичников. Медицинский альманах. 2012;4(23):29-31.
2. Антонеева ИИ, Абакумова ТВ, Генинг ТП, и др. Модель уточняющей диагностики стадий рака яичников. Казанский мед. журн. 2012;93(5);108-112.
3. Беленічев ІФ, Левицький ЄЛ, Губський ЮІ, та ін. Антиоксидантна сиситема захисту організму. Сучасні пробл. Токсикол. 2002;3;8-19.
4. Бондарь ТН. Система L-аргинин/оксид азота и иммунитет. Эксперимент. і клінічна медицина. 2009;3;4-8.
5. Васильев АН, Красильников СС, Войцицкий ВЕ, и др. Онкомаркеры СА 125, НЕ 4 как предикторные факторы прогноза у больных с пограничными опухолями яичников. Сибирский онкологический журнал. 2015;1(4):39-44.
6. Владимиров ЮА. Свободные радикалы в биологических системах. Соросовский образовательный журн. 2000;6(12):13-19.
7. Вовчук ІЛ. Діагностичне та прогностичне значення визначення онкофетального антигена СА-125 за пухлинного процесу в яєчниках. Вісник ОНУ. Сер.: Біологія. 2014;19(1):19-32.
8. Воробьева ЛИ, Свиницкий ВС, Ткаля ЮГ. Гормональный канцерогенез и обоснование применения гормональной терапии в лечении больных раком яичника. Онкогинекология. 2013;1(9):56-64.
9. Воробйова ЛІ, Свенцицький ВС. Злоякісні пухлини яєчника: сучасні аспекти лікування. Здоров'я України. 2011;4(17):17-18.
10. Высоцкий ММ. Рак яичников. Новое в патогенезе sporadического рака яичников. Проблемы репродукции. 2011;2:25-29.
11. Гжегоцький МР, Заячківська ОС. Система крові. Фізіологічні та клінічні основи. Львів: Світ. 2001:173 с.
12. Давтян ТК, Аванесян ЛА. О взаимоотношении иммунного и адаптивного ответов. Успехи соврем. биол. 2001;121(3):275-286.
13. Данилович ЮВ. Взаимосвязь образования NO и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и их роль в регуляции ионного гомеостаза клеток. Укр. біохім. журн. 2001;73(3):5-21.

14. Данилович ГВ, Богач ТВ, Данилович ЮВ. Біосинтез оксиду азоту з L-аргініну. Особливості утворення та функціональна роль NO в мітохондріях. Ukr. Biochem. J. 2018;90(1);3-24.
15. Долгих ВТ, Злотов АН. Иммунопатология. М.: Медицина; 2020. 248 с.
16. Заридзе Д.Г. Канцерогенез. М.: Медицина; 2004. 574 с.
17. Заридзе ДГ, Максимович ДМ. Профилактика злокачественных новообразований. Успехи молекулярной онкологии. 2017;4(4);18-25.
18. Іваночко РБ, Білецька ЛП, Склярів ОЯ. Зміни показників системи L-аргінін–нітрогену оксид–аргіназа та оксидативних процесів у плазмі крові хворих з хронічною нирковою недостатністю до та після гемодіалізу. Експеримент. та клін. фізіол. і біохімія. 2014;1;66-70.
19. Карсєладзе АІ. Некоторые основополагающие понятия онкоморфологии в свете достижений современной молекулярной биологии. Архив патологии. 2009;5;17-20.
20. Кімакович ОВ. Підковка NO, Воробець ЗД. Дія кватеру та пірензепіну на активність транспортних АТФаз лімфоцитів периферійної крові. Практична медицина. 2004;10(2):86-89.
21. Кишко ТО, Шандрєнко СГ, Дмитренко НП. Аргинин: биологическое действие, влияние на синтез оксида азота. Журн. АМН України. 2008;14(1):150-158.
22. Комісаренко СВ. Молекулярні механізми активації лімфоцитів. Укр. біохім. журн. 2002;74(4):8.
23. Коноварт ОВ. Воробець ЗД. Вплив омепразолу на активність ферментів глутатіонової антиоксидантної системи лімфоцитів периферичної крові. Буковинський медичний вісник. 2004. 9(2):112-114.
24. Корнеєва ІА, Новикова ЕГ, Сергєєва НС. Современный взгляд на маркерный рецидив рака яичников. Рос. онкол. журн. 2010;2:54-77.
25. Костерин СА, Бурчинская НФ. Метод определения кинетических характеристик Ca<sup>2+</sup>-транспортирующих систем субклеточных структур гладких мышц. Укр. біохім. журн. 1987;59(2):66-69.
26. Костерін СО., Векліч ТО, Мазур ЮЮ. Mg<sup>2+</sup>-АТФ-залежна кальцієва помпа плазматичної мембрани гладком'язевих клітин. II. Регуляція активності. The Ukr.

Biochem. J. 2015;87(2):5-25.

