

Нарушение сопряженного транспорта Ca^{2+} , K^+ и H^+ в лимфоцитах человека при опухолевом росте

С.С.Гамбаров, Т.А. Гюльбаязян, С.С. Арутюнян, А.В. Акопян

ЕрГМУ им. М. Герац, кафедра клинической иммунологии и аллергологии
375025 Ереван, ул. Корюна, 2

Ключевые слова: лимфоцит, канал, ионофор, пропранолол, ионтранспортирующие системы, опухоль

Неорганические ионы Ca^{2+} , K^+ , H^+ , Na^+ и системы их транспорта играют важную роль в активации и функционировании клеток различного происхождения, в частности лимфоцитов. Нарушение функции лимфоцитов при тех или иных патологических процессах, вероятно, во многом определяется изменением транспорта именно ионов Ca^{2+} , K^+ , H^+ и Na^+ [3].

Проблема злокачественных новообразований — одна из злободневных проблем современной медицины. Известно, что одной из главных причин возникновения и развития опухолевого процесса является нарушение иммунологического гомеостаза [4]. Степень развития опухолевого процесса отчетливо коррелирует с уровнем иммунной дисфункции, вероятно, во многом определяемой повреждением мембран иммунокомпетентных клеток и нарушением в них транспорта ионов, что диктует необходимость использования характеристик ионтранспортирующих систем лимфоцитов в качестве критериев прогнозирования эффективности проводимого лечения. В этом аспекте особую значимость приобретает изучение сопряженного транспорта Ca^{2+} , K^+ и H^+ в лимфоцитах периферической крови и регионарных лимфатических узлов при опухолевом росте.

Материал и методы

Обследовались больные с немелкоклеточным раком легких (аденокарцинома, эпидермоидная карцинома, крупноклеточная карцинома). До и после оперативного вмешательства, проведенного на III стадии развития заболевания ($\text{T}_3\text{N}_2\text{M}_0$), больные консервативного лечения не получали. Контрольную группу составили здоровые лица, а также лица, перенесшие оперативное вмешательство по поводу спонтанного пневмоторакса.

Лимфоциты из периферической крови человека выделялись методом седиментации клеток в одноступенчатом градиенте фиколл-верографин [2], основанном на свойстве клеточных элементов крови разделяться благодаря различной плотности. Грудные лимфатические узлы, полученные сразу после оперативного вмешательства, измельчали в среде RPMI 1640, затем взвесь пропускали через иглу для переливания крови (с помощью шприца), и полученную суспензию клеток фильтровали через нержавеющее сито. Взвесь клеток промывали центрифугированием. Далее лимфоциты выделялись в одноступенчатом градиенте фиколл-верографин.

Транспорт ионов K^+ и H^+ через мембрану лимфоцитов изучался потенциометрическим методом, основанном на измерении ЭДС гальванического элемента, с помощью K^+ -и H^+ -селективных электродов. Концентрацию ионов H^+ определяли стеклянным водородным электродом. Концентрацию ионов K^+ регистрировали с помощью стеклянного K^+ -селективного электрода марки NAS 2704.

Для определения Ca^{2+} -независимого и Ca^{2+} -зависимого выхода K^+ из лимфоцитов плотный осадок лимфоцитов суспендировали и добавляли в инкубационную ячейку объемом 1 мл. Инкубация клеток проводилась при непрерывном размешивании на магнитной мешалке ММ-3М. Добавление протонофора ClCCP при определенных условиях приводило к выходу K^+ и входу H^+ . Для определения Ca^{2+} -зависимого выхода K^+ в среде присутствовал CaCl_2 .

Наличие достоверной связи между отсутствием восстановления Ca^{2+} -зависимого K^+/H^+ -обмена после оперативного вмешательства по поводу опухолевого процесса и летальностью было показано с помощью критерия χ^2 для оценки связи, исходя из таблицы взаимной сопряженности 2×2 (четырёхпольной таблицы) [1].

Результаты и обсуждение

Был исследован сопряженный транспорт ионов Ca^{2+} , K^+ и H^+ в лимфоцитах периферической крови и регионарных лимфатических узлов больных, страдающих немелкоклеточным раком легких.

