

Д. Р. Шеремета, О. П. Свердан, Д. З. Воробець, Р. В. Фафула, З. Д. Воробець
ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ДАНИЛА ГАЛИЦЬКОГО

ЗРОСТАННЯ Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазної АКТИВНОСТІ КЛІТИН ЯК ОДИН ІЗ МЕХАНІЗМІВ АНТИПРОЛІФЕРАТИВНОЇ ДІЇ МІТОМІЦИНУ С ПРИ ЛІКУВАННІ СТРИКТУРИ УРЕТРИ

Вступ. У клініці антипроліферативну активність мітоміцину С використовують для запобігання утворенню рубців у тканинах, оскільки рубцеві зміни є одним з ускладнень при оперативних втручаннях. В урології досить часто трапляються стриктури уретри, це, зокрема, пов'язано з катетеризацією, трансуретальною хірургією, інфекцією сечовивідних шляхів і травмами. Рецидиви після невдалої уретропластики становлять 18–40 %.

Мета дослідження – вивчити вплив мітоміцину С на Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазну активність плазматичної мембрани та ендоплазматичного ретикулула лімфоцитів периферичної крові.

Методи дослідження. Дослідження проводили на лімфоцитах периферичної крові практично здорових чоловіків, оскільки лімфоцити вважають "метаболічним дзеркалом" організму і вони оперативно реагують на всі зовнішні та внутрішні впливи. Визначали загальну Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазну активність лімфоцитів крові при 37 °С в інкубаційному середовищі такого складу (мМ): 150 KCl; 0,05 CaCl_2 ; 5 MgCl_2 ; 5 АТФ; 1 NaN_3 (інгібітор мітохондріальної АТФази); 1 оубаїн (інгібітор Na^+ , K^+ -АТФази); 20 Нерес-Трис-буфер (pH=7,4). Для розділення загальної Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазної активності на компоненти, такі, як тапсигаргіночутлива Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФаза плазматичної мембрани (ПМ) і тапсигаргіночутлива Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФаза ендоплазматичного ретикулула (ЕПР), до стандартного Ca^{2+} - та Mg^{2+} -вмісного середовища інкубації додавали інгібітор Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФази ЕПР – тапсигаргін (0,1 мкМ).

Результати й обговорення. При дії різних концентрацій мітоміцину С величина Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазної активності ПМ дозозалежно зростала і найвищою була при концентрації 10^{-3} М – ($3,98 \pm 0,42$) мкмоль P_i /хв на 1 мг протеїну ($p < 0,05$), тобто в 1,36 раза. Тапсигаргіночутлива компонента Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФази лімфоцитів у контролі становила ($2,19 \pm 0,27$) мкмоль P_i /хв на 1 мг протеїну, а зі збільшенням концентрації мітоміцину С у середовищі інкубації вона зросла до ($2,97 \pm 0,29$) мкмоль P_i /хв на 1 мг протеїну ($p < 0,05$), тобто в 1,35 раза. Початкова максимальна швидкість гідролізу АТФ Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазами ПМ та ЕПР лімфоцитів при дії 10^{-3} М мітоміцину С збільшилася в 1,3 раза.

Висновки. Зростання Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазної активності плазматичної мембрани й ендоплазматичного ретикулула при дії мітоміцину С свідчить про те, що він може запобігати перевантаженню цитозолу іонами кальцію і, таким чином, інгібувати проліферативні процеси та утворення стриктур. Активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФаз ПМ та ЕПР лімфоцитів крові підвищується за рахунок збільшення числа обертів ензиму, але не через зростання афінності до субстрату.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: мітоміцин С; стриктура уретри; Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФаза; лімфоцити; плазматична мембрана; ендоплазматичний ретикулум.

