

УДК 577.152.3:616.006.6

ОСОБЕННОСТИ Na^+, K^+ -АТФ-азной АКТИВНОСТИ В АДЕНОКАРЦИНОМЕ ТОЛСТОЙ КИШКИ ЧЕЛОВЕКА

А. А. КАПЛЯ¹, А. Г. КУДРЯВЦЕВА², С. В. ХИЖНЯК², Д. С. ОСИНСКИЙ³, Е. Н. ДЕМИН³

¹Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины, Киев;
e-mail: karlya@biochem.kiev.ua;

²Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Украина;

³Институт онкологии АМН Украины, Киев

Исследована активность Na^+, K^+ -АТФ-азы в мембранной фракции ткани аденокарциномы толстой кишки человека II и III стадий рака (по TNM классификации) и с разной степенью дифференцировки опухолевых клеток с целью оценки функциональных изменений фермента. В мембранных препаратах из опухолей выявлено снижение ферментативной активности по сравнению с условно нормальной тканью (УНТ) макроскопически неизменной слизистой оболочки. Изменения Na^+, K^+ -АТФ-азной активности проявляются в большей мере в опухолях с низкой степенью дифференцировки и менее выражены — в умеренно- и высокодифференцированных аденокарциномах. В то же время различия между активностью фермента в мембранах опухолевых клеток при II и III стадиях развития рака (без учета степени дифференцировки опухоли) не обнаруживаются. Высказано предположение о существовании особенностей функционального состояния Na^+, K^+ -АТФ-азы в колоректальных аденокарциномах человека разной степени дифференцировки.

Ключевые слова: Na^+, K^+ -АТФ-аза, колоректальная аденокарцинома, дифференцировка клеток.

Морфология эпителиальных клеток характеризуется структурно-функциональной неоднородностью и специализацией апикального и базолатерального участков плазматической мембраны, что является необходимым условием для осуществления направленного трансклеточного транспорта веществ. Полярное распределение в плазматической мембране эпителиоцитов многих мембранных белков, в том числе Na^+, K^+ -АТФ-азы в базолатеральном участке, осуществляется с помощью сопряженных механизмов при взаимодействии с адгезионными молекулами и белками цитоскелета [1, 2].

Проблема канцерогенеза связана не только с приобретением способности клеток к неконтролируемой пролиферации, а с проявлением конфликта регуляторных процессов пролиферации и дифференцировки. Карциномы можно рассматривать как aberrантное выражение процессов самовосстановления, ибо злокачественные стволовые клетки обладают неограниченной способностью к пролиферации, но ограниченной — к дифференцировке [3, 4].

Сложная взаимосвязь между процессами дифференцировки, трансформации и прогрессии опухолей окончательно не выяснена. Злокачественная трансформация блокирует дальнейшее дозревание стволовых и полустволовых

клеток, которые находятся на узловых стадиях дифференцировки, и останавливает ее на той стадии коммитированного предшественника, на которой она происходит. Для карцином характерно снижение уровня дифференцировки при прогрессии опухоли, как необходимого условия инвазивности и метастазирования [5, 6].

Исследования *in vitro* свидетельствуют, что в отличие от лейкозов, для большинства солидных опухолей, в том числе колоректальной аденокарциномы, приобретение более дифференцированного фенотипа не приводит к потере злокачественных свойств [6, 7]. В то же время, в частности при колоректальном раке, предполагается существование соответствия между снижением уровня дифференцировки опухолей и повышением степени злокачественности [8].