Лимфоциты лимфатических узлов у лиц контрольной группы (удаленных при спонтанном пневмотораксе) инкубировали в ячейке с безбуферной холинхлоридной средой в течение 3–4 минут, pH суспензии при этом устанавливалось в пределах 6,3–6,8. Для определения pH внутри лимфоцитов (pHi) в ячейку добавляли сапонин (в конечной концентрации 0,01 %), вызывающий лизис клеток. Так как лимфоциты были инкубированы в безбуферной среде, то после добавления сапонины pHi соответствовало pH суспензии и, по результатам экспериментов, равнялось $7,0 \pm 0,05$. При данных условиях трансмембранный градиент pH ($\Delta \text{pH} = \text{pH}_{\text{ex}} - \text{pH}_{\text{i}}$) отрицателен и варьирует в пределах 0,2–0,7 единиц pH. Добавление 18 мкМ

протонофора СИССР приводит к резкому входу ионов H^+ и выходу K^+ из лимфоцитов со скоростью $1,2 \text{ нмоль } \text{K}^+/\text{мин} \times 10^6 \text{ клеток}$. Добавление переносчика ионов K^+ валиномицина после 15-минутной инкубации вызвало небольшой дополнительный выход K^+ и вход H^+ . Стехиометрия обмена составила 1,3–1,4 ($n=6$).

Условно назовем индуцированный протонофором в отсутствие внеклеточного Ca^{2+} K^+/H^+ -обмен Ca^{2+} -независимым.

При инкубации лимфоцитов регионарных лимфатических узлов больных немелкоклеточным раком легкого в безбуферной среде с pH 6,3–6,7 при добавлении СИССР (18 мкМ), в отличие от контроля (лимфоцитов лимфатических узлов при спонтанном пневмотораксе), регистрировался слабый вход H^+ и малозаметный выход K^+ (рис.1).

Таким образом, в лимфоцитах региональных лимфатических узлов больных немелкоклеточным раком легкого нарушается K^+/H^+ обмен.

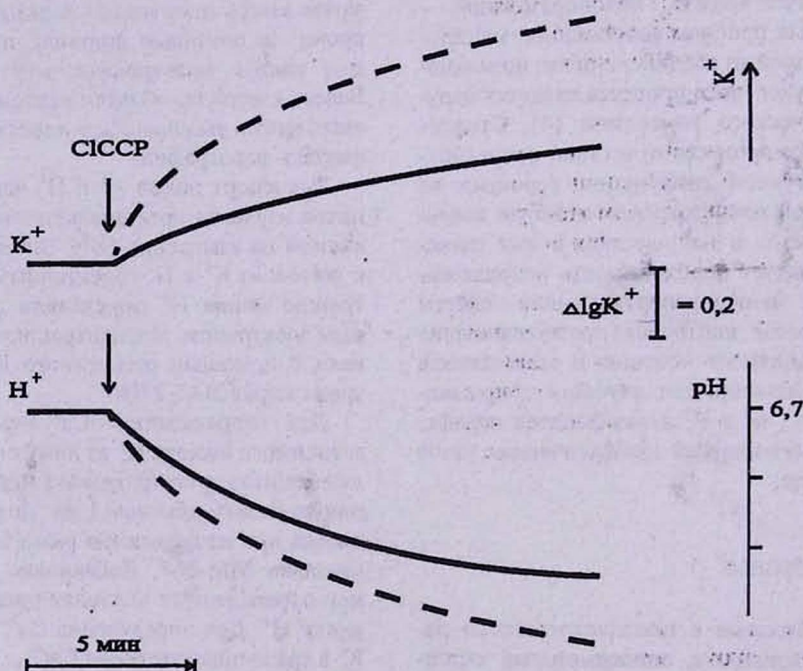


Рис 1. СИССР-индуцированный выход K^+ и вход H^+ в лимфоцитах лимфатических узлов при опухолевом росте ($50 \times 10^6/\text{мл}$). Среда инкубации содержит 150 мМ холина хлорида и 0,1 мМ KCl. pH суспензии – 6,7. Добавлено 18 мкМ СИССР. Пунктирная линия – контроль (лимфоциты лимфатических узлов при спонтанном пневмотораксе).

Известно, что ионофор A23187, а также β -блокатор пропранолол повышают уровень Ca^{2+} в цитозоле.

При pH 7,1–7,2 добавление A23187 или CICCР к лимфоцитам, инкубированным в присутствии ионов Ca^{2+} в среде, не вызывает существенного выхода ионов K^+ и входа H^+ . Однако при таких же условиях добавление A23187 к лимфоцитам, инкубированным с CICCР, резко усиливает слабый K^+/H^+ -обмен, индуцированный протонофором. Совместное действие ионофора и протонофора приводит к K^+/H^+ -обмену со стехиометрией 1,1–1,2 ($n=5$). В данном случае активация K^+/H^+ -обмена есть результат увеличения концентрации ионов Ca^{2+} в лимфоцитах, опосредованного кальциевым ионофором A 23187.

При инкубации лимфоцитов в присутствии ионов Ca^{2+} в среде с pH 7,8–7,9 0,4 мМ пропранолола вызывает выход ионов K^+ из клеток (Ca^{2+} -зависимый). При pH суспензии 7,1–7,2 эффект движения ионов при добавлении пропранолола был незначительный. Незначительный K^+/H^+ -обмен, индуцированный прото-

нофором в лимфоцитах, инкубированных в присутствии ионов Ca^{2+} при pH 7,2–7,6, резко усиливается при добавлении A23187 пропранолола, и стехиометрия обмена составляет 1,05–1,15.

К лимфоцитам в тех же условиях сначала добавляли пропранолол, затем CICCР, при этом имел место резкий K^+/H^+ -обмен. В безкальциевой среде инкубации пропранолол не воздействовал на движение ионов в лимфоцитах.

Наши эксперименты показали, что повышение концентрации Ca^{2+} в цитозоле, вызванное пропранололом и A23187, приводит к активации K^+/H^+ -обмена, который мы назвали Ca^{2+} -зависимым.

При инкубации лимфоцитов лимфоузлов больных немелкоклеточным раком легкого в присутствии 1 мМ CaCl_2 при pH 7,0–7,4 последующее добавление протонофора и ионофора A23187 или пропранолола вызвало незначительный, по сравнению с контролем, вход H^+ и выход K^+ (рис.2).

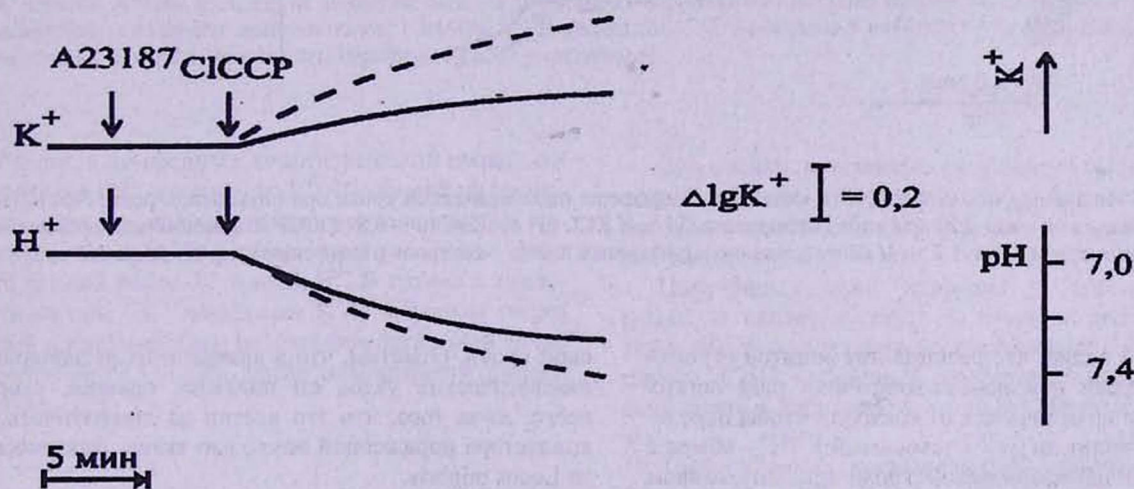


Рис.2. Влияние A23187 и CICCР на перераспределение ионов в лимфоцитах лимфатических узлов при опухолевом росте ($50 \times 10^6/\text{мл}$). Среда инкубации содержит 150 мМ холина хлорида, 0,1 мМ KCl и дополнительно 1 мМ CaCl_2 . A23187 и CICCР добавлены в конечной концентрации 5 и 18 мкМ соответственно. Пунктирная линия – контроль (лимфоциты из лимфатических узлов при спонтанном пневмотораксе).