ВСТУП. У клініці широко застосовують препарат "Мітоміцин С", який є антибіотиком природного походження, виділеним із *Streptomyces caespitosus* [1, 2]. Він належить до групи алкілюючих агентів, що діють шляхом перехресного зшивання комплементарних ланцюгів ДНК з абсолютною специфічністю, і в цьому полягає його основна антипроліферативна дія [1, 3]. Мітоміцин С також проявляє максимальний ефект у пізній стадії інтерфази клітинного циклу G_1 та в ранній стадії S і тому пригнічує синтез ДНК та протеїнів [1, 3, 4]. Однак через свій

© Д. Р. Шеремета, О. П. Свердан, Д. З. Воробець, Р. В. Фафула, З. Д. Воробець, 2023.

токсичний вплив у високій концентрації він має обмежене використання як антибіотик [1, 2]. Препарат може спричиняти хромосомні розриви, і ця властивість робить його потужним канцерогеном і тератогеном. У клініці антипроліферативну активність мітоміцину С використовують для запобігання утворенню рубців у тканинах, оскільки рубцеві зміни є одним з ускладнень при оперативних втручаннях [2–7]. В урології досить часто трапляються стриктури уретри, це, зокрема, пов'язано з катетеризацією, трансуретальною хірургією, інфекцією сечовивідних шляхів і травмами. Рецидиви після невдалої уретропластики становлять 18–40 % [5–8]. Так, для лікуван-

ня чи попередження формування уретральних стриктур у постопераційний період часто застосовують протипухлинний антибіотик “Мітоміцин С” [2–4].

Здебільшого мітоміцин С вводять внутрішньовенно або внутрішньоміхурово [4], меншою мірою – підшкірно чи внутрішньом’язово.

Незважаючи на використання мітоміцину С у медицині протягом тривалого часу, механізм його дії на регуляторні системи клітини відомий мало. У цьому відношенні актуальним є вивчення впливу даного антибіотика на Ca^{2+} -транспортні системи.

Відомо, що іони кальцію (Ca^{2+}) слугують універсальним вторинним месенджером у всіх еукаріотів [9–15]. Вони виконують широкий спектр біологічних функцій у клітинах і поза ними, таких, як скорочення м’язів, рух клітин, передача нервових імпульсів, запліднення, нейрогенез, ріст і проліферація клітин. Іони кальцію також можуть регулювати активність ензимів (як кофактори) та іонних pomp і проникність іонних каналів. Крім того, Ca^{2+} беруть участь у побудові цитоскелета.

Коли нейромедіатори, гормони, фактори росту чи медикаментозні препарати стимулюють збудження клітин, внутрішньоклітинна концентрація Ca^{2+} зростає, а потім активується Ca^{2+} -сигнальний шлях. Цей шлях складається із серії молекулярно-біологічних подій, які пов’язують зовнішні стимули з відповідними реакціями в клітинах.

Концентрація іонів кальцію в цитоплазмі зазвичай утримується на дуже низькому рівні – приблизно 10^{-7} М, тоді як у позаклітинному середовищі вона становить близько 10^{-3} М [6, 9, 12, 15].

Ряд даних свідчить про те, що проліферація клітин, зокрема злоякісний ріст, пов’язана з гіперкальціємією [13, 15, 16]. Навіть незначні коливання внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} можуть призводити до активації проліферації чи загибелі клітин. У підтриманні внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} важливу роль відіграють Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФази плазматичної мембрани (ПМ) та ендоплазматичного ретикулума (ЕПР) [6, 10–12].

Мета дослідження – вивчити вплив мітоміцину С на Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазу активність плазматичної мембрани та ендоплазматичного ретикулума лімфоцитів периферичної крові.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Дослідження проводили на лімфоцитах периферичної крові практично здорових чоловіків, оскільки лімфоцити вважають “метаболічним дзеркалом” організму і вони оперативно реагують на всі зовнішні та внутрішні впливи.

Лімфоцити периферичної крові виділяли за модифікованим методом А. Youim [17]. Кров, розведена в співвідношенні 1:1 фізіологічним розчином, нашаровували у градієнті густини фікол-тріумбасту ($\rho=1,08$ г/см³) й центрифугували 20 хв при 500 g. Зняті інтерфазні кільця мононуклеарних клітин двічі відмивали впродовж 10 хв фізіологічним розчином [17, 18].