Регуляция функциональной активности ионтранспортирующих АТФ-аз направлена на приспособление ионного гомеостаза и сопряженных сигнальных путей к регуляторным потребностям злокачественного роста в соответствии с морфо-функциональным состоянием клеток [9]. В связи с ключевой функцией Na^+, K^+ -АТФ-азы, этот специфичный фермент плазматических мембран клеток животных является мишенью при развитии ряда патологий,

в том числе рака, или подвержен адаптивному контролю, механизм которого заключается в избирательной регуляции на уровне изоферментного ансамбля [9, 10]. В свою очередь, ферментативная активность зависит от структурных перестроек плазматической мембраны или контролируется на уровне экспрессии изоформ α - и β -субъединиц и/или их сборки в активный $\alpha\beta$ -гетеродимерный комплекс. Установлено, что ген каталитической α -субъединицы Na^+, K^+ -АТФ-азы относится к группе генов, для которых выявлена избирательная даун-регуляция экспрессии при раке толстой кишки [11] и желудка [12]. С учетом собственных исследований и данных литературы является актуальным проанализировать возможность взаимосвязи между функциональным состоянием Na^+, K^+ -АТФ-азы, уровнем дифференцировки опухоли, адгезивными свойствами и интенсивностью злокачественного процесса. Потенциальная молекулярная взаимосвязь между этими параметрами базируется на исследованиях последних лет [13–16]. В частности, на клеточных культурах карцином толстой кишки, почек, поджелудочной и молочной желез продемонстрирована необходимость координированной экспрессии Е-кадгерина и $\beta 1$ -субъединицы Na^+, K^+ -АТФ-азы в обеспечении полярной структуры клеток эпителия [14, 15]. Такая структура присуща также клеткам высокодифференцированной аденокарциномы.

В предыдущей работе нами были исследованы условия надежного определения полной Na^+, K^+ -АТФ-азной активности в мембранных препаратах из условно нормальной слизистой оболочки и карцином толстой кишки человека на фоне высокой базальной Mg^{2+} -АТФ-азной активности [17]. Выявлено снижение Na^+, K^+ -АТФ-азной активности при колоректальном раке. Цель настоящей работы заключалась в изучении активности Na^+, K^+ -АТФ-азы в колоректальной аденокарциноме с разной степенью дифференцировки. Такая постановка вопроса необходима для выяснения предполагаемых особенностей функционального состояния фермента в злокачественных клетках, различающихся по степени анаплазии, при сравнении с нормальными эпителиальными клетками с присущим им полярным фенотипом [9].

Материалы и методы

Работа выполнена на операционном материале 16 больных (12 мужчин, 4 женщины, возраст 63 ± 3 года) с первичными опухолями ободочной и прямой кишки, находившихся

на лечении в Институте онкологии АМН Украины. Работа выполнена в соответствии с требованиями комиссии по этике Института онкологии АМН Украины. Больные были проинформированы и дали согласие на проведение исследований. Предоперационной химио- или лучевой терапии больные не подвергались. Согласно классификации TNM у пациентов был диагностирован рак II и III клинических стадий, гистологический тип опухолей – аденокарцинома. Была использована шкала дифференцировки опухолей ВОЗ, где G1 – высокодифференцированная, G2 – умеренно дифференцированная, G3 – низкодифференцированная и G4 – недифференцированная аденокарцинома [8]. Опухоли с высокой степенью дедифференцировки G3 и G4 рассматриваются как высокозлокачественные опухоли, характеризуются быстротой роста и распространения, в отличие от низкозлокачественных опухолей G1. Характеристики опухолей в соответствии с принципами международной классификации ВОЗ приведены в таблице.

Биохимические исследования проведены на постмитохондриальной мембранной фракции [17], полученной из образцов опухолевой и условно нормальной ткани (УНТ) макроскопически неизмененной слизистой оболочки, прилегающей к опухоли, и использованной в качестве контроля.

Определение Na^+, K^+ -АТФ-азной активности в мембранных препаратах проведено в соответствии с методическими особенностями, исследованными ранее в работе [17].

