

THE USE OF VACUUM METHODS OF SANATION IN THE TREATMENT OF PURULENT DISEASES OF THE SOFT TISSUES

I.V. Shkvarkovkyi, T.V. Antoniuk, A.P. Moskaliuk, V.B. Reva

Abstract. In recent years the frequency of complicated purulent-septic diseases of the soft tissues has increased. To improve the results of surgical treatment of purulent processes of the soft tissues a technique of using vacuum rehabilitation with the use of antiseptic agents has been elaborated. The method complements the multimodality surgical treatment and enables to speed up wound cleansing, reduces microbial contamination, leads to a rapid reduction of the area of the wound surface, stimulating the development of the granulation tissue and accelerates the processes of epithelization.

Key words: purulent wound, vacuum therapy.

Bukovinian State Medical University (Chernivtsi)

Рецензент – проф. В.П. Польовий

Buk. Med. Herald. – 2012. – Vol. 16, № 4 (64). – P. 184-187

Надійшла до редакції 27.08.2012 року

© I.V. Shkvarkovskiy, T.V. Antoniuk, O.P. Moskaliuk, V.B. Reva, 2012

УДК 612.015.33.+616.153.94.

О.І. Якубець, Д.З. Воробець, З.Д. Воробець

АРГІНАЗА ЛІМФОЦИТІВ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ У ХВОРИХ НА РАК ЯЄЧНИКА

Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького
Львівський державний онкологічний регіональний лікувально-діагностичний центр

Резюме. Встановлені оптимальні умови функціонування аргінази в пермеабілізованих лімфоцитах периферичної крові, отриманих із клінічно здорових і хворих на рак яєчника жінок і вивчені зміни її кінетичних параметрів. Показано, що в лімфоцитах, виділених із крові хворих на рак яєчника жінок, максимальна швид-

кість реакції гідролізу L-аргініну аргіназою зростає у 2,7 раза, а K_m (спорідненість до субстрату) зростає у 2,1 раза.

Ключові слова: аргіназа, L-аргінін, рак яєчника, лімфоцити.

Вступ. Рак яєчника (РЯ) – одне з найбільш розповсюджених онкологічних захворювань жіночих статевих органів. Показники захворюваності на РЯ в Україні в останні роки коливаються в межах 14,7-15,3 на 100 тисяч жіночого населення (Національний канцер-реєстр України, 2010). Незважаючи на постійне удосконалення підходів до лікування, в основу якого покладено поєднання хірургічного втручання та хіміотерапії, залишаються нез'ясованими ряд питань щодо етіології, патогенезу, діагностики пухлинного процесу. З погляду сучасних уявлень біохімії та молекулярної біології пухлини виникають у результаті відповідних мутацій і порушень метаболічних та регуляторних систем [5, 10, 12]. У цьому плані актуальним є вивчення аргіназа/NO-синтазного шляху обміну L-аргініну, який відіграє важливу роль у розвитку патологічних процесів, зокрема пухлинного росту [10, 15]. Ряд пухлинних клітин використовують для свого росту L-аргінін [12], а голодування за аргініном, викликане за допомогою аргінін-деградуючих ферментів, розглядається як потенційний підхід для їх лікування [6]. Аргіназа – металофермент, який каталізує гідролітичне розщеплення L-аргініну до орнітину та сечовини [8, 10]. L-аргінін, як субстрат, викорис-

товується також NO-синтазами для синтезу NO, який регулює практично всі клітинні функції [15]. Показано, що аргіназа інгібує ріст клітин меланоми *in vitro* [12]. Вважається, що одним із важливих механізмів, що впливають на відповідь пухлинних клітин на голодування за аргініном, є дефекти метаболізму цієї амінокислоти через пошкодження ензимів циклу сечовини [6]. Також припускається, що зміна активності цього ферменту може бути сигналом, який свідчить про розвиток ракових пухлин [15].

Мета дослідження. Вивчити активність аргінази та її кінетичні параметри в лімфоцитах периферичної крові за нормального стану організму та у хворих на рак яєчника.

Матеріал і методи. Дослідження проводили на лімфоцитах, виділених із крові хворих жінок, які перебували на стаціонарному лікуванні у Львівському державному онкологічному регіональному лікувально-діагностичному центрі в період з лютого 2011 до квітня 2012 року.

Група хворих на рак яєчника складала 26 жінок. Діагноз встановлювали в клініці на основі уніфікованих діагностичних критеріїв шляхом пункції заднього склепіння та цитологічного підтвердження діагнозу. Усі відібрані хворі були без

© О.І. Якубець, Д.З. Воробець, З.Д. Воробець, 2012

оперативного лікування та без проведення хіміотерапії. Групу контролю становили практично (клінічно) здорові жінки, віком 20-30 років ($n=16$).

Моноядерні лімфоцити периферичної крові людини виділяли з гепаринізованої свіжоотриманої венозної крові хворих і донорів у градієнті густини фікол-тріумбрас (г $\rho=1,08$) [9]. Підраховували клітини в камері Горяєва, використовуючи як барвник 0,1 % трипановий синій. Цілісність і життєздатність лімфоцитів, яка в усіх дослідах становила не менше 95 %, оцінювали за забарвленням трипановим синім [4, 7].

Визначення ензиматичної активності аргінази проводили на пермеабілізованих лімфоцитах периферичної крові. Для пермеабілізації мембран лімфоцитів периферичної крові до суспензії лімфоцитів додавали детергент – 0-0,3 % сапонін. Дана методика ґрунтується на роботах, виконаних на еритроцитах, лімфоцитах і сперматозоїдах із вивчення іон-транспортувальних систем клітини та глутатіонової антиоксидантної системи [4, 5, 7]. Припускається, що експериментальна модель із використанням пермеабілізованих клітин може бути застосована і для дослідження функціонування внутрішньоклітинних ензимів метаболізму NO.

Визначення ензиматичної активності аргінази проводили за утворенням сечовини, вміст якої визначали 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 HCl, 1-200 L-аргінін, 0-3 MnCl₂ (pH=9,5), об'ємом 300 мкл; кількість білка у пробі не перевищувала 50 – 100 мкг/мл. Вміст білка в лімфоцитарній суміші визначали методом Лоурі [13]. Інкубацію здійснювали 30 хв, при температурі 37⁰ С на шейкері. Реакцію зупиняли внесенням в інкубаційне середовище 50 % ТХО. У контрольні зразки замість лімфоцитарної суміші вносили відповідну аліквоту фізрозчину. Крім дослідних і контрольних проб готували також пробу, яка містить стандартний розчин сечовини (16,65 мМ).

Активність аргінази визначали спектрофотометрично при 520 нм, реєструючи процес утворення сечовини. Кількість продукту реакції, що утворився в процесі ензиматичної реакції, визначали згідно з інструкцією і виражали в нмоль сечовини/хв×мг загального протеїну в пробі [8, 16].

Дослідження кінетичних властивостей ензиматичної реакції аргінази проводили в стандартному середовищі інкубації, що було модифіковане за складом відповідних компонентів (концентрації субстрату (L-аргінін), активатора (Mn²⁺), детергенту (сапонін)). Уявні кінетичні параметри, властиві для аргіназної реакції – константу активації іонами Mn²⁺, константу Міхаеліса (K_{mL-arg}), та початкову максимальну швидкість реакції розкладу L-аргініну (V_{L-arg}) визначали на основі координат Лайнуівера-Берка [3].

Експериментальні дані обробляли методами варіаційної статистики. Варіаційно-статистичне опрацювання отриманих результатів проводили з використанням критерію Стьюдента (t) за допомогою комп'ютерної програми Microsoft Excel 2003.

Результати дослідження та їх обговорення. Вивчення змін активності аргінази при патологічних станах викликає значний інтерес у дослідників у медико-біологічній практиці. Однак у переважній більшості медичних досліджень використовують визначення метаболітів окисного та неокисного обміну L-аргініну в плазмі крові. Дослідження активності аргінази в нормі та при різних патологічних станах організму в клітинах, зокрема лімфоцитах периферичної крові, є незначними та обмеженими.

При визначенні оптимальних умов функціонування аргінази ЛПК, яка є не тільки цитозольною, але й мітохондріальною локалізацією, та з'ясування ряду кінетичних параметрів необхідно було спочатку підібрати оптимальні умови для пермеабілізації клітин сапоніном. Сапонін належить до групи речовин амфільної природи, що здатні зв'язуватися з мембранними білками гідрофобними зв'язками, одночасно взаємодіючи полярними групами з водою. Це дає змогу молекулам детергенту розпушувати мембрану, водночас не порушуючи структури і функцій самої мембрани [1]. Сапонін використовували в діапазоні концентрацій від 0 до 0,3 %.

Виявлено, що в широкому діапазоні концентрацій детергенту (0-0,3 %) крива залежності ферментативної активності від концентрації сапоніну куполоподібна. Низькі концентрації сапоніну (0,02-0,04 %) є недостатніми для розкриття латентної активності досліджуваного ензиму. Оскільки аргіназа є і мітохондріальним ферментом, для її активації необхідна дещо більша кількість сапоніну. Максимальне значення активності спостерігається за концентрації 0,2-0,3 %.

Таким чином, саме цей діапазон концентрацій детергенту слід вважати найоптимальнішим для практичного використання в експериментах з вивчення кінетичних і каталітичних властивостей ензиматичної реакції аргінази. Крива залежності впливу сапоніну на аргіназну активність ЛПК хворих на рак яєчника має схожий вигляд.

Дослідження залежності активності ферментів від концентрації сапоніну проводились іншими дослідниками, де показано подібні концентрації сапоніну для розкриття латентної активності як мембранозв'язаних, так і цитозольних ферментів [4, 5, 7].

При визначенні 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 Mn²⁺ 2 мМ). При цьому спостерігається лінійне збільшення ензиматичної активності аргінази з подальшим виходом на плато. У всьому діапазоні досліджуваних концентрацій L-аргініну активність

Таблиця 1

Кінетичні параметри, які характеризують гідроліз L-аргініну сапонін-пермеабілізованими лімфоцитами донорів і хворих на рак яєчника від концентрації L-аргініну ($M \pm m$, $n=4-8$)

Кінетичні параметри	Групи пацієнтів	Донори	Хворі на РЯ
V_{max} , нмоль / хв на 1 мг білка		132,3±6,8	359,4±14,2*
K_{L-arg} , мМ		1,6±0,2	3,4±0,25*

Примітка. V_{max} – початкова максимальна активність ензиму, K_{L-arg} – константа Міхаеліса за L-аргініном. Зміни вірогідні стосовно величин у лімфоцитах в осіб групи контролю, * $P < 0,001$

Таблиця 2

Кінетичні параметри, які характеризують гідроліз L-аргініну сапонін-пермеабілізованими лімфоцитами донорів і хворих на рак яєчника від концентрації іонів Mn^{2+} ($M \pm m$, $n=4-8$)

Кінетичні параметри	Групи пацієнтів	Донори	Хворі на РЯ
V_{max} , нмоль / хв на 1 мг білка		260,6±19,1	546,5±27,6*
$K_{Mn^{2+}}$, мМ		1,85±0,12	1,87±0,15

Примітка. V_{max} – початкова максимальна активність ензиму, $K_{Mn^{2+}}$ – уявна константа активації іонами Mn^{2+} . Зміни вірогідні стосовно величин у лімфоцитах в осіб групи контролю, * $P < 0,001$

аргінази хворих на РЯ була підвищена порівняно з такою величиною в донорів.

Розрахунок активності аргінази лімфоцитів на лінійній ділянці залежності показав, що активність ферменту в практично здорових жінок становить $106,0 \pm 6,7$ нмоль сечовини/хв·мг білка. У хворих на РЯ ця активність зростає до $408,1 \pm 22,4$ нмоль сечовини/хв·мг білка, тобто в 3,8 раза.

На основі лінеаризації отриманих даних у координатах Лайнуівера-Берка показаний змішаний тип інгібування активності ферменту та визначено основні кінетичні параметри гідролізу L-аргініну сапонін-пермеабілізованими ЛПК донорів і хворих на РЯ (табл. 1).

Розрахунок кінетичних параметрів активності аргінази свідчить про те, що максимальна швидкість гідролізу L-аргініну сапонін-пермеабілізованими ЛПК хворих на РЯ, визначена за L-аргініном, становить різницю стосовно донорів приблизно у 2,7 раза. Водночас константа спорідненості до L-аргініну у ЛПК хворих на РЯ також зростає у 2,1 раза порівняно з практично здоровими донорами.

Отже, при інтерпретації отриманих даних з урахуванням кінетичних параметрів, визначених за L-аргініном, можна дійти висновку, що за умов розвитку РЯ в імункомпетентних клітинах зростання активності досліджуваної ензиматичної системи відбувається за рахунок збільшення числа обертів ензиму (величина V_{max} зростає). Іншими дослідниками показано подібні результати спорідненості аргінази до субстрату [10, 13, 15].

Відомо, що крім L-аргініну для функціонування аргінази необхідними є іони марганцю, які є активною складовою ферменту і діють як кофактор. Досліди з вивчення впливу Mn^{2+} на

аргіназну активність сапонін-пермеабілізованих ЛПК проводили в діапазоні концентрацій $MnCl_2$ від 0 до 3 мМ. З'ясовано, що оптимальна концентрація L-аргініну складає 2 мМ.

Крива, яка відзеркалює залежність активності аргінази ЛПК від вмісту іонів Mn^{2+} в інкубаційному середовищі, має типовий куполоподібний вигляд. 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. Іншими дослідниками показано, що преінкубація ензиму іонами Mn^{2+} призводила до значного збільшення аргіназної активності [11].

Графіки залежності аргіназної активності ЛПК донорів і хворих на РЯ від концентрації Mn^{2+} у висхідній частині кривих лінеаризовано у координатах Лайнуівера-Берка.

Розрахунок кінетичних характеристик аргіназної активності ЛПК свідчить, що початкова максимальна швидкість гідролізу L-аргініну у хворих на РЯ істотно відрізняється від практично здорових донорів, зростає у 2,1 раза, тоді як уявна константа активації іонами Mn^{2+} практично однакова у хворих і донорів (табл. 2). Отже, максимальна швидкість реакції при патології зростає, а Mn^{2+} -зв'язувальна ділянка аргінази лімфоцитів залишається нативною.

Висновок

З'ясовані основні кінетичні параметри функціонування аргінази та показано, що максимальна швидкість аргіназної реакції лімфоцитів периферичної крові у хворих на рак яєчника зростає у

3,8 раза. Це свідчить про інтенсивне використання клітинами L-аргініну, який необхідний для пухлинного росту.

Література

1. Болдырев А.А. Введение в биомембранологию / А.А. Болдырев. – М.: Изд.-во МГУ, 1990. – 208 с.
2. Изоферменты Na^+ , K^+ -АТФазы и Ca^{2+} -АТФазы в злокачественных образованиях / А.А. Капля, С.В. Хижняк, А.Г. Кудрявцева [и др.] // Укр. біохім. ж. – 2006. – Т. 78, № 1. – С. 29-42.
3. Келети Т. Основы ферментативной кинетики / Т. Келети. – М: Мир, 1990. – 350 с.
4. Кімакович О.В. Дія квамателу та пірензепіну на активність транспортних АТФаз лімфоцитів периферичної крові / О.В. Кімакович, Н.О. Підковка, З.Д. Воробець // Практ. мед. – 2004. – Т. 10, № 2. – С. 86-89.
5. Кочешкова Н.С. Вплив інгібіторів на Ca^{2+} -залежні та Ca^{2+} -незалежні АТФазні системи сперматозоїдів / Н.С. Кочешкова, З.Д. Воробець, Л.П. Оліферчук // Світ мед. та біол. – 2007. – № 3. – С. 65-70.
6. Роль ензимів метаболізму у відповіді пухлинних клітин на дефіцит аргініну / Ю.В. Курлішук, Я.П. Бобак, Б.О. Винницька [та ін.] // Укр. біохім. ж. – 2010. – Т. 82, № 4. – С. 23.
7. Підковка Н.О. Дослідження деяких властивостей АТФаз у лімфоцитах крові людини / Н.О. Підковка, З.Д. Воробець, А.Б. Зіменковський // Експерим. та клініч. фізіол. і біохім. – 2002. – Т. 7, № 1. – С. 38-41.
8. Шугалей В.С. Содержание мочевины и активность аргиназы в органах крыс при акклиматизации к холоду / В.С. Шугалей, А.С. Козина // Физиол. ж. СССР. – 1977. – № 8. – С. 1199-1202.
9. Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood / A. Boyum // Scand. J. Clin. Lab. Invest. – 1968. – Vol. 21 (Suppl. 97). – P. 77-79.
10. Arginine deprivation as a targeted therapy for cancer / L. Feum, M. You, C.J. Wu [et al.] // Curr. Pharmac. Design. – 2008. – Vol. 14. – P. 1049-1057.
11. Gürsu M.F. Biochemical analysis of arginase and ornithine carbamoyltransferase in human vitreous humor / M.F. Gürsu // Arch. Med. Res. – 2001. – Vol. 32, № 5. – P. 432-435.
12. Recombinant human arginase inhibits the in vitro and in vivo proliferation of human melanoma by inducing cell cycle and apoptosis / T.-L. Lam, G.K.Y. Wong, H.-Y. Chow [et al.] // Pigment Cell. Melanoma Res. – 2010. – Vol. 24. – P. 366-376.
13. Protein measurement with the Folin phenol-reagent / O.H. Lowry, A.L. Farr [et al.] // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol. 193. – P. 265-275.
14. Insights into the interaction of human arginase II with substrate and manganese ions by site-directed mutagenesis and kinetic studies. Alteration of substrate specificity by replacement of Asn149 with Asp / V. Lypez, R. Alarcyn, M.S. Orellana [et al.] // FEBS J. – 2005. – Vol. 272, № 17. – P. 4540-4548.
15. New insights into arginase. Part II. Role in physiology and pathology / M. Mielczarek-Puta, A. Chrzanowska, W. Grabon [et al.] // Postepy Hig. Med. Dosw. – 2008. – Vol. 62. – P. 214-221.
16. Uric acid decreases NO production and increases arginase activity in cultured pulmonary artery endothelial cells / S. Zharikov, K. Krotova, H. Hu [et al.] // Am. J. Physiol. Cell Physiol. – 2008. – Vol. 295, № 5. – P. 1183-1190.

АРГИНАЗА ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У БОЛЬНЫХ НА РАК ЯИЧНИКА

О.И. Якубец, Д.З. Воробец, З.Д. Воробец

Резюме. Определены оптимальные условия функционирования и кинетические параметры аргиназы у пермеабиллизованных лимфоцитах периферической крови, выделенных из клинически здоровых и больных на рак яичника женщин. Показано, что в лимфоцитах, полученных из крови больных на рак яичника женщин, максимальная скорость реакции гидролиза L-аргинина аргиназой возрастает в 2,7 раза, а K_m (средство к субстрату) в 2,1 раза.

Ключевые слова: аргиназа, L-аргинин, лимфоциты, рак яичника.

ARGINASE ACTIVITY OF PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES IN PATIENTS WITH OVARIAN CARCINOMA

O.I. Yakubets', D.Z. Vorobets', Z.D. Vorobets'

Abstract. Optimal conditions of the functioning of the arginase of peripheral blood permeable lymphocytes obtained from apparently healthy persons and patients with ovarian carcinoma have been established and changes of its kinetic parameters have been studied. It has been demonstrated that the maximum speed of the hydrolysis reaction of L-arginine by arginase increases 2,7 times and K_m (affinity to substrate) elevates 2,1 times in the lymphocytes isolated from the blood of patients with ovarian carcinoma.

Key words: arginase, L-arginine, lymphocytes, ovarian carcinoma.

Danylo Halytskyi National Medical University (L'viv)

Рецензент – доц. О.П. Пересунько

Buk. Med. Herald. – 2012. – Vol. 16, № 4 (64). – P. 187-190