Після останнього центрифугування до осаду лімфоцитів додавали невелику кількість фізіологічного розчину, ресуспендували та фарбували за допомогою трипанового синього. Підрахунок кількості живих і мертвих клітин проводили в камері Горяєва [17]. 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 [19]. Лімфоцити крові інкубували впродовж 10 хв при помірному струшуванні в розчині, який містив сапонін у концентрації 0,2 % (оптимальна концентрація).

Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазу активність лімфоцитів крові визначали, реєструючи процес гідролізу АТФ за накопиченням P_i [12, 20]. Загальну Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазу активність лімфоцитів крові визначали при 37 °С в інкубаційному середовищі (об’єм – 1 мл) такого складу (мМ): 150 KCl; 0,05 CaCl_2 ; 5 MgCl_2 ; 5 АТФ; 1 NaN_3 (інгібітор мітохондріальної АТФази); 1 оубаїн (інгібітор Na^+ , K^+ -АТФази); 20 Нерес-Трис-буфер (pH=7,4).

Для розділення загальної Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазної активності на компоненти, такі, як тапсигаргінонечутлива Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФаза плазматичної мембрани і тапсигаргіночутлива Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФаза ендоплазматичного ретикулума, 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 АТФаз лімфоцитів крові визначали за тих же умов, але при відсутності CaCl_2 і з додаванням 1 мМ EGTA та 0,1 мкМ тапсигаргіну. Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазу ПМ розраховували як різницю між Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазною активністю за наявності тапсигаргіну та “базальною” Ca^{2+} -незалежною, Mg^{2+} -залежною АТФазною активністю. Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазу ЕПР оцінювали як різницю між загальною Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазною активністю і Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазною активністю за наявності тапсигаргіну. Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазу активність виражали в мкмольях P_i у перерахунок за 1 хв на 1 мг протеїну.

Після зупинки ензиматичної реакції “стоп-розчином” суспензію центрифугували (10 хв, 1500 g) і в отриманому супернатанті, який не містив протеїну, визначали вміст неорганічного фосфо-

ру P_i за методом W. Rathbun, V. Betlach [21]. Вміст протеїну в лімфоцитарній суміші визначали за модифікованим методом Лоурі [17].

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), стандартна похибка (m) та середнє квадратичне відхилення (σ). Достовірність змін встановлювали за t -критерієм Стьюдента. Критичні рівні достовірності при перевірці статистичних гіпотез у дослідженнях брали такими: 0,95, 0,99 та 0,999.

Результати представлено як середнє арифметичне (M) \pm стандартна похибка середнього (m). Кількість дослідів (n) відповідає кількості осіб, досліджених у кожному випадку.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Вивчення АТФ-гідролазних систем, зокрема Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФаз плазматичної мембрани та ендоплазматичного ретикулула, при патологічних процесах чи механізмах дії лікарських препаратів є актуальним, оскільки Ca^{2+} є внутрішньоклітинним месенджером і прямо чи опосередковано регулюють практично всі клітинні функції [9, 10, 12]. Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФази переносять Ca^{2+} крізь мембрану проти їх електрохімічного градієнта і, поряд із Ca^{2+} -каналами і Na^+/Ca^{2+} -обмінником, підтримують внутрішньоклітинний гомеостаз цих іонів.

У результаті проведених досліджень ми встановили, що Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазна активність ПМ, яка є тапсигаргінорезистентною, лімфоцитів практично здорових чоловіків становить $(2,92 \pm 0,28)$ мкмоль P_i /хв на 1 мг протеїну. При дії різних концентрацій мітоміцину С величина Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазної активності ПМ дозозалежно зростала і найвищою була при концентрації 10^{-3} М – $(3,98 \pm 0,42)$ мкмоль P_i /хв на 1 мг протеїну ($p < 0,05$), тобто в 1,36 раза (рис. 1).