Следовательно, в лимфоцитах регионарных лимфатических узлов при опухолевом росте нарушается и Ca^{2+} -зависимый K^+/H^+ обмен.

При добавлении протонатора СССР к инкубированным в безбуферной среде с рН 6,8 лимфоцитам

периферической крови больных, страдающих немелкоклеточным раком легких, наблюдался вход ионов H^+ и выход K^+ . Последующее внесение валиномицина (1,2 мкМ) вызвало незначительный дополнительный выход K^+ и вход ионов H^+ (рис.3).

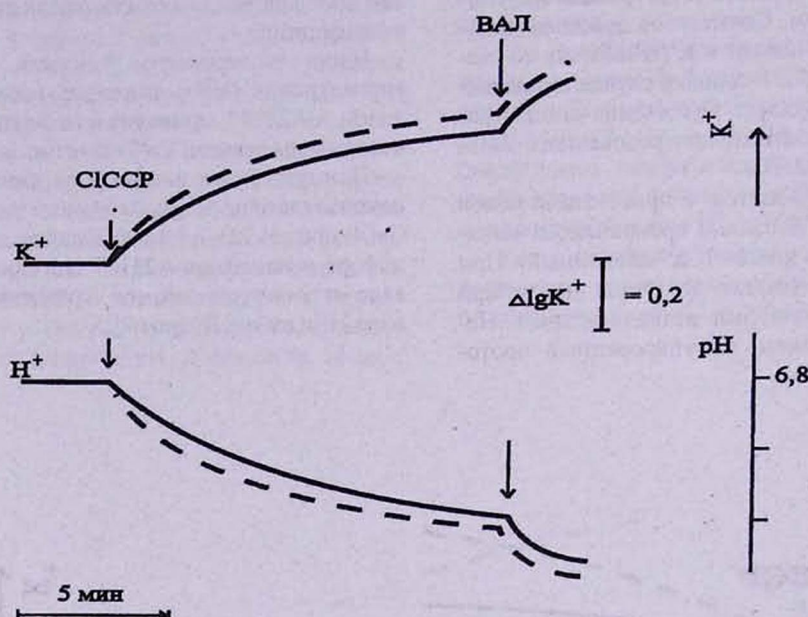


Рис.3. СССР-индуцированный выход K^+ и вход H^+ в лимфоцитах периферической крови при опухолевом росте ($40 \times 10^6/\text{мл}$). Среда инкубации содержит 150 мМ холина хлорида и 0,1 мМ КСl. рН суспензии — 6,8. СССР и валиномицин добавлены в конечной концентрации 18 и 1,2 мкМ соответственно. Пунктирная линия — контроль (лимфоциты периферической крови донора).

Из рис. 3 видно, что реакция лимфоцитов периферической крови при немелкоклеточном раке легких практически не отличалась от контроля. Чтобы определить, происходит ли Ca^{2+} -зависимый K^+/H^+ -обмен в лимфоцитах периферической крови при опухолевом росте, мы инкубировали клетки в стандартной холинхлоридной среде, содержащей 1 мМ CaCl_2 с рН 7,0–7,1 и добавили ионофор А23187 и протонатор: наблюдался слабый выход K^+ и вход H^+ , по сравнению с контролем — лимфоцитами периферической крови доноров (рис.4). Добавление протонатора и пропранолола к лимфоцитам, инкубированным в Ca^{2+} -содержащей среде с рН 7,0–7,1, вызывало слабый выход K^+ и вход H^+ по сравнению с контролем.

Таким образом, нами установлено, что при опухолевом росте Ca^{2+} -независимый K^+/H^+ -обмен угнетен в лимфоцитах регионарных лимфатических узлов, а Ca^{2+} -зависимый K^+/H^+ -обмен подавлен как в лимфоцитах регионарных лимфоузлов, так и перифериче-

ской крови. Отметим, что в лимфоцитах регионарных лимфатических узлов он подавлен сильнее, скорее всего, из-за того, что это клетки из лимфатического коллектора пораженной опухолью ткани, фактически, из Locus minoris.

У лиц, перенесших оперативное вмешательство по поводу немелкоклеточного рака легких, через 45 дней после операции в лимфоцитах периферической крови мы проверили активность Ca^{2+} -зависимого K^+/H^+ -обмена.

При инкубации лимфоцитов в среде, содержащей ионы Ca^{2+} при рН 7,1–7,3 при добавлении пропранолола и протонатора у 15 из 20 обследованных лиц регистрировался выраженный K^+/H^+ -обмен, то есть Ca^{2+} -зависимый K^+/H^+ -обмен был восстановлен. При индуцировании Ca^{2+} -зависимого K^+/H^+ -обмена совместным воздействием на лимфоциты протонатора и ионофора А23187 также наблюдалось восстановление Ca^{2+} -зависимого K^+/H^+ -обмена.

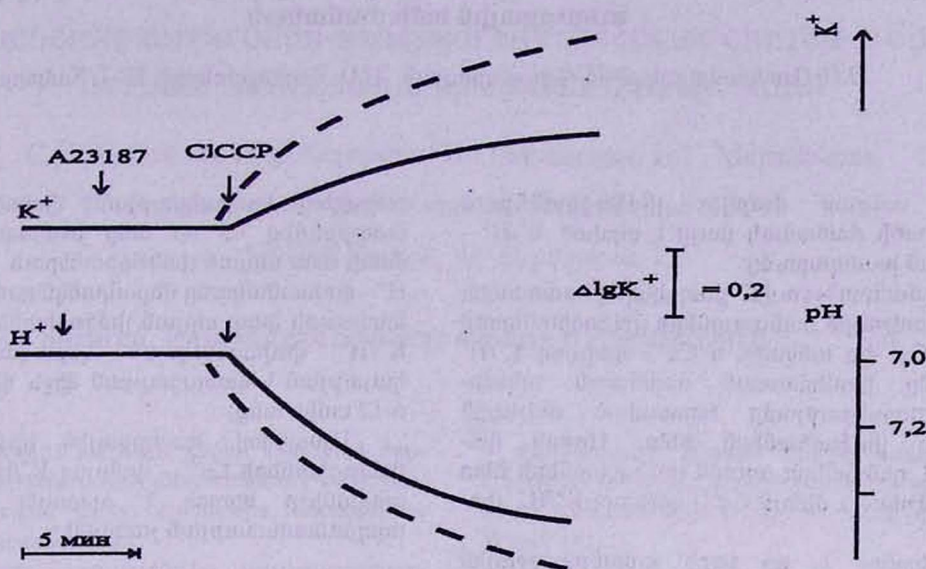


Рис.4. Влияние A23187 и C1CCP на движение ионов в лимфоцитах периферической крови при опухолевом росте ($40 \times 10^6/\text{мл}$). Среда инкубации содержит дополнительно 1 мМ CaCl_2 , pH суспензии – 7,0. Добавлено 5 мкМ A23187 и 18 мкМ C1CCP. Пунктирная линия – контроль (лимфоциты периферической крови донора).

У 5 лиц в лимфоцитах периферической крови восстановление Ca^{2+} -зависимого K^+/H^+ -обмена не происходило: при его индуцировании протонофором и ионофором или протонофором и пропранололом имел место слабый выход K^+ и вход H^+ . В группе с невосстановленным Ca^{2+} -зависимым K^+/H^+ -обменом (через 45 дней после операции) наблюдался летальный исход в течение 6–12 месяцев после оперативного вмешательства.

Для оценки полученных результатов была составлена таблица взаимной сопряженности 2×2 (четырёхпольная таблица) и определен критерий χ^2 для оценки связи.

Полученный нами критерий χ^2 соответствует $p < 0,01$ и свидетельствует о наличии достоверной связи между отсутствием восстановления Ca^{2+} -зависимого K^+/H^+ -обмена в лимфоцитах периферической крови и летальностью при опухолевых процессах.

Таким образом, показатель Ca^{2+} -зависимого K^+/H^+ -обмена в лимфоцитах периферической крови можно использовать как критерий прогнозирования эффективности лечения при опухолевом росте.

Восстановление Ca^{2+} - K^+/H^+ -обмена		Летальность	
		есть	нет
Есть	15	1(a)	14(b)
Нет	5	4(c)	1(d)

$$R_1 = a + c$$

$$R_2 = b + d$$

$$C_1 = a + c$$

$$C_2 = b + d$$

Поступила 05.12.02

$$\chi^2 = \frac{(ad - bc)^2 \cdot N}{R_1 R_2 C_1 C_2}$$

Մարդու լիմֆոցիտներում Ca^{2+} , K^+ և H^+ իոնների համակցված տրանսպորտի խանգարումը ուռուցքային աճի ժամանակ

Ս.Ս. Ղամբարյան, Թ.Ա. Գյուլբազյան, Ս.Ս. Հարությունյան, Ա.Վ. Հակոբյան

Առաջին անգամ մարդու լիմֆոցիտներում ուռուցքային աճի ժամանակ ցույց է տրված K^+/H^+ - փոխանակման խանգարումը:

Թորքի ոչմանրաբջջային քաղցկեղով տառապող հիվանդների ավշային հանգույցների լիմֆոցիտներում ճնշված է և Ca^{2+} -ից անկախ, և Ca^{2+} - կախյալ K^+/H^+ փոխանակումը համեմատած սպոնտան պնևմոթորաքսի կապակցությամբ հեռացված ավշային հանգույցների լիմֆոցիտների հետ: Արյան լիմֆոցիտներում, դոնորների արյան լիմֆոցիտների հետ համեմատ, ճնշված է միայն Ca^{2+} - կախյալ K^+/H^+ փոխանակումը:

Հայտնաբերված է, որ թորքի ոչմանրաբջջային

քաղցկեղի կապակցությամբ վիրահատական միջամտությունից 45 օր անց հետազոտվածներից մեծ մասի մոտ արյան լիմֆոցիտներում Ca^{2+} - կախյալ K^+/H^+ - փոխանակումը վերականգնվում է: Ցույց է տրված հավաստի կապ արյան լիմֆոցիտներում Ca^{2+} -կախյալ K^+/H^+ փոխանակման վերականգնման բացակայության և մահացության միջև՝ վիրահատությունից 6-12 ամիս անց:

Այսպիսով, ուռուցքային հիվանդների արյան լիմֆոցիտների Ca^{2+} - կախյալ K^+/H^+ փոխանակման ցուցանիշը կարող է ծառայել որպես բուժման արդյունավետության չափանիշ:

Disorders of the coupled transport of Ca^{2+} , K^+ and H^+ ions in human lymphocytes in tumour growth

S.S. Gambarov, T.A. Gyulbayazyan, S.S. Haroutyunyan, A.V. Hakobyan

For the first time the disorder of K^+/H^+ exchange in human lymphocytes in tumor growth has been shown: in lymphocytes of peripheral blood only Ca^{2+} - dependent K^+/H^+ exchange has been depressed, while in lymphocytes of lymph nodes both Ca^{2+} -dependent and Ca^{2+} -independent K^+/H^+ exchanges have been depressed.

It is shown that 45 days after operation for non-small cell lung cancer in lymphocytes of peripheral blood Ca^{2+} -

dependent K^+/H^+ exchange has recovered. Reliable interaction between the absence of Ca^{2+} - dependent K^+/H^+ exchange recovery and lethality during the first 6-12 months after the operation is demonstrated.

Consequently, the Ca^{2+} - dependent K^+/H^+ exchange in human lymphocytes of peripheral blood can be used as a criterion for prognosis of the treatment effectiveness.

Литература

1. Пьяцца А. В кн.: Методы исследований в иммунологии /под ред. И. Лефковитса, Б. Пернуса. М., 1981.
2. Boyum A. Scand.J.Clin.Lab.Invest., 1968, 21, Suppl. 97, p.77.
3. Liu S.G. J., Hahn W.C., Bierer B.E., Golan D.E. Biophys. J., 1995, 68, p.459.
4. Mentzer S.J. Chest. Surg. Clin. N. Am., 1995, 5, 1, p. 57.