27. Кочешкова НС, Воробець ЗД, Горчев ВФ, та ін. Вплив детергентів на ферментативну активність та ультраструктуру сперматозоїдів. Експерим. та клін. фізіологія і біохімія. 2007;37(2):24-29.
28. Лакин Г.Ф. Биометрия. – 4-е изд., перераб. и доп М.: Высшая школа; 1990. 352 с.
29. Лановенко П. Оксид азоту – універсальний регулятор клітинних функцій. Гематологія і переливання крові. 2008;2(34):227-234.
30. Лаповець Л, Луцик Б. Лабораторна імунологія. К.: Арал; 2004. 173 с.
31. Лебедева ВА, Пушкакрев СВ, Сафронов ИД, и др. Выраженность процессов перекисного окисления липидов и антиоксидантный потенциал у больных с распространенным раком яичников в динамике полихимиотерапии. Сибирский онкол. журн. 2007;2(22):42-45.
32. Лук'янова НЮ, Борікун ТВ, Базась ВМ, та ін. Циркулюючі мікроРНК: перспективи використання для ранньої діагностики та моніторингу перебігу пухлинного процесу. Онкологія. 2019;3:181-191.
33. Лук'янова НЮ, Юрченко ОВ, Свінціцький ВС, Чехун ВФ. Прогностичні молекулярні маркери у хворих на рак яєчника. Онкологія. 2006;3:241-244.
34. Лю МБ, Подобець ИС, Едыгенова АК. Активные формы кислорода и пероксигенация в инвазии и метастазировании неоплазм. Успехи современной биологии. 2004;124(4):329-341.
35. Меньщикова ЕБ. Окислительный стресс. М.: Слово; 2005. 556 с.
36. Меньщикова ЕБ, Зеньков ЕК. Современные подходы при анализе окислительного стресса, или как измерить неизмеримое. Бюллетень ВСНЦ СО РАНМ. 2016;1(3);174-180.
37. Моин М. Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах. Лаб. дело. 1986;12:72-77.
38. Остапченко ЛІ, Михайлик ІВ. Біологічні мембрани: методи дослідження структури та функцій. К.: ВПЦ «Київський університет»; 2006. 215 с.
39. Парижак СЯ, Якубець ОІ, Воробець ЗД. Маркери та регуляторні механізми при карциномі яєчника. Укр. Біохім. Ж. 2014;86(4):36-50.
40. Перетятко Ю, Сибірна НО. Особливості аргіназного та NO-синтазного шляхів

метаболізму L-аргініну в лейкоцитах периферичної крові щурів за хронічного рентгенівського опромінення. Укр. біохім. журн. 2009;81(2):40-48.

41. Раваєва МЮ, Чуян ЕН, Древетняк НА. Роль оксида азота в розвитку ендотеліальної дисфункції. Ученые записки Тавр. нац. универ. им. В.И. Вернадского. Серия Биология, Химия. 2013;26(65):147-157.
42. Рак в Україні, 2010-2011. Захворюваність, смертність, показники діяльності онкологічної служби. Бюлетень національного канцер-реєстру України. Київ, 2012:52-53.
43. Реутов ВП, Сорокіна ЕГ, Гоженко АИ, и др. Цикл оксида азота как механизм стабилизации содержания NO и продуктов его превращения в организме млекопитающих. Актуал. пробл. трансп. мед. 2008;1(11):222-228.
44. Рябцева ОД, Антіпова СВ, Лук'янова НЮ, та ін. Індивідуальний прогноз виживаності хворих з урахуванням проліферації та адгезії пухлинних клітин у хворих на серозний рак яєчника. Онкологія. 2014;16(1):27-32.
45. Рябцева ОД, Гардашнікова ГТ, Антіпова СВ, та ін. Молекулярний фенотип пухлинних клітин як потенційний маркер ризику розвитку рецидивів у хворих на серозний рак яєчника. Онкологія. 2014;16(2):97-101.
46. Садляк ОВ. Оксид азоту: деякі аспекти прояву біохімічних ефектів на органно-системному рівні. Медична та клінічна хімія. 2015;17(4):107-112.
47. Сенчук АЯ, Покровенко ОБ, Дмитриченко ЛМ. Діагностичне та прогностичне значення визначення СА-125 у хворих з поєднаною патологією ендометрію. Актуальні питання педіатрії, акушерства та гінекології. 2013;2:95-97.
48. Сергеева НС, Маршутіна НВ. Общие представления о серологических биомаркерах и их месте в онкологии. Практическая онкология. 2011;12(4):147-154.
49. Сергеева НС, Маршутіна НВ, Солохіна МП, и др. Современные представления о серологических опухолеассоциированных маркерах и их месте в онкологии. Успехи молекулярной онкологии. 2014;1(1):69-80.
50. Склярів ОЯ, Панасюк НБ, Джура ОР. Роль NOS-синтазної системи та процесів ліпопероксидації в цитопротекторних механізмах за умов ульцерогенного коліту. Експ. та клін. фізіол. і біохімія. 2009;1:38-44.