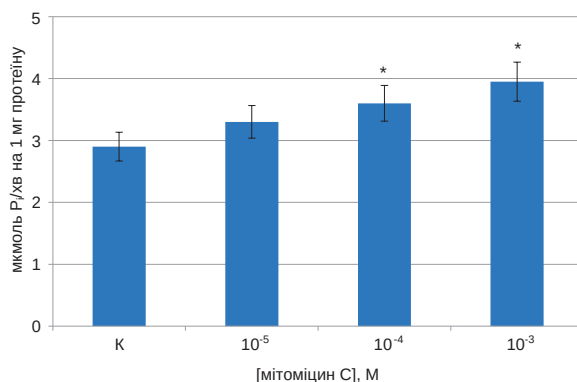


Рис. 1. Вплив мітоміцину С на Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазну активність плазматичної мембрани лімфоцитів ($M \pm m$, $n=8$). Примітка. Тут і на рисунку 2: К – контроль, без мітоміцину С.

Що стосується Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазної активності ЕПР, тобто тапсигаргіночутливої компоненти Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФази лімфоцитів, то в контролі вона становила $(2,19 \pm 0,27)$ мкмоль P_i /хв на 1 мг протеїну, а зі збільшенням концентрації мітоміцину С у середовищі інкубації вона зросла до $(2,97 \pm 0,29)$ мкмоль P_i /хв на 1 мг протеїну ($p < 0,05$), тобто в 1,35 раза (рис. 2).

Зростання Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазної активності може свідчити про зниження концентрації Ca^{2+} в цитозолі й запобігання гіперкальцифікації, що, як відомо, відбувається при проліферативних процесах і пухлинному рості [13, 16].

Переносяться Ca^{2+} проти їх електрохімічного градієнта з використанням енергії АТФ. Тому зміни концентрації цього субстрату в інкубаційному середовищі повинні впливати на швидкість АТФ-гідролазної реакції.

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

Показано, що збільшення концентрації АТФ у вказаному діапазоні призводило до поступового зростання Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазної активності як ПМ (рис. 3), так і ЕПР (рис. 4) з наступним виходом на плато. Оптимальною концентрацією для Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФ-гідролазної реакції ПМ та ЕПР є 4 мМ.

Визначення концентраційної залежності Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазної активності від АТФ свідчить про те, що в усьому діапазоні досліджуваних концентрацій субстрату активність ензиму при дії мітоміцину С в обох типах мембран була вищою порівняно з контролем.

Для з'ясування основних кінетичних параметрів гідролізу АТФ з участю Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФаз ПМ

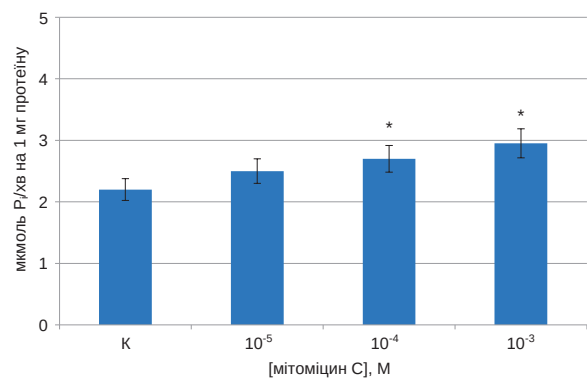


Рис. 2. Вплив мітоміцину С на Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазну активність ендоплазматичного ретикулула лімфоцитів ($M \pm m$, $n=8$).