Достоверность различий между средними величинами оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Как следует из рис. 1, *A* Na^+, K^+ -АТФ-азная активность в везикулированных мембранных препаратах из УНТ и аденокарциномы чувствительна к демаскирующему действию дигитонина. В соответствии с ранее полученными данными [17] в таких условиях предобработки мембран детергентом в оптимальных концентрациях выявляется полная ферментативная активность препаратов. Поэтому для оценки ее изменений в сравнительных исследованиях были использованы пермеабиллизированные дигитонином препараты. В суммарной выборке выявлено достоверное снижение Na^+, K^+ -АТФ-азной активности на 37% в мембранной фракции из колоректальной аденокарциномы по сравнению с таковой для УНТ (рис. 1, *A*). Это дает основание утверждать, что снижение

Характеристика колоректальних опухолей

№ препарата	Гистологический тип опухоли*	TNM	Степень дифференцировки	Клиническая стадия	Участок толстой кишки
1	АК	T3N0M0	G2	II, Dukes B	СК
2	АК	T3N0M0	G1	II, Dukes B	СК
3	АК	T3N0M0	G2	II, Dukes B	ВК
4	АК	T3N0M0	G3	II, Dukes B	ВК
5	АК	T3N0M0	G3	II, Dukes B	СК
6	АК	T3N0M0	G3	II, Dukes B	ПУОК
7	АК	T4N0M0	G4	II, Dukes B	ПУОК
8	АК	T3N1M0	G2	III, Dukes C	ВК
9	АК	T3N1M0	G3	III, Dukes C	ВК
10	АК	T3N2M0	G2	III, Dukes C	СК
11	АК	T4N1M0	G3	III, Dukes C	СК
12	АК	T3N0M0	G2	II, Dukes B	ПК
13	АК	T3N0M0	G2	II, Dukes B	ПК
14	АК	T4N0M0	G2	II, Dukes B	ПК
15	АК	T4N0M0	G3	II, Dukes B	ПК
16	АК	T4N0M0	G2	II, Dukes B	ПК

* АК – аденокарцинома: недифференцированная (G4), низкодифференцированная (G3), умеренно дифференцированная (G2), высокодифференцированная (G1); СК – сигмовидный, ВК – восходящий отделы и ПУОК – печеночный угол ободочной кишки, ПК – прямая кишка.

активности данного фермента характерно для мембранных препаратов из колоректальной аденокарциномы и может быть отражением его функционального состояния в плазматических мембранах опухолевых клеток.

Далее, в пределах исследуемой выборки (таблица) сравнительный анализ данных был проведен для мембранных препаратов, полученных из опухолей при клинических стадиях рака II и III (рис. 1, Б) или различающихся по степени дифференцировки (см. Материалы и методы): недифференцированная (G4) и низкодифференцированная (G3) аденокарцинома в сравнении с умеренно (G2) и высокодифференцированной (G1) аденокарциномой (рис. 1, В). В последнем случае, то есть в сравнительных исследованиях, учитывающих степень дифференцировки, аденокарциномы были подразделены на две подгруппы: G1, G2 и G3, G4 (представлены преимущественно умеренно и низкодифференцированными опухолями соответственно). Согласно принципам международной классификации опухолей ВОЗ эти подгруппы различаются также и по степени злокачественности.

Во всех случаях наблюдается достоверное снижение ферментативной активности по сравнению с соответствующей выборкой для УНТ (рис. 1, Б и В). При этом, однако, не наблюдаются различия в активности Na^+, K^+ -АТФ-азы в препаратах, полученных у больных с клиническими стадиями II и III (рис. 1, Б). Следует подчеркнуть, что согласно международной TNM классификации при колоректальном раке различия между названными стадиями болезни определяются отсутствием или наличием, соответственно, метастазирования в регионарные узлы (N), то есть III клиническая стадия характеризуется проявлением процесса диссеминации опухоли [8]. При этом размеры опухоли и характер инвазии в окружающие ткани являются сходными для двух стадий (параметр соответствовал T3 и T4).

В то же время, только при сравнении подгрупп опухолей с разной степенью дифференцировки (G4,3 и G2,1) выявляются достоверные различия величин Na^+, K^+ -АТФ-азной активности в опухолевых препаратах (рис. 1, В). Уровень активности фермента тем выше, чем выше степень дифференцировки аденокарциномы (от G4,3 к G2,1).