51. Склярова ВО. Стан системи L-аргінін-NO-синтаза-аргіназа у лімфоцитах периферійної крові жінок із загрозою переривання вагітності. Експеримент. та клін. фізіол. і біохімія. 2013;1:69-73.
52. Тимирбулатов СА, Селезнев ЕИ. Метод підвищення інтенсивності свободнорадикального окислення липидсодержащих компонентів крові и его діагностическое значеніе. Лаб. дело. 1988;4:209-211.
53. Ткаля ЮГ, Воробйова ЛІ. Свінціцький ВС, та ін. Особливості гормонального рецепторного статусу, експресії VEGF, HER2/neu в серозному раку і функціональних кістах яєчника. Гормональний гомеостаз у хворих із рецидивом серозного раку яєчника. Клінічна онкологія. 2014;4(16):181-190.
54. Ткаля ЮГ, Воробьова ЛІ, Свинцицкий ВС, та ін. Гіперпластичні процеси ендометрія у хворих зі зляжкісними пухлинами яєчника. Клінічна онкологія. 2016;1(21);37-42.
55. Тузеева АЮ, Долгова ДР, Абакумова ТВ, и др. Изучение про- и антиоксидантного статуса эритроцитов при прогрессировании экспериментального рака яичников. Фундаментальные исследования. 2014;12:145-149.
56. Фафула РВ, Єфремова УР, Мельник ОВ, Воробець ЗД, Кулачковський ОР. Методологічний підхід до вивчення ензиматичного спектру лімфоцитів при патологічних станах з використанням детергента сапоніну (ультраструктурне дослідження). Вісник проблем біології та медицини. 2012;4(96):163-166.
57. Франциянц ЕМ, Бандовкина В, Погорелова ЮА. Сравнительный анализ уровня половых гормонов, биогенных аминов и активности аминоксидаз в ткани злокачественной опухоли яичников и контралатеральном, непораженном органе. Междунар. журн. прикладных и фундаментальных исследований. 2014;2:49-51.
58. Чернобай АВ. Рак яичников: патогенез, диагностика, современные аспекты лечения. Вісник проблем біології і медицини. 2013;2(100):33-36.
59. Чернышова АЛ, Чуруксаева ОН. Роль опухолевого маркера СА-125 в выявлении рецидива рака яичников и определении тактики лечения. Сибирский онкол. журн. 2010;3(39):34-37.
60. Шугалей ВС, Козина АС. Содержание мочевины и активность аргиназы в

органах крыс при акклиматизации к холоду. Физиол. журн. СССР. 1977;8:1199-1202.

61. Якубець ОІ, Воробець ДЗ, Воробець ЗД, Гжегоцький МР. Антиоксидантний статус лімфоцитів крові практично здорових жінок різних вікових груп та хворих на рак яєчника. Вісник проблем біології та медицини. 2016;1(2):132-135.
62. Alkaitis MS, Crabtree MJ. Recoupling the cardiac nitric oxide synthases: tetrahydrobiopterin synthesis and recycling. *Curr. Heart. Fail. Rep.* 2012;9(3):200-210.
63. Anttila MA, Voutilainen K, Merivalo S, et al. Prognostic significance of iNOS in epithelial ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* 2007;105:97-103.
64. Aratani Y. Myeloperoxidase: its role of host defense, inflammation, and neutrophil function. *Arch. Biochem. Biophys.* 2018;640:57-2.
65. Ash DE. Structure and function of arginases. *J. Nurt.* 2004;134(27):60-64.
66. Baert T, Van Camp J, Vanbrabant L, et al. Gynecologic Oncology. Influence CA125, platelet count and neutrophil to lymphocyte ratio on the immune system of ovarian cancer patients. 2018;150(1):31-37.
67. Bandebuche S, Melinkeri RR. Oxidative stress and antioxidant status in patients of ovarian cancer. *Biomedical Research.* 2011;22(2):196-200.
68. Bansal V, Ochoa JB. Arginine availability, arginase, and the immune response. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 2003;6(2):223-228.
69. Barki TK. CA-125 blood test in early detection of ovarian cancer. *The Lancet Oncology.* 2015;16(6):PE269.
70. Barksdale AR, Bernard AC, Maley ME, et al. Regulation of arginase expression by T-helper II cytokines and isoproterenol. *Surgery.* 2004;135:527-535.
71. Barreta G. Oxidative stress and lipid peroxidation products in cancer progression and therapy. *Oncology.* 2012;10:137-141.
72. Bergner A, Huber RM. Regulation of the endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-store in cancer. *Anticancer Agents Med. Chem.* 2008;8(7):705-709.
73. Blachier F, Mignon A, Soubrane O. Polyamines inhibit lipopolysaccharide-induced nitric oxide synthase activity in rat liver cytosol. *Nitric oxide: biology and chemistry.* 2007;1(3):268-272.
74. Blachier F, Davila AM, Benamouzig R. Channeling of arginase in NO and polyamine



- pathways in colonocytes and consequences. *Frontiers in Bioscience (Landmark Ed.)*. 2011;16:1331-1343.
75. Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. *Nat. Immunol.* 2001;2:907- 916.
76. Bogdan C. Regulation of lymphocytes by nitric oxide. *Methods Mol. Biol.* 2011;677:375-393.
77. Bogdan C. Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: an update. *Trends in Immunology*. 2015;36(3):161-178.
78. Breier A, Sulova Z, Vrbanova A. Ca<sup>2+</sup>-induced inhibition of sodium pump: noncompetitive inhibition in respect of magnesium and sodium cations. *General. Physiol. Biophys.* 2008;17(2):179-188.
79. Bronte V, Serafini P, Mazzoni A, et al. L-arginine metabolism in myeloid cells controls T-lymphocyte functions. *Trends Immunol.* 2003;24(6):302-306.
80. Bryan NS. Nitric oxide enhancement strategies. *Future Sci.* 2015;1(1):48-53.
81. Bryan NS, Bian K, Murad F. Discovery of the nitric oxide signaling pathway and targets for drug development. *Frontiers in Bioscience*. 2009;14:1-18.
82. Buys SS, Partridge E, Black A, et al. Effect of screening on ovarian cancer mortality: the prostate, lung, colorectal and ovarian (PLCO) cancer screening randomized controlled trial. *JAMA*. 2011;305:2295-2303.
83. Caglayan A, Katlan DC, Tuncer ZS, et al. Impaired antioxidant enzyme functions with increased lipid peroxidation in epithelial ovarian cancer. *IUBMB Life*. 2017;69(10):802-813.
84. Calcerrada P, Peluffo G, Radi R. Nitric oxide-derived oxidants with a focus on peroxynitrite: molecular targets, cellular responses and therapeutic implications. *Curr. Pharm. Des.* 2011;17(35):3905-3932.
85. Cancer Incidence in Five Continents. IARC. [Интернет]; 2007. 897 p. Доступно на: <http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/epi/sp160/index.php>.
86. Capellero S, Erriquez J, Melano C, et al. Preclinical immunotherapy with cytokine-induced killer lymphocytes against epithelial ovarian cancer. *Scientific Reports*. 2020;10:6478-6488.
87. Capen CC. Mechanisms of hormonemediated carcinogenesis of the ovary. *Toxicol. Pathol.* 2004;32:1-5.

88. Caravia L, Staicu CE, Radu BM, et al. Altered organelle calcium transport in ovarian physiology and cancer. *Cancers (Basel)*. 2020;12(8):22-32.
89. Castilo-Tong D, Pils D, Heinze G, et al. Association of myeloperoxidase with ovarian cancer. *Tumor Biol*. 2014;35(1):141-148.
90. Chang C, Worley BL, Phaeton R, Hempel N. Extracellular glutathione peroxidase GPx3 and its role in cancer. *Cancers*. 2020;12:2197-2207.
91. Chaves FJ, Mansego ML, Blesa S. Inadequate cytoplasmic antioxidant enzymes response contributes to the oxidative stress in human hypertension. *Am. J. Hypertens*. 2007;20(1):62-69.
92. Choi KC, Kang SK, Tai CJ, et al. Follicle-stimulating hormone activates mitogen-activated protein kinase in preneoplastic and neoplastic ovarian surface epithelial cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 2002;87:2245-2253.
93. Choudhari SK, Chaudhari M, Bagde S, Gadbail AR, Joshi V. Nitric oxide and cancer: a review. *World J. Surg. Oncol*. 2013;11:118-124.
94. Christie M, Oehler M. Molecular pathology of epithelial ovarian cancer. *J. Brit. Menopause Soc*. 2016;12:57-63.
95. Chrzanowska A, Mielczarek-Putna M, Skwarek A, et al. Arginaza w surowicy krwi chorych z marskością i rakiem wątrobowo-komorkowym. *Wiad. Lek*. 2007;60:215-218.
96. Cibula D, Gompel A, Mueck AO, et al. Hormonal contraception and risk of cancer. *Human Reproduction Update*. 2010;16(6):631-650.
97. Cloke TE, Garvey L, Choi BS, et al. Increased level of arginase activity correlates with disease severity in HIV-seropositive patients. *J. Infect Dis*. 2010; 202(3):374-385.
98. Cui J, Miner BM, Eldredge JB. Regulation of gene expression in ovarian cancer cells by luteinizing hormone receptor expression and activation. *BMC Cancer*. 2011:280.
99. Cunat S, Hoffmann P, Pujo I. Estrogens and epithelial ovarian cancer. *Gynecol. Oncol*. 2004;94:25-32.
100. Dang D, Rao R. Calcium-ATPases: Gene disorders and dysregulation in cancer. *Biochim. Biophys. Acta*. 2016;1863(6):1344-1350.
101. Davies MJ, Hawkins CL. The role of myeloperoxidase in biomolecule modification, chronic inflammation, and disease. *Antioxidant and Redox Signaling*.

2020;32(13):957-981.

102. Duffy MJ. Tumor markers in clinical practice: a review focusing on common solid cancers. *Med. Princ. Pract.* 2013;22(1):4-11.
103. Durante W, Johnson FK, Johnson RA. Arginase: a critical regulator of nitric oxide synthesis and vascular function. *Clin Exp. Pharmacol. Physiol.* 2007;34(9):906-911.
104. Duska LR, Kohn EC. The new classification of ovarian, fallopian, and primary peritoneal cancer and their clinical implication. *ESMO.* 2017;28(8):8-12.
105. El-Sehemy A, Postovit L-M, Fu YX. Nitric oxide signaling in human ovarian cancer: A potential therapeutic target. *Nitric oxide.* 2016;54:30-37.
106. Ignarro LJ. Nitric oxide biology and pathobiology, 2<sup>nd</sup>. - Academic Press; 2010. 831 p.
107. Fathalla MF. Incessant ovulation and ovarian cancer – a hypothesis re-visited. *Facts Views Vis. Obgyn.* 2013;5(4):292-297.
108. Feske S. Calcium signalling in lymphocyte activation and disease. *Nature Reviews Immunology.* 2007;7:690-702.
109. Fletcher NM, Memaj I, Morris RT, Saed GM. Targeting myeloperoxidase enhances apoptosis in chemoresistant epithelial ovarian cancer cells by reversing s-nitrosylation of caspase-3. *Gynecologic Oncology.* 2018;149(1):166-171.
110. Forstermann U. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Pflügers Arch.* 2010;459(6):923-39.
111. Förstermann U. Janus-faced role of endothelial NO synthase in vascular disease: uncoupling of oxygen reduction from NO synthesis and its pharmacological reversal. *Biol. Chem.* 2006;387(12):1521-1533.
112. Forsterman U, Sessa WC. Nitric Oxide synthases: regulation and function. *Eur. Heart J.* 2012;33(7):829-837.
113. Feun L, M You, CJ Wu, et al. Arginine deprivation as a targeted therapy for cancer / L. Feun, // *Current Pharm. Design.* 2008;14:1049-1057.
114. Fukumura D. Nitric oxide and photobiology. Academic Press. Ed. L.J. Ignarro, B. Freeman; 2017. 434 p.
115. Fukumura D, Kashiwagi S, Jain R. Role of nitric oxide in tumor progression. *Nat. Rev. Cancer.* 2006;6(7):521-534.

116. Gasparri ML, Attar R, Palaia I, et al. Tumor infiltrating lymphocytes in ovarian cancer. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015;16(9):3635-8.
117. Gavalas NG, Karadimou AP. Hormone replacement therapy and the risk of epithelial ovarian carcinoma: a meta-analysis M.A. Dimopoulos and A.P. Bamias. Immune response in ovarian cancer: how is the immune system involved in prognosis and therapy: potential for treatment utilization. *Clin. Dev. Immunol.* 2010;79(1):603:615.
118. Gong J, Jiang H, Shu C, et al. Prognostic value of lymphocyte-to-monocyte ratio in ovarian cancer: a meta-analysis. *Journal of Ovarian Research.* 2019;12:51-56.
119. Gorodzanskaya EG, Larionova VB, Zubrikhina GN. Role of glutathione-dependent peroxidase in regulation of lipoperoxide utilization in malignant tumors. *Biochemistry.* 2001;66(2):221-224.
120. Greer JB, Howe HJ, Wingo PA, et al. Anthropometry and the risk of epithelial ovarian cancer. *Cancer.* 2010;126(10):2404-2415.
121. Hancock JT. The role of redox in signal transduction. *Methods Mol. Biol.* 2008;476:1-9.
122. Hankinson SE, Houghton C, Reeves KW, et al. Perineal powder use and risk of ovarian cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 2014;106(9):2813-2818.
123. Holan V, Pindjakova J, Krulova M, et al. Production of nitric oxide during graft rejection is regulated by the Th1/Th2 balance, the arginase activity, and L-arginine metabolism. *Transplantation.* 2006;81:1708-1715.
124. Howlander N, Noone AM, Krapcho M, et al. SEER Cancer statistics review, 1975-2010, National Cancer Institute. Bethesda, MD, based on november 2012 SEER data submission, posted to the SEER web site. [Интернет]; 2013. Available at [http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2010/](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2010/)
125. Hrabarova E, Juranek I, Soltes L. Pro-oxidative effect of peroxynitrite regarding biological systems: a special focus on high-molar-mass hyaluronan degradation. *Gen. Physiol. Biophys.* 2011;30(3):223-238.
126. Ignarro LJ. Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview. *J. Physiol. Pharmacol.* 2010;53:503-514.
127. Imyanitov EN. Ovarian cancer genome. *Methods Mol. Biol.* 2013;1049(3-7):978-

128. Keleti T. Fundamentals of enzymatic kinetics. Moscow: Mir; 1990. 350 p.
129. Kaynar H, Meral M, Turhan H. Glutathione peroxidase, glutathione-S-transferase, catalase, xanthine oxidase, Cu-Zn superoxide dismutase activities, total glutathione, nitric oxide, and malondialdehyde levels in erythrocytes of patients with small cell and non-small cell lung cancer. *Cancer Lett.* 2005;227 (2):133-139.
130. Kielbik M, Izabela Szulc-Kielbik I, Klink M. The potential role of iNOS in ovarian cancer progression and chemoresistance. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20(7):1751-1762.
131. Kim H, Ju W. The efficacy of systemic lymphadenectomy for overall survival in epithelial ovarian cancer; A systematic review and meta-analysis by KOGYMAG. *J. Clin. Oncol.* 2009;27 (abstr. E 16509).
132. Khalee IP, Gopal RM, Ramesh KB, et al. Study of oxidative stress and antioxidant status in ascitic patients with ovarian cancer in comparison to liver cirrosis patients. *Proteomics & Bioinformatics.* 2017;10(1):225-228.
133. Khalil TT, Ismael MA. Estimation of MDA and its correlation with homocysteine and antioxidant enzymes in ovarian cancer patients. *Indian J. of Forensic Medicine and Toxicology.* 2019;13(4):842-848.
134. Khan AA, Alsahli MA, Rahmani AH. Myeloperoxidase as an active disease biomarker: resent biochemical and pathological perspectives. *Med. Sci.* 2018;6(33):390-411.
135. Khatchapuridze K, Kardzaia S, Kekelidze N, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes influence on prognosis and outcome of ovarian cancer. *Translational and Clinical Medicine.* 2020;5(1):36-39.
136. Knutson KL, Karyampudi L, Lamichhane P, Preston C. Targeted immune therapy of ovarian cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2015;34(1):53-74.
137. Korhonen R, Kosonen O, Hamakainen M, Moilanen E. Nitric oxide-releasing compounds inhibit the production of interleukin-2, -4 and -10 in activated human lymphocytes. *Basic and Clinical Pharmacol. and Toxicol.* 2008;103(4):322-328.
138. Korhonen R, Lahti A, Kankaanranta H, et al. Nitric oxide production and signaling in inflammation. *Curr. Drug. Targets Inflamm. Allergy.* 2005;4(4):471-479.
139. Krishnan V, Berek JS, Dorigo O. Immunotherapy in ovarian cancer. *Curr. Probl.*

Cancer. 2017;41(1):48-63.

140. Kurman RJ, Shih IM. Pathogenesis of Ovarian Cancer: Lessons from morphology and molecular biology and their clinical implications. *Int. J. Gynec. Pathol.* 2009;133(11):1775-1781.
141. Kurman RJ, Shih IM. The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer: a proposed unifying theory. *Am. J. Surg. Pathol.* 2010; 34(3):433-443.
142. Landen CN Jr, Birrer MJ, Sood AK. Early events in the pathogenesis of epithelial ovarian cancer. *J. Clin. Oncol.* 2008;26:995-1005.
143. Lee W, Ko SY, Mohamed MS, Kenny HA, et al. Neutrophils facilitate ovarian cancer premetastatic niche formation in the omentum. *J. Exp. Med.* 2019;216(1):176-194.
144. Lengyel E. Ovarian cancer development and metastasis. *Am. J. Pathol.* 2010;177(3):1053-164.
145. Luiking YC, Engelen MP, Deutz NE. Regulation of nitric oxide production in health and disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2010;13(1);97-104.
146. Lukanova A, Kaaks R. Endogenous hormones and ovarian cancer: epidemiology and current hypotheses. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2005;14(1):98-107.
147. Ma X, Wang Y, Zhang X, et al. Ovarian cancer presenting with hypercalcemia: two cases with similar manifestations but different mechanisms. *Cancer Biol. Med.* 2018;15(2):182-187.
148. Maleki J, Nourbahsh M, Shabani M, Korani M, Nourazarian SM, et al. 17 $\beta$ -Estradiol stimulates generation of reactive species oxygen and reactive oxide in ovarian adenocarcinoma cells (OVCAR 3). *Intern. J. of Cancer Management.* 2015;8(3):23-32.
149. Mannervik B. Glutathion peroxidase. *Meth. Enzym.* 1991;77:490-495.
150. Mannick JB. Immunoregulatory and antimicrobial effects of nitrogen oxides. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 2006;3:161-165.
151. Markman M, Webster K, Zanotti K. Examples of the marked variability in the relationship between the serum CA-125 antigen level and cancer-related symptoms in ovarian cancer. *Gyn. Onc.* 2004;93(3):715-717.
152. Mayyas FA, Al-Jarrah MI, Ibrahim KS, et al. Level and significance of plasma myeloperoxidase and the neutrophil to lymphocyte ratio in patients with coronary

- artery disease. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2014;17;1951-1957.
153. Michel T, Igarashi J, Greif D. The regulation and pharmacology of endothelial nitric oxide synthase. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2006;46:235-246.
  154. Mielczarek-Puta M, Chrzanowska A, Bara E, et al. New insights into arginase. Part I. Structure and characteristics. *Postepy Hig Med Dosw.* 2008;62:206-213.
  155. Mielczarek-Puta M, Chrzanowska A, Grabo E, et al. New insights into arginase. Part II. Role in physiology and pathology. *Postepy Hig Med Dosw.* 2008;62:214-221.
  156. Molina R, Escudero JM., Auge JM, et al. HE4 a novel tumour marker for ovarian cancer: comparison on with CA-125 and ROMA algorithm in patients with gynaecological diseases. *Tumor. Biol.* 2011;32(6):1087-1095.
  157. Moncada S, Higgs EA. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *Br. J. Pharmacol.* 2006;47(1):193-201.
  158. Monteith GR, Andrew DM, Faddy HM, Roberts-Thomson SJ. Calcium and cancer: targeting Ca<sup>2+</sup> transport. *Natural Reviews Cancer.* 2007;7:519-530.
  159. Monteith GR, Davis F, Roberts-Thomson SJ. Calcium channels and pumps: Changes and consequences. *J. Biol. Chem.* 2012;287(38):3166-3173.
  160. Monteith GR, Prevaskaya N, Roberts-Thomson SJ. The calcium-cancer signalling nexus. *Natural Reviews Cancer.* 2017;17:367-380.
  161. Mori M. Regulation of nitric oxide synthesis and apoptosis by arginase and arginine recycling. *J. Nutr.* 2007;137(6):1616-20.
  162. Morris SMJr. Arginine metabolism: boundaries of our knowledge. *J. Nutr.* 2007;137(6):1602-9.
  163. Munder M, Rath M, Muller I, et al. Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: two competing arginine pathways im macrophages. *Front. Immunol.* 2014;5:532-535.
  164. Munstedt K, Oskay-Oezcelik G, du Bois A, et al. What do patients think about CA-125 monitoring in the follow-up- results from a multicener trial in 1,060 patients with ovarian cancer. *J. Clin. Oncol.* 2009;27:5522.
  165. Muntane J, Le la Mata M. Nitric oxide and cancer. *World J. Hepatol.* 2010. 2(9):337-344.
  166. Napoli C, Ignarro LJ. Nitric oxide and pathogenetic mechanisms involment in the

- development of vascular diseases. *Archives of Pharm. Res.* 2009;32(8):1103-1108.
167. Nomelini RS, Chiovato AF, Abdulmassih FB, et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio and platelet count as prognostic factors in ovarian malignancies. *J. Cancer Research and Therapeutics.* 2019;15(6):1226-1230.
168. Nomelini R, Ribeiro L, Tavares-Murta B, et al. Production of nitric oxide and expression of inducible nitric oxide synthase in ovarian cystic tumors. *Mediators Inflamm.* 2008;10:1-7.
169. Ochoa A, Zea H, Hernandez C, et al. Arginase, Prostaglandins, and Myeloid-Derived Suppressor Cells in Renal Cell Carcinoma. *Clinical Cancer Research* January. 2007;13:721-726.
170. Okada SS, de Oliveira EM, de Araujo TH, et al. Myeloperoxidase in human peripheral blood lymphocytes: production and subcellular localization. *Cell Immunol.* 2016;300:18-25.
171. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev.* 2007;87:315-324.
172. Padanyi R, Paszty K, Varga K, et al. Multifaceted plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  pumps: From structure to intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  handling and cancer. *Biochim. Biophys. Acta.* 2016;1863(6):1351-1363.
173. Papp B, Brouland JP, Arbabian A, et al. Endoplasmic reticulum calcium pumps and cancer cell differentiation. *Biomolecules.* 2012;2(1):165-186.
174. Pepin K, del Carmen M, Brown A, et al. CA 125 and epithelial ovarian cancer: Role of screening, diagnosis, and surveillance. *The American J. of Hematology/Oncology.* 2014;10(6):22-99.
175. Peranzoni E, Marigo I, Dolcetti L, et al. Role of arginine metabolism in immunity and immunopathology. *Immunobiology.* 2007;212(9-10):795-812.
176. Peters AA, Milevskiy MJ, Lee WC, et al. The calcium pump plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 2 (PMCA2) regulates breast cancer cell proliferation and sensitivity to doxorubicin. *Scientific TReports.* 2016;6:25505-17.
177. Pinto MC, Kihara AH, Goulart VA, et al. Calcium signaling and cell proliferation. *Cellular Signaling.* 2015;27(11):2139-2149.
178. Pirkmajer S, Chibalin AV. NO turns on Na,K-ATPase in skeletal muscle. *Acta*



Physiol. 2016;216(4):386-391.

179. Popovic PJ, Zeh HJ, Ochoa JB. Arginine and Immunity. *The J. of Nutr.* 2007;137:1687-92.
180. Rajasekaran SA, Huynh TP, Wolle DG, et al. Na, K-ATPase subunits as markers for epithelial-mesenchymal transition in cancer and fibrosis. *Mol. Cancer Ther.* 2010;6:1515-1524.
181. Ray RM, Bavaria M, Johnson LR. Interaction of polyamines and mTOR signaling in the synthesis of antizyme (AZ). *Cell Signal.* 2015;27(9):1850-1859.
182. Ridnour R, Thomas D, Donzelli S. The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling. *Free Radic. Biol. Med.* 2008;45(1):18-31.
183. Rong Y, Li L. Early clearance of serum HE4 and CA125 in predicting platinum sensitivity and prognosis in epithelial ovarian cancer. *Journal of Ovarian Research.* 2021;14:6-11.
184. Roszak A, Lutkowska A, Lianeri M, et al. Involvement of myeloperoxidase gene polymorphism 463G>A in development of cervical squamous cell carcinoma. *Int. J. Biol. Markers.* 2016;31(4):440-445.
185. Saed GM, Ali-Fehmi R, Jiang ZL, et al. Myeloperoxidase serves as a redox switch that regulates apoptosis in epithelial ovarian cancer. *Gynecologic Oncology.* 2010;116(2):276-281.
186. Saed GM, Jiang Z, Diamond MP, Abu-Soud HM. The role of myeloperoxidase in the pathogenesis of postoperative adhesion. *Augusta University.* 2009;17(9):531-539.
187. Saluja R, Jyoti A, Chatterjee M. Molecular and biochemical characterization nitric oxide synthase isoforms and their intracellular distribution in human peripheral blood mononuclear cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 2011;1813(10):1700-1707.
188. Santos ND, Jammal MP, Silveira TP, et al. Stromal IL2 is related to the neutrophil/lymphocyte ratio in epithelial ovarian cancer. *Pathologica.* 2019;111(2):62-66.
189. Scholler N, Urban N. CA125 in Ovarian Cancer. *Biomarkers in Medicine.* 2007;1(4):513-523.
190. Schwartz GG, Skinner HG, A prospective study of total and ionized serum calcium and time to fatal prostate cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention.*

2012;21(10):1768-1773.

191. Schwartz GG, Trefti S, Klug MG, Robsahm TE. Woman who develop ovarian cancer show an increase in serum calcium and a decrease in serum albumin. A longitudinal study in the Janus Serum Bank Cohort. *Gynecologic Oncology*. 2020;159(1):264-269.
192. Siddique YH, Ara G, Afzal M. Estimation of lipid peroxidation induced by hydrogen peroxide in cultured human lymphocytes. *Dose Response*. 2012;10(1):1-10.
193. Siegel KL, Bray F, Khan AN, et al. Global cancer statistics. *CA Cancer J. Clin*. 2011;61:69-90.
194. Singel KL, Emmons TR, Khan AN, et al. Mature neutrophils suppress T cell immunity in ovarian cancer microenvironment. *JCI*. 2019;4(5):e122311.
195. Shin AJ, Menzin A, Whyte J, et al. Identification of grade and origin specific cell population in serous epithelial ovarian cancer. *PLoS One*. 2018;13(11):785-791.
196. Smith ER, Xu XX. Ovarian ageing, follicle depletion, and cancer: a hypothesis for the etiology of epithelial ovarian cancer involving follicle depletion. *Lancet Oncol*. 2008;9:1108-1111.
197. Somasundaram V, Nadhal R, Hemalatha SR, Sengodan SK, Srinivas P. Nitric oxide and reactive oxygen species: clues to target oxidative damage repair defective breast cancer. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2016;101:184-192.
198. Song X, Li Z, Zhang D. Calcium intake and the risk of ovarian cancer: a meta-analysis. *Nutrients*. 2017;9(7):679-684.
199. Sritangos P, Alarson EP, James AD, et al. Plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase isoform 4 (PMCA4) has an important role in numerous hallmarks of pancreatic cancer. *Cancers*. 2020;12(218);1-22.
200. Stafford N, Wilson S, Oceandy D, et al. The plasma membrane calcium ATPases and their role as major new players in human disease. *Physiol. Rev*. 2017;97:1089-1125.
201. Strzepa A, Pridchard KA, Dittel BN. Myeloperoxidase: a new player in autoimmunity. *Cell Immunol*. 2017;317:1-8.
202. Suer Gokmen, Kazezoglu C, Aytit YCA, et al. Arginase and ornithine in human benign and malignant skin tumors. *Turk J. Biochem. Com*. 2010; 35(4):319-324.

203. Szabó S, Ischiropoulos H, Radi R. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nature Reviews*. 2007;6:662-680.
204. Trabert B, Tworoger SS, O'Brien KM, et al. The risk of ovarian cancer increases with an increase in the lifetime number of ovulatory cycles: an analysis from the ovarian cancer cohort consortium (OC3). *Cancer Res*. 2020;80(5):1210-1218.
205. Trentini A, Rosta V, Spadaro S, et al. Development, optimization and validation of an absolute specific assay of active myeloperoxidase (MPO) and its application in a clinical context: role of MPO specific activity in coronary artery disease. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2020;58(10):1749-1758.
206. Tomsova M, Melichar B, Sedlakova I, Steiner I. Prognostic significance of CD3+ tumor-infiltrating lymphocytes in ovarian carcinoma. *Gynecol. Oncol*. 2008;108(2):415-420.
207. Vahora H, Khan MA, Alalami U, Hussain A. The potential role of nitric oxide in halting cancer progression through chemoprevention. *J. of Cancer prevention*. 2016;21:1-12.
208. Vang R, Shih IM, Kurman RJ. Ovarian low-grade and high-grade serous carcinoma: pathogenesis, clinicopathologic and molecular biologic features, and diagnostic problems. *Adv. Anat. Pathol*. 2009;16(5):267-282.
209. Vannini F, Kashfi K, Nath N. The dual role of iNOS in cancer. *Redox Biol*. 2015;6:334-43.
210. Vorobets Z, Kimakovich O. Effect of proton pump blocker on enzyme activity of glutathione antioxidant system of the peripheral blood lymphocytes. *Annales Universitatis Mariae-Sklodowska*. 2006. 19(1): 131-134.
211. Williams KA, Labidi-Galy SI, Terry KL, et al. Prognostic significance and predictors of the neutrophil-to-lymphocyte ratio in ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*. 2014;132(3):542-550.
212. Wu G, Bazer FW, Davis TA, et al. Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease. *Amino Acids*. 2009;37(1):153-168.
213. Wu G, Bazer FW, Cudd TA, et al. Pharmacokinetics and safety of arginine supplementation in animals. *J. Nutr*. 2007;137(6):1673-1680.
214. Yu H-G, McLaughlin S, Newmen M, et al. Altering calcium influx for selective

destruction of breast tumor. *BMC Cancer*. 2017;17:1691-73.

215. Zeleznik O, Eliassen AH, Rraft P, et al. A prospective analysis of circulation plasma metabolites associated with ovarian cancer risk. *Cancer Res*. 2020;80(6):1357-1367.
216. Zhang H, Huo Q, Huang L, et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio in ovarian cancer patients with low CA125 concentration. *Bio Med Research International*. 2019;2019:1-7.
217. Zhang AW, McPherson A, Milne K, et al. Interfaces of malignant and immunologic clonal dynamics in ovarian cancer. *Cell*. 2018;173:1755-1769.
218. Zhao Y-J, Xu Ch-Q, Zhang W-H. Role of polyamines in myocardial ischemia/reperfusion injury and their interactions with nitric oxide. *European J. Pharmacol*. 2012;562(3):236-246.
219. Zheng H, Kavanagh J, Hu W, et al. Hormonal therapy in ovarian cancer. *Int. J. Gynecol. Cancer*. 2007;17(2):325-338.
220. Zhao G, Cardenas H, Matei D. Ovarian cancer – why lipids matter. *Cancers (Basel)*. 2019;11(12):1870-7.
221. Zreik T, Ayoub M, Hannoun A. Fertility drugs and risk of ovarian cancer: dispelling the myth. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol*. 2008;20(3):313-319.