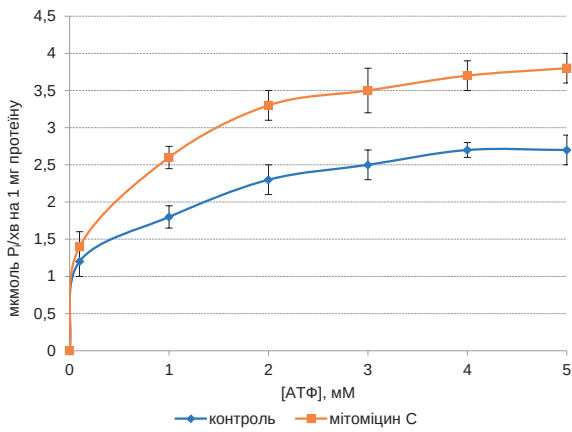


Рис. 3. Концентраційна залежність впливу аденозинтрифосфату на $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФазну активність плазматичної мембрани лімфоцитів крові в групі контролю і при дії мітоміцину С (n=8).

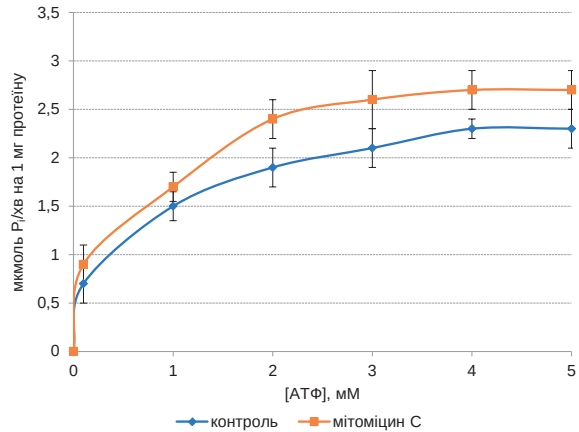


Рис. 4. Концентраційна залежність впливу аденозинтрифосфату на $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФазну активність ендоплазматичного ретикулула лімфоцитів крові в групі контролю і при дії мітоміцину С (n=8).

та ЕПР лімфоцитів крові при дії мітоміцину С і з'ясування можливого механізму зміни ензиматичної активності цих АТФ-гідролазних систем криві концентраційних залежностей лінеаризували в координатах Лайнуівера – Берка (рис. 5, 6).

Встановлено, що значення початкової максимальної швидкості гідролізу АТФ з участю $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФази ПМ лімфоцитів крові практично здорових осіб перевищувало це значення для $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФази ЕПР (рис. 7). У контролі початкова максимальна швидкість гідролізу АТФ у $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФазній реакції з участю ПМ та ЕПР становила, відповідно, $(3,1 \pm 0,3)$ і $(2,4 \pm 0,2)$ мкмоль $\text{P}_i/\text{хв}$ на 1 мг протеїну.

Початкова максимальна швидкість гідролізу АТФ $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФазою ПМ лімфоцитів крові при дії 10^{-3} М мітоміцину С зросла в 1,3 раза, до $(4,2 \pm 0,4)$ мкмоль $\text{P}_i/\text{хв}$ на 1 мг протеїну ($p < 0,05$). При дії мітоміцину С на $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФазу

активність ЕПР початкова максимальна швидкість реакції збільшилася в 1,3 раза, до $(3,2 \pm 0,4)$ мкмоль $\text{P}_i/\text{хв}$ на 1 мг протеїну ($p < 0,05$).

Водночас значення константи афінності АТФаз ПМ та ЕПР до АТФ за відсутності мітоміцину С статистично достовірно відрізнялись між собою і становили, відповідно, $(0,11 \pm 0,02)$ та $(0,22 \pm 0,03)$ мМ ($p < 0,05$), що свідчило про різну афінність обох ензиматичних систем до субстрату (рис. 8). При дії мітоміцину С у концентрації 10^{-3} М спорідненість $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФази ПМ до АТФ знижувалась ($K_{\text{АТФ}}$ зростала) в 1,5 раза ($p < 0,05$), а ЕПР – достовірно не змінювалась ($p > 0,05$).

Отримані величини константи афінності перебували в субмілімолярному діапазоні концентрацій, що відповідало фізіологічній концентрації $[\text{Mg АТФ}]$ у цитоплазмі клітин (0,5–5,0 мМ). Проте величини константи афінності до АТФ для $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФази ПМ лімфоцитів крові при дії мітоміцину С суттєво відрізнялись між собою.

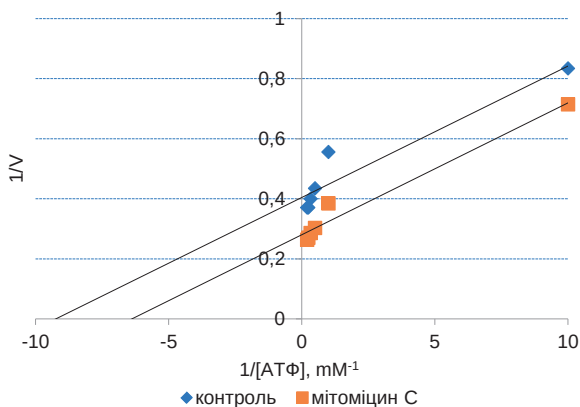


Рис. 5. Лінеаризація концентраційних кривих впливу аденозинтрифосфату на тапсигаргінорезистентну $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФазну активність плазматичної мембрани від вмісту мітоміцину С у середовищі інкубації в координатах Лайнуівера – Берка (n=4–6; $r > 0,9$).

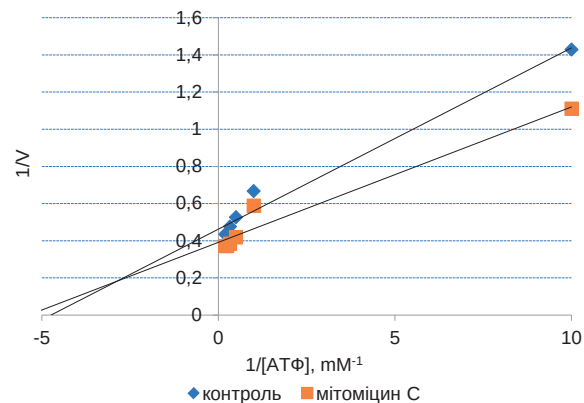


Рис. 6. Лінеаризація концентраційних кривих впливу аденозинтрифосфату на тапсигаргіночутливу $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФазну активність ендоплазматичного ретикулула від вмісту мітоміцину С у середовищі інкубації в координатах Лайнуівера – Берка (n=4–6; $r > 0,9$).

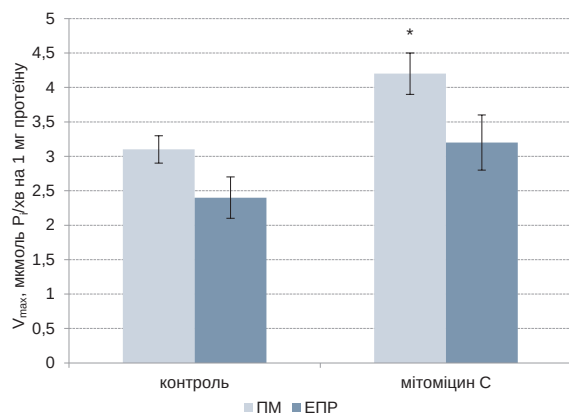


Рис. 7. Початкова максимальна швидкість гідролізу аденозинтрифосфату в Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазній реакції плазматичної мембрани та ендоплазматичного ретикулула лімфоцитів крові в групі контролю і при дії мітоміцину С ($M \pm m$, $n=8$).

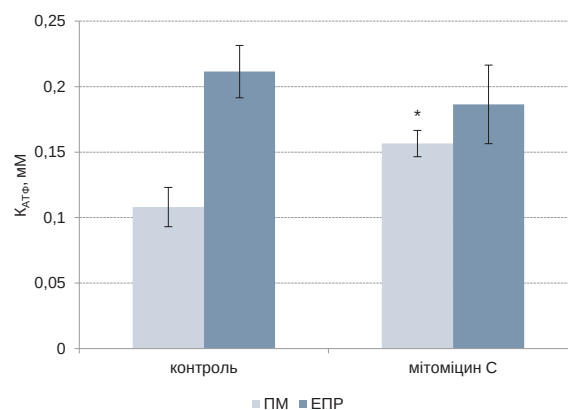


Рис. 8. Константа спорідненості (K_{ATP}) до аденозинтрифосфату Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФаз плазматичної мембрани та ендоплазматичного ретикулула лімфоцитів крові в групі контролю і при дії мітоміцину С ($M \pm m$, $n=8$).

Отже, активність досліджуваних ензиматичних систем – Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФаз ПМ та ЕПР лімфоцитів крові підвищується за рахунок зростання числа обертів ензиму (максимальна швидкість гідролізу АТФ збільшується), але не через зростання афінності Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФаз до субстрату.

ВИСНОВКИ. 1. Отримані результати щодо дії мітоміцину С, який застосовують у лікуванні стриктури уретри та для запобігання утворенню стриктур, свідчать про додатковий його вплив на регуляторні системи клітини, пов'язані, зокрема, з підтриманням гомеостазу іонів кальцію.

2. Зростання Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазної активності плазматичної мембрани та ендоплазматичного ретикулула при дії мітоміцину С вказує на те, що він може запобігати перевантаженню цитозолу іонами кальцію і, таким чином, інгібувати проліферативні процеси та утворення стриктур.

3. Активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФаз плазматичної мембрани та ендоплазматичного ретикулула лімфоцитів крові підвищується за рахунок зростання числа обертів ензиму (максимальна швидкість гідролізу АТФ збільшується), але не через зростання афінності до субстрату.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Al-Otaibi W. A. Cytotoxicity and apoptosis enhancement in breast and cervical cancer cells upon coadministration of mitomycin C and essential oils in nanoemulsion formulations / W. A. Al-Otaibi, M. H. Alkhatib, A. N. Wali // *Biomed. Pharmacother.* – 2018. – **106**. – P. 946–955.
- Park J. J. Mitomycin C in the treatment of anterior urethral strictures / J. J. Park, T. L. Kuo, C. R. Chapple // *Nature Reviews Urology.* – 2018. – **15**. – P. 717–718. DOI: 10.1038/s41585-018-0102-1.
- Effect of mitomycin – C and triamcinolone on preventing urethral strictures / O. Kurt, F. Gevher, C. M. Yazic [et al.] // *Int. Braz. J. Urol.* – 2017. – **43** (5). – P. 939–945. DOI: 10.1590/S1677-5538.IBJU.2016.0191
- Intralesional injection of mitomycin C following internal urethrotomy of *de novo* bulbar urethral stricture: New experience using a novel adjustable-tip needle / Y. A. Noureldin, A. Abdallah Fathy, S. Ahmed [et al.] // *Arab. Journal of Urology.* – 2021. – **19** (4). – P. 473–479. DOI: 10.1080/2090598X.2021.1891688.
- Contemporary urethral stricture characteristics in the developed world / E. Palminteri, E. Berdondini, P. Verze [et al.] // *Urology.* – 2013. – **81** (1). – P. 191–196. DOI: 10.1016/j.urology.2012.08.062.
- Canadian Urological Association guideline on male urethral stricture / K. F. Rourke, B. Welk, R. Kodama [et al.] // *Can. Urol. Assoc. J.* – 2020. – **14** (10). – P. 305–316. DOI: 10.5489/cuaj.6792.
- Male urethral atricture: American Urological Association Guideline / H. Wessells, K. W. Angermeier, S. Sean Elliott [et al.] // *The J. of Urology.* – 2017. – **197** (1). – P. 182–193. DOI: 10.1016/j.juro.2016.07.087
- Maciejewski C. Imaging of urethral stricture disease / C. Maciejewski, K. Rourke // *Transl. Urol.* – 2015. – **4** (1). – P. 2–9. DOI: 10.3978/j.issn.2223-4683.2015.02.03.
- Berridge M. J. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling / M. J. Berridge, M. D. Bootman, H. L. Roderick // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2003. – **7**. – P. 517–529.

10. Bootman M. D. Calcium signaling / M. D. Bootman // *Cold Spring Harb Perspect Biol.* – 2012. – 4 (7). – P. a011171. DOI: 10.1101/cshperspect.a011171
11. Feske S. Calcium signalling in lymphocyte activation and disease / S. Feske // *Nat. Rev. Immunol.* – 2007. – 7. – P. 690–702.
12. Біохімічні властивості та регуляція Ca^{2+} -транспортувальних систем мембранних структур гладеньком'язових клітин / [С. О. Костерін, Л. Г. Бабіч, С. Г. Шликов та ін.]. – К. : Наукова думка, 2017. – 210 с.
13. Wu I. Calcium signaling in cancer progression and therapy / I. Wu, W. Lian, L. Zhao // *The FEBS Journal.* – 2021. – 288 (21). – P. 6187–6205. DOI: 10.1111/febs.16133
14. Yao J. Distinct cellular states determine calcium signaling response / J. Yao, A. Pilko, R. Wollman // *Molecular Systems Biology.* – 2016. – 12 (12). – P. 894. DOI: 10.15252/msb.20167137
15. Calcium homeostasis and cancer: insights from endoplasmic reticulum-centered organelle communications / S. Zhena, X. Wang, D. Zhao [et al.] // *Trends in Cell Biology.* – 2022. – 1858. – P. 1–12. DOI: 10.1016/j.tcb.2022.07.004
16. Revankar C. Altered Ca^{2+} homeostasis in polymorphonuclear leukocytes from chronic myeloid leukaemia patients / C. Revankar, S. H. Advani, N. R. Naik // *Mol. Cancer.* – 2006. – 275. – P. 55–65.
17. Лаповець Л. Лабораторна імунологія / Л. Лаповець, Б. Луцик. – К. : Арал, 2004. – 173 р.
18. Mishell B. B. Selected methods in cellular immunology / B. B. Mishell, S. M. Shiigi. – San Francisco; W. H. Freeman and Company. – 1980. – 486 p.
19. Методологічний підхід до вивчення ензиматичного спектру лімфоцитів при патологічних станах з використанням детергента сапоніну (ультраструктурне дослідження) / Р. В. Фафула, У. П. Єфремова, Н. Е. Личковська [та ін.] // *Вісн. проблем біології і медицини.* – 2012. – № 4 (1). – С. 163–166.
20. Inhibition of plasma membrane Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase by calixarene sulfonylamidines. structure-activity relationship / O. A. Shkrabak, T. O. Veklich, R. V. Rodik [et al.] // *Ukrainian Biochemical Journal.* – 2022. – 94 (4). – P. 18–35.
21. Rathbun W. Estimation of enzymically produced orthophosphate in the presence of cysteine and adenosine triphosphate / W. Rathbun, V. Betlach // *Anal. Biochem.* – 1969. – 28. – P. 436–447.

REFERENCES

1. Al-Otaibi, W.A., Alkhatib, M.H., Wali, A.N. (2018). Cytotoxicity and apoptosis enhancement in breast and cervical cancer cells upon coadministration of mitomycin C and essential oils in nanoemulsion formulations. *Biomed. Pharmacother.*, 106, 946-955.
2. Park, J.J., Kuo, T.L., Chapple, C.R. (2018). Mitomycin C in the treatment of anterior urethral strictures. *Nature Reviews Urology*, 15, 717-718. DOI: 10.1038/s41585-018-0102-1.
3. Kurt, O., Gevher, F., Yazic, C.M. (2017). Effect of mitomycin - C and triamcinolone on preventing urethral strictures. *Int. Braz. J. Urol.*, