

Информативность определения Na/K-АТФ-азы при оценке эффективности терапии острых лейкозов

Л.С.Саакян, А.А.Пепанян, П.А.Казарян, С.О.Данелян, С.С.Дагбашян

Гематологический центр им. Р.О.Еоляна МЗ РА

375014, Ереван, ул. Нерсисяна, 7

Ключевые слова: Na/K-АТФ-аза, фосфолипиды, острый лейкоз у детей, диагностика

Общеизвестно, что важнейшим морфофункциональным локусом, вовлекаемым в первичные механизмы канцерогенеза различной этиологии является клеточная мембрана, структурно-функциональная целостность которой обуславливает гомеостаз в целом.

Согласно литературным данным [1, 2, 6, 7, 9], лейкозная трансформация сопровождается деструкцией, изменением проницаемости биомембран, перестройкой генома и извращением внутриклеточного обмена в различных тканях и крови. При этом в периферической крови выявляются определенные морфологические изменения эритроцитов, что наиболее выражено у больных острым лейкозом (ОЛ), преимущественно – острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ).

Выявлен определенный параллелизм между изменениями морфологической структуры эритроцитов и тяжестью заболевания [6, 8]. Обнаруженные изменения, по всей вероятности, обусловлены деформацией плазматической мембраны, что, безусловно, связано с нарушением метаболических процессов в эритроцитах и может привести к снижению их функциональной активности.

В последние годы одним из критериев злокачественности опухолевого процесса и оценки эффективности проводимой терапии является определение активности мембраносвязанных ферментных систем, в частности АТФ-аз, весьма чувствительных к различным изменениям клеточного метаболизма [13–16].

Целью нашей работы является изучение изменений активности Na/K-АТФ-азы – ферментного эквивалента плазматических мембран, в эритроцитах крови больных ОЛЛ детей на различных стадиях заболевания и оценка этих изменений при определении прогноза.

Материал и методы

Исследовались эритроциты крови больных ОЛЛ в возрасте от 3 до 12 лет. Контролем служила кровь практически здоровых детей той же возрастной группы.

По степени тяжести патологических процессов обследуемых разделили на следующие группы:

1. Практически здоровые дети (контрольная группа).
2. Больные в развернутой стадии заболевания (до начала лечения, когда в костномозговом пунктате выявляется более 30% бластов).
3. Больные в стадии ремиссии (пунктат содержит менее 5% бластов).
4. Больные в стадии рецидива.

Лечение больных осуществлялось по общепринятой протокольной программе BFM [10], включающей преднизолон, винкристин, рубомицин и L-аспарагиназу.

Фракционирование адениловых нуклеотидов проводилось методом тонкослойной хроматографии [3] в системе растворителей диоксан – аммиак – вода (4:2:1).

Фракционирование индивидуальных фосфолипидов проводили методами тонкослойной хроматографии [12] в модификации П.А. Казаряна [4] на адсорбенте марки ЛС 5/40. В каждой фракции определяли содержание неорганического фосфора [11].

Активность Na/K-АТФ-азы рассчитывали по разнице между общей и Mg-АТФ-азной активностями. Общую АТФ-азную активность определяли в среде, содержащей 3мМ АТФNa₂, 50мМ трис-HCl, 100мМ NaCl, 20мМ KCl и 5мМ MgCl₂. В среду для определения Mg-АТФ-азной активности, помимо этого, добавляли 0,1мМ убаин. Об АТФ-азной активности судили по приросту уровня неорганического фосфата в инкубационной среде [21].

Полученные данные обрабатывали статистически с учетом критерия достоверности Фишера-Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Одним из критериев оценки эффективности проводимой терапии при ОЛЛ является нормализация состава клеток крови и костного мозга с последующим восстановлением в них биохимических и физиологи-

ческих процессов. Между тем при проведении биохимических исследований в детских клиниках удобной и легкодоступной моделью, не требующей больших затрат крови (около 2 мл), служат эритроциты, основные мембранные характеристики которых сопоставимы с показателями других клеток крови и тканей организма.

Важнейшим свойством мембран, в том числе эритроцитарных, является обеспечение избирательной

проницаемости ионов, аминокислот и углеводов. При этом ответственной за активный транспорт через плазматические мембраны является Na/K-АТФ-аза, встроенная в мембранный аппарат клетки и создающая разницу концентраций одновалентных катионов Na^+ и K^+ , используемую для протекания ключевых реакций жизнедеятельности – генерации возбуждения, водно-солевого обмена и регуляции клеточного метаболизма [2, 7, 8, 16].

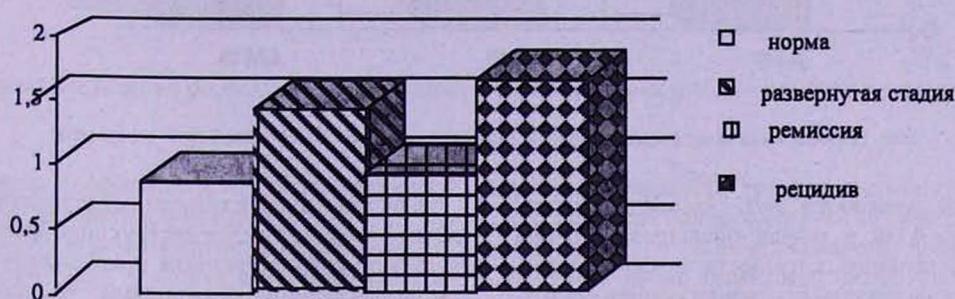


Рис. 1. Активность Na/K-АТФ-азы при ОЛЛ у детей (в μM Фн/мг белка)

Согласно данным проведенных исследований (рис. 1), у больных в развернутой стадии заболевания наблюдалась заметная активация Na/K-АТФ-азы ($1.44 \pm 0.07 \mu\text{M}$ Фн/мг белка против нормы $1.08 \pm 0.07 \mu\text{M}$ Фн/мг).

В стадии полной ремиссии Na/K-АТФ-азная активность значительно понижалась, что, по-видимому,

связано со заметным ослаблением злокачественности процесса и возможной нормализацией мембраносвязанных процессов под действием проводимой химиотерапии. Об этом же свидетельствуют показатели электролитов (Na^+ и K^+) в крови больных (табл.), варьирующие в пределах контрольных величин.

Таблица

Состояние электролитов в эритроцитах и плазме крови у детей с ОЛЛ (мм/л)

Обследуемые группы	Эритроциты		Плазма	
	Na^+	K^+	Na^+	K^+
Норма	9–17	80–100	130–138	4–5
Лейкоз	26 ± 1.8	150 ± 13.2	144 ± 9.7	50 ± 0.2
Ремиссия	19.6 ± 2.4	110.2 ± 5.7	145.1 ± 17.4	3.8 ± 0.6

При рецидиве заболевания отмечается почти двукратное увеличение активности Na/K-АТФ-азы, хотя электролитные характеристики крови больных в этих условиях остаются неизменными.

Как известно, транспортные АТФ-азы в структурном и функциональном отношении тесно сопряжены с энергетическими системами эритроцитов, так как на поддержание трансмембранного градиента ионов расходуется около 40% энергии, образованной при глико-

лизе, преимущественно за счет АТФ. При этом АТФ выполняет в клетке и дополнительную регуляторную роль, объединяя отдельные протомеры Na/K-АТФ-азы в олигомерный ансамбль, тем самым увеличивая скорость ее функционирования [1, 2, 8, 16].

Содержание адениловых нуклеотидов, относительно стабильное в норме, при патологических нарушениях может резко снижаться. В таких случаях низкий уровень АТФ может стать критическим для поддержа-

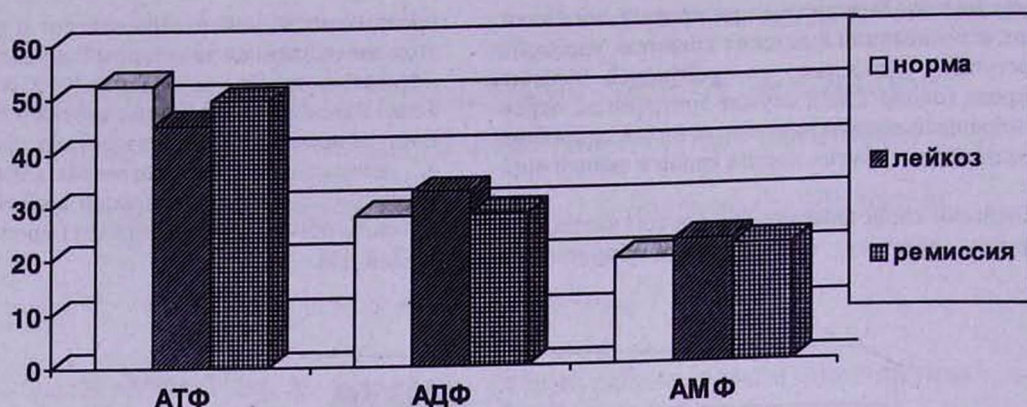


Рис. 2. Состояние компонентов адениловой системы при ОЛЛ у детей (в % от суммы)

ния достаточной активности Na/K- насоса. Ввиду того, что уровень АТФ в тканях представляет собой один из весьма устойчивых гомеостатических показателей и является надежным критерием оценки состояния энергетического обмена при различных патологических состояниях [13], его определение может быть информативным и при лейкозах.

Проведенные в этом направлении исследования (рис. 2) позволили выявить, что при ОЛЛ наблюдается состояние энергодифицита клеток, проявляемое снижением уровня АТФ, повышением моно- и дифосфорных его производных. К числу возможных причин уменьшения содержания АТФ можно отнести усиление процессов его расщепления, с одной стороны, и угнетение активности ферментов тканевого дыхания – с другой.

Глубина падения уровня АТФ может оказаться существенным лимитирующим фактором, так как недостаток макроэрга может способствовать развитию нивелирования градиента концентраций ионов. Однако в силу заметной активации Na/K-АТФ-азы при лейкозе этого не наблюдается, о чем свидетельствуют относительно стабильные концентрации электролитов крови у больных ОЛЛ на всех изученных стадиях заболевания.

Как известно, одним из важнейших факторов, определяющих структуру и стабильность интегральных мембранных белков, в частности Na/K-АТФ-азы, являются взаимодействия неполярных аминокислотных остатков с гидрофобными углеводородными цепями липидного матрикса мембран. Модификация мембранных липидов при различных патологических состояниях организма приводит к изменению активности мембраносвязанных ферментов, а иногда – и к солиubilизации последних. Установлено [2, 7, 8, 18, 19], что транспортные функции АТФ-азных систем главным образом обусловлены их липидным окружением.

Согласно нашим ранним исследованиям [5], ОЛЛ у детей характеризуется деструкцией биомембран, проявляемой количественным и качественным изменением ее фосфолипидного состава, уменьшением содержания поверхностноактивных фосфатидилхолинов (ФХ), фосфатидилэтаноламинов (ФЭ), фосфатидилинозитов (ФИ) на фоне повышения токсичных лизофосфатидилхолинов (ЛФХ).

Согласно общепризнанной концепции [15, 18, 20, 22], для нормального функционирования различных органов и систем организма важное значение имеет как изменение содержания отдельных фракций фосфолипидов (ФЛ), так и физиологически установившееся постоянство соотношений между отдельными их представителями.

В результате проведенных исследований выявлено снижение отношения холинсодержащих ФЛ: фосфатидилхолины + сфингомиелины (ФХ+СФМ), дислоцирующихся в поверхностном слое биомембраны, к аминосодержащим: фосфатидилэтаноламины + фосфатидилсерин (ФЭ+ФС), локализованным во внутреннем ее слое, что указывает на преимущественное повреждение ФЛ наружного слоя, осуществляющего защитную функцию (рис. 3).

Одной из причин значительного уменьшения содержания основных ФЛ эритроцитарных мембран – ФХ, может быть также ингибирование их синтеза из фосфатидных кислот (ФК), о чем свидетельствует снижение отношения ФХ/ФК, наблюдаемое в наших исследованиях. При этом отмечается накопление ФК, которые, как известно, являются Ca^{2+} -ионофорами и играют существенную роль в мобилизации ионов кальция в клетке, что вызывает нарушение проницаемости эритроцитарных мембран и приводит к их деструкции.

Резкое снижение фракции ФХ сопровождается одновременным повышением доли ЛФХ при ОЛЛ и увеличением величины отношения ЛФХ/ФХ, указы-

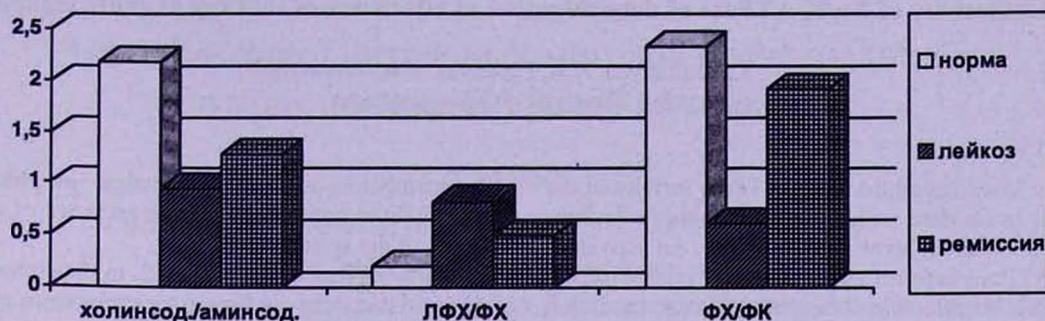


Рис. 3. Изменение фосфолипид-фосфолипидных соотношений эритроцитарных мембран при ОЛЛ у детей (в % от суммы)

вая на активность фосфолипазы A_2 , катализирующей деацилирование фосфатидов-глицеридов. ЛФХ, как известно, обладают мембранолитическим и мембранотоксическим действием, участвуя в процессах деградации мембран и нарушении реакций тканевого иммунитета.

Необходимо отметить, что существенную роль в активировании Na/K -АТФ-азы играют ФС, выступающие в качестве липида-эффектора этого фермента.

Возможное накопление продуктов окисления липидов, изменение их качественного и количественного состава, нарушение липид-липидных и липид-белковых взаимодействий, т. е. изменение физико-химических свойств мембран при лейкомии, приводит к повышению активности Na/K -АТФ-азы для обеспе-

чения нормального течения транспортных процессов и сохранения ионного баланса за счет гидролиза АТФ.

Исходя из вышеизложенного, можно допустить, что изменение активности Na/K -АТФ-азы является компенсаторно-приспособительной реакцией организма, направленной на поддержание нормального фона ионного транспорта, обеспечивая функциональную активность эритроцитарных мембран при лейкомии у детей.

Таким образом, можно заключить, что определение активности Na/K -АТФ-азы, в комплексе с другими клинико-лабораторными показателями, может стать прогностическим тестом, способствующим выработке рациональной тактики лечения.

Поступила 26.04.04

Na/K -ԱՆՖ-ազի որոշման տեղեկատվականությունը սուր լեյկոզի բուժման արդյունավետության գնահատման ժամանակ

Լ.Ս.Սահակյան, Ա.Ա.Պետրոսյան, Պ.Ա.Ղազարյան, Ս.Ն.Դանելյան, Ս.Ս.Դադարյան

Սուր լեյկոզի ախտահարող լեյկեմիայով տառապող երեխաների արյան էրիթրոցիտային թաղանթներում ուսումնասիրվել է Na/K -ԱՆՖ-ազի ակտիվության փոփոխությունների առանձնահատկությունները հիվանդության տարբեր փուլերում: Բացահայտվել է, որ մինչև հիվանդության բուժումը և նրա ռեցիդիվի փուլում տեղի է ունենում ֆերմենտային համակարգի ակտիվության կտրուկ ավելացում, իսկ ռեմիսիայի փուլում, ընդհանրապես նվազում: Նշված փոփոխությունները իրականացվում են թաղանթադեմոնստրացիայի

գործընթացների ակտիվացման, ֆոսֆոլիպիդ – ֆոսֆոլիպիդային հարաբերակցության փոփոխության և համակարգում էներգադեֆիցիտի առկայության պայմաններում: Բացահայտված է Na/K -ԱՆՖ ազի ուսումնասիրության տեղեկատվականությունը լեյկեմիայի ժամանակ: Կլինիկա-լաբորատոր ցուցանիշների հետ նրա համալիր որոշումը հանդիսանում է հիվանդության բուժման արդյունավետության գնահատման կարևոր ցուցանիշ:

Informativity of Na/K-ATPase at determination of efficiency of therapy at acute leukemia

L.S.Sahakyan, A.A. Pepanyan, P.A.Ghazaryan,
S.H.Danelyan, S.S.Daghabashyan

We have investigated the Na/K-ATPase activity in the erythrocytes in children with acute lymphoblastic leukaemia (ALL) at different levels of the disease. An activation of Na/K-ATPase before treatment and at relapse of the disease, and a considerable decrease of it in the remission phase are observed.

These changes are caused by activation processes of

the membrane destruction, mutation of phospholipid – phospholipid correlation and the presence of energy deficiency of the systems.

Na/K-ATPase activity in ALL in the complex of other clinical-laboratory indices may promote to choosing the rational treatment tactics.

Литература

1. Блюгер А.Ф., Майоре А.Я. Биологическая мембрана – основа структурной организации жизнедеятельности клетки. В сб.: Биол. мембраны и патол. клетки, Рига, 1986, с. 5.
2. Болдырев А.А. Na/K-АТФ-аза – свойства и биологическая роль. Биология, М., 1998.
3. Захарова Н.Б., Рубин В.И. Лаб. дело, 1980, 12, с. 735.
4. Казарян П.А., Элюян Д.В. Хроматографические методы (распределительная и адсорбционная хроматография). М., 1982.
5. Казарян П.А., Арустамян С.М., Баджиян С.А., Саарян А.В. Исследование структурно-функциональной организации фосфолипидов биомембран в стадии развития лейкемии. В сб.: Актуальные пробл. эксп. и клин. медицины, Ереван, 1998, с. 400.
6. Молчанова Т.П. Гематология и трансфуз., 1989, 7, с. 32.
7. Мухветадзе А.В., Топуридзе И.И., Шургая И.Г. Гематол. и трансфуз., 1990, 9, с. 20.
8. Надирадзе Н.И., Грекулова А.Н., Ковтарадзе В.Г. Бюл. эксперим. биол. и мед., 1993, т. 125, 2, с. 135.
9. Руководство по гематологии /Под ред. А.И.Воробьева. М., 2002, т.1.
10. Савченко В.Г., Паровичникова Е.Н. Лечение острых лейкозов (клин. исследования). М., 2004.
11. Светашев В.И. Микротехника анализа липидов и ее использование. Автореф. дис. канд. хим. наук, Владивосток, 1973.
12. Хроматография в тонких слоях / Под ред. Э.Штала, М., 1965.
13. Imai S., Nakazawa M. (Ed.) Role of Adenosine and adenine nucleotides in the biological system, Proc. of the 4th International Symposium of Adenosine and Adenine Nucleotides, Lake Yamanaka, Japan, 1991.
14. Kass L. Leukemia Cytology and Cytochemistry. Philadelphia, 1982.
15. Kiema T.R., Kanma H., Rantala A. Hypertension, 1996, 28, p. 1070.
16. Krug L.M., Berk B.C. Hypertension, 1992, 20, 2, p. 144.
17. Kostsin D.G., Kozlova N.M., Sloboshanina E.I. In: Advanced lecture course of lipid signaling and membrane traffic. Italy, 2003, p.90.
18. Krebs J.R. J. Bioenerg. and Biomembr., 1982, 14, 3, p. 141.
19. Maxfield F. In: Advanced lecture course of lipid signaling and membrane traffic. Italy, 2003, p.53.
20. Mukherjee S., Maxfield F. Traffic, 2000, 1, p. 203.
21. Rathbun W.B., Beilach M.V. Anal. Biochem., 1969, 28, p. 436.
22. Spragna G.C., Hickon-Bick D.L. The Am. J. Med. Sciences, 1999, 318, 1, p. 15.