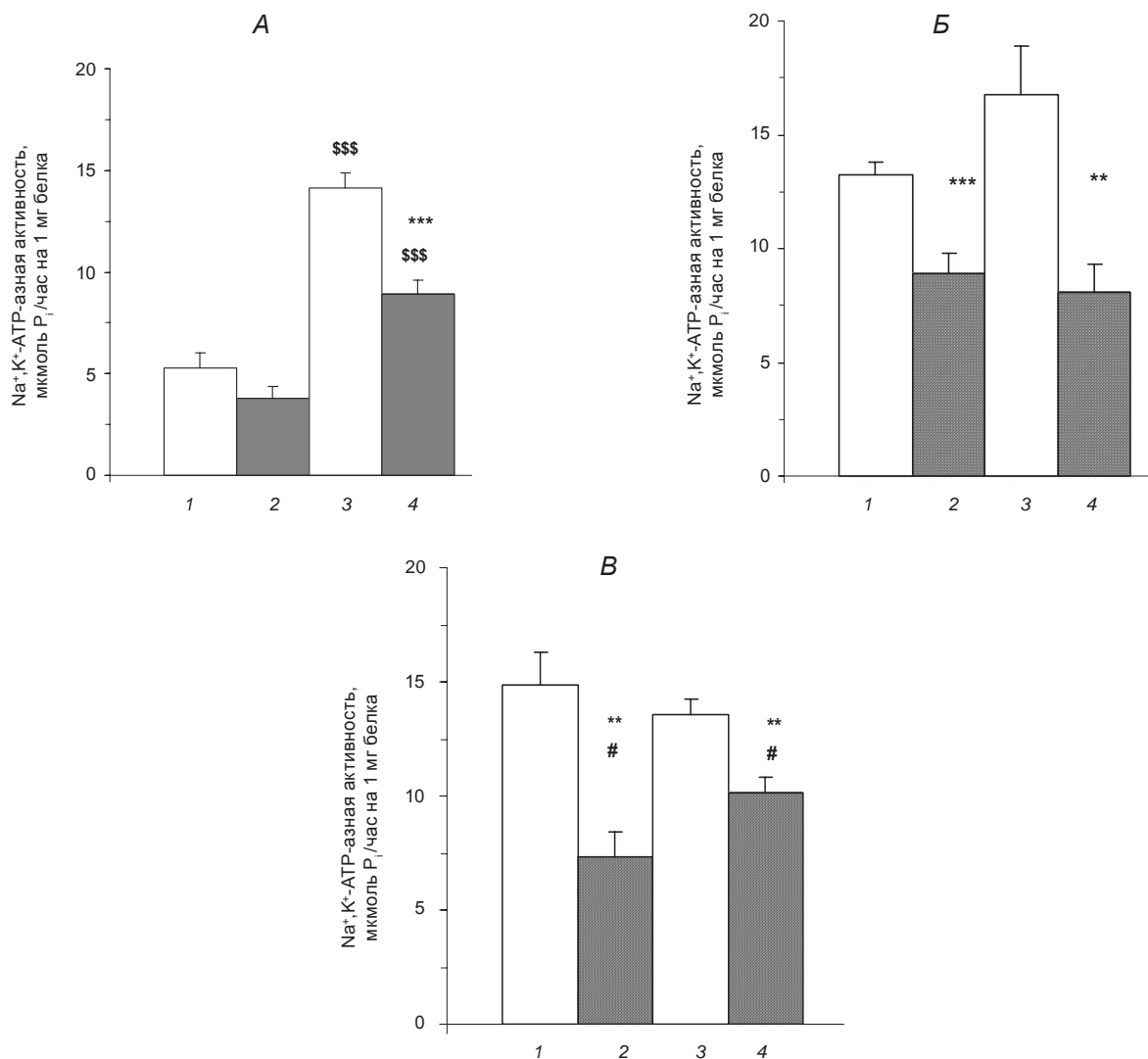


Рис. 1. Na⁺,K⁺-АТФ-азная активность в мембранных препаратах из условно нормальной ткани (УНТ – 1,3) макроскопически неизменной слизистой оболочки и аденокарциномы (АК – 2,4) толстой кишки человека ($M \pm m$): базальная активность без обработки препаратов дигитонином (А, 1, 2; $n = 14$); полная активность после предобработки препаратов детергентом (А, 3, 4; $n = 16$), полученных на II (Б, 1, 2; $n = 12$) и III (Б, 3, 4; $n = 4$) клинических стадиях; недифференцированная (G4) и низкодифференцированная (G3) аденокарцинома (В, 1, 2; $n = 7$); умеренно (G2)- и высокодифференцированная (G1) аденокарцинома (В, 3, 4; $n = 9$); $^{sss}P < 0,001$ относительно не обработанных дигитонином препаратов; $^{**}P < 0,01$; $^{***}P < 0,001$ относительно соответствующей выборки УНТ; $^{\#}P < 0,05$ между препаратами АК G4,3 и АК G2,1 (В, 2 и В, 4, соответственно).

Следует учитывать, что в качестве контроля используется УНТ слизистой оболочки, окружающей опухоль, которая, в свою очередь, может характеризоваться особенностями функционального состояния Na⁺,K⁺-АТФ-азы. Известно, что при экспериментальном колоректальном раке ингибирование Na⁺,K⁺-АТФ-азы в колоноцитах предшествует проявлению гистологических изменений в слизистой оболочке [18]. Поэтому для характеристики про-

грессирующих в опухолях биохимических изменений АТФ-азной активности требуется сравнение с соответствующей парной УНТ. При таком анализе экспериментальных данных, как видно из рис. 2, уменьшение Na⁺,K⁺-АТФ-азной активности в опухолевой ткани по сравнению с УНТ усиливается с понижением дифференцированности опухолевых клеток в исследуемых экспериментальных подгруппах. В дифференцированных опухолях (подгруппа

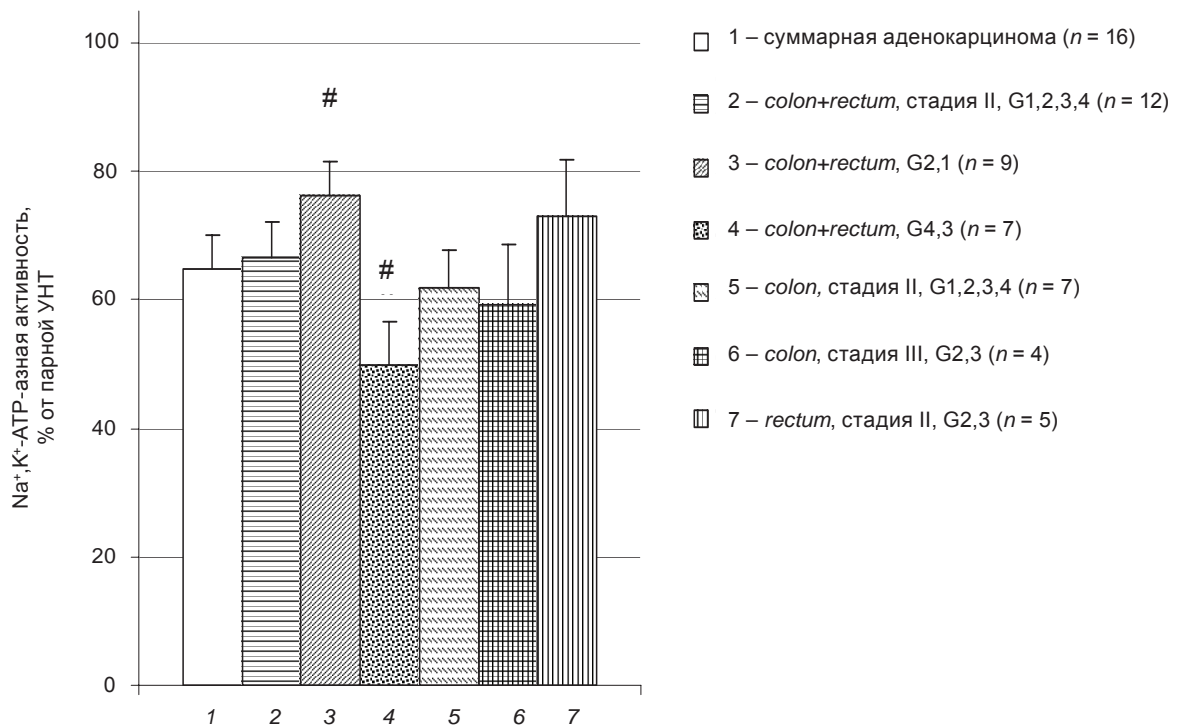


Рис. 2. Изменения Na^+,K^+ -АТФ-азной активности в мембранных препаратах колоректальной аденокарциномы человека (% от условно нормальной ткани макроскопически неизменной слизистой оболочки, $M \pm m$); # $P < 0,001$ между колонками 3 и 4. Обозначения клинических стадий рака и степени дифференцировки аденокарциномы как на рис. 1; colon – ободочная кишка, rectum – прямая кишка.

G2,1) ферментативная активность умеренно снижена на 24% по сравнению с контрольными величинами для УНТ, что соответствует уровню уменьшения Na^+,K^+ -АТФ-азной активности в умеренно и высокодифференцированных колоректальных аденокарциномах [16]. При низкой степени дифференцировки (подгруппа G4,3) активность составляет 50% от таковой в УНТ.

Таким образом, полученные результаты указывают на определенные закономерности, в пределах которых проявляются особенности активности Na^+,K^+ -АТФ-азы в мембранных препаратах из клеток опухолей с разной степенью дифференцировки. Это может быть отражением особенностей функционирования Na^+,K^+ -АТФ-азы при колоректальном раке. Можно полагать, что функциональная организация Na^+,K^+ -АТФ-азного комплекса в плазматической мембране клеток аденокарцином определяется уровнем дифференцировки опухоли в соответствии с конкретными особенностями морфологии злокачественных клеток и потребностями в регуляции натрий-калиевого гомеостаза при злокачественном росте. Очевидно наибольшая активность Na^+,K^+ -АТФ-азы

необходима при функционировании специализированного поляризованного эпителиального фенотипа, как одно из важных условий, обеспечивающих направленный трансэпителиальный транспорт ионов и метаболитов, и снижается при возрастании степени дедифференцировки аденокарциномы и диффузном распределении фермента в плазматической мембране.

Потенциальные молекулярные механизмы такой взаимосвязи получают объяснение в исследованиях последних лет [13–16].

Очевидно, что функциональная активность Na^+,K^+ -АТФ-азы в мембране проявляется только при условии корректного фолдинга $\alpha\beta$ -гетеродимерного комплекса фермента и может регулироваться на уровне экспрессии каждой из субъединиц [9]. Снижение экспрессии гена α -субъединицы выявлено в колоректальной карциноме [11]. Установлено, что для обеспечения поляризованной эпителиальной морфологии и полярного распределения Na^+,K^+ -АТФ-азы в плазматической мембране необходима регуляторная взаимосвязь между адгезионной молекулой E-кадгерином и $\beta 1$ -субъединичной изоформой Na^+,K^+ -АТФ-азы.

На клеточных культурах низкодифференцированных аденокарцином, в том числе опухолевых клетках толстой кишки, выявлено, что коэкспрессия этих гликопротеинов снижена и контролируется транскрипционным фактором Snail [14].

Известно, что E-кадгерину (основному адгезионному белку зоны слипания эпителия), принадлежит важная роль в контроле подвижности и миграции клеток. Его участие в системе координированных сигнальных путей, опосредуемых протоонкогенами и опухолевыми супрессорами, вносит вклад в процессы контроля клеточной пролиферации и дифференцировки эпителиоцитов [7].

В соответствии с результатами исследований, проведенных на операционном материале аденокарцином, полагают [16], что в обеспечении ионных условий, необходимых для поддержания железистой структуры умеренно и высокодифференцированной колоректальной аденокарциномы человека, характеризующейся эпителиоподобной полярностью, важное значение принадлежит механизму переключения биосинтеза изоформ каталитической субъединицы Na^+, K^+ -АТФ-азы с $\alpha 1$ к $\alpha 3$. Это обуславливает умеренное снижение Na^+, K^+ -АТФ-азной активности в дифференцированной аденокарциноме толстой кишки по сравнению с таковой в УНТ, что согласуется с результатами наших исследований.

Таким образом, функциональное состояние Na^+, K^+ -АТФ-азного комплекса, связанное с особенностями опухолевого морфогенеза, может определять специфику регуляции натрий-калиевого гомеостаза в аденокарциноме разной степени дифференцировки. В свою очередь, уровень активности Na^+, K^+ -АТФ-азы может обеспечивать регуляторный контроль сигнальных путей, опосредуемых RhoA GTP-азами, активность которых ингибируется при повышении внутриклеточной концентрации Na^+ . Последние, как известно, участвуют в регуляции процессов реорганизации цитоскелета и перегруппировки мембранных белков, связанных с актином, необходимых для формирования эпителиальной морфологии [13]. В то же время сходство активности Na^+, K^+ -АТФ-азы на II и III клинических стадиях в наших исследованиях, очевидно, отражает тот факт, что генерализация злокачественного процесса не сопровождается изменением функционального состояния фермента.

Таким образом, при колоректальной аденокарциноме снижение Na^+, K^+ -АТФ-азной

активности в мембранных препаратах проявляется в соответствии с повышением степени дедифференцировки опухоли в следующей последовательности: УНТ → высоко- и умеренно дифференцированная аденокарцинома → низко- и недифференцированная аденокарцинома.

Можно предположить, что установленные в наших исследованиях закономерности изменения Na^+, K^+ -АТФ-азной активности фермента в мембранных препаратах отражают механизм, обеспечивающий регуляцию ионного гомеостаза в колоректальной аденокарциноме человека с разной степенью дифференцировки.

ОСОБЛИВОСТІ Na^+, K^+ -АТФ-азної АКТИВНОСТІ В АДЕНОКАРЦИНОМІ ТОВСТОЇ КИШКИ ЛЮДИНИ

О. А. Капля¹, А. Г. Кудрявцева²,
С. В. Хижняк², Д. С. Осинський³,
Є. М. Дьомін³

¹Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна
НАН України, Київ;
e-mail: kaplya@biochem.kiev.ua;

²Київський національний університет
імені Тараса Шевченка, Україна;

³Інститут онкології АМН України, Київ

Для оцінки функціональних змін ферменту досліджено активність Na^+, K^+ -АТФ-азы в мембранній фракції з аденокарциномою товстої кишки людини на II та III стадіях розвитку раку (за TNM класифікацією) з клітинами різного ступеня диференціювання. В мембранних препаратах клітин пухлин виявлено зниження ферментативної активності порівняно з такою в умовно нормальній тканині (УНТ) з макроскопічно незміненою слизовою оболонкою. Такі зміни Na^+, K^+ -АТФ-азної активності виявляються більшою мірою в пухлинах низького ступеня диференціювання і менш виражені – в помірно- та високодиференційованих пухлинах. В той самий час без урахування ступеня диференціювання пухлин відмінності між активністю ферменту в мембранах клітин пухлин II та III стадій розвитку раку не виявляються. Зроблено припущення про існування особливостей функціонального стану Na^+, K^+ -АТФ-азы в колоректальних аденокарциномах людини різного ступеня диференціювання.

Ключові слова: Na^+, K^+ -АТФ-аза, колоректальна аденокарцинома, диференціювання клітин.

**Na⁺,K⁺-ATPase ACTIVITY
CHARACTERISTICS IN HUMAN
COLORECTAL ADENOCARCINOMA**

A. A. Kaplya¹, A. G. Kudryavceva²,
S. V. Hizhnyak², D. S. Osinsky³,
E. N. Dyomin³

¹Palladin Institute of Biochemistry, National
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: kaplya@biochem.kiev.ua;

²Taras Shevchenko National University, Kyiv;

³Institute of Oncology, Academy of
Medical Sciences of Ukraine, Kyiv

S u m m a r y

To evaluate the enzyme functional changes the Na⁺,K⁺-ATPase activity in membrane fraction of human colorectal adenocarcinoma at II and III cancer stages (according to TNM classification) of varying degrees of differentiation has been investigated. The decrease of the Na⁺,K⁺-ATPase activity in comparison with conditionally normal tissue of macroscopically unchanged mucosa was revealed in the tumor membrane preparations. Such changes of the Na⁺,K⁺-ATPase activity were higher at low differentiation grade and were less pronounced in moderately and highly differentiated adenocarcinomas. At the same time the changes in Na⁺,K⁺-ATPase activity have not been revealed between tumor membrane preparations at studied cancer stages when the degree of differentiation was not taken into account. It is supposed that Na⁺,K⁺-ATPase functional specificity occurs in colorectal adenocarcinomas and it is associated with tumor differentiation.

Key words: Na⁺,K⁺-ATPase, colorectal adenocarcinoma, cell differentiation.

1. Nelson W. J. // Science. — 1992. — **258**, N 5084. — P. 948–955.

2. McNeill H., Ozawa M., Kemler R., Nelson W. J. // Cell. — 1990. — **62**, N 2. — P. 309–316.
3. Pierce G. B., Speers W. C. // Cancer Res. — 1988. — **48**, N 8. — P. 1996–2004.
4. Hanahan D., Weinberg R. A. // Cell. — 2000. — **100**, N 1. — P. 57–70.
5. Sell S., Pierce G. B. // Lab. Invest. — 1994. — **70**, N 1. — P. 6–22.
6. Абелев Г. И. // Биохимия. — 2000. — **65**, № 1. — С. 127–138.
7. Копнин Б. П. // Там же. — С. 5–33.
8. *TNM класифікація злокачественных опухолей. 5-е издание / Перевод и редакция проф. Н. Н. Блинова.* — СПб, 1990. — 190 с.
9. Капля А. А., Хижняк С. В., Кудрявцева А. Г. и др. // Укр. біохім. журн. — 2006. — **78**, № 1. — С. 29–42.
10. Капля А. А., Мищук Д. О. // Укр. біохім. журн. — 2001. — **73**, № 5. — С. 17–22.
11. Cao J., Cai X., Zheng L. et al. // J. Cancer Res. Clin. Oncol. — 1997. — **123**, N 8. — P. 447–451.
12. Jung M. H., Kim S. C., Jeon G. A. et al. // Genomics. — 2000. — **69**, N 3. — P. 281–286.
13. Rajasekaran S. A., Palmer L. G., Moon S. Y. et al. // Mol. Biol. Cell. — 2001. — **12**, N 12. — P. 3717–3732.
14. Espineda C. E., Chang J. H., Twiss J. et al. // Ibid. — 2004. — **15**, N 3. — P. 1364–1373.
15. Rajasekaran S. A., Gopal J., Espineda C. et al. // Pancreas. — 2004. — **29**, N 3. — P. e 77–83.
16. Sakai H., Suzuki T., Maeda M. et al. // FEBS Lett. — 2004. — **563**, N 1–3. — P. 151–154.
17. Капля А. А., Кудрявцева А. Г., Горчев В. Ф. и др. // Укр. біохім. журн. — 2006. — **78**, № 2. — С. 142–148.
18. Davies R. J., Sandle G. I., Thompson S. M. // Cancer Biochem. Biophys. — 1991. — **12**, N 2. — P. 81–94.

Получено 03.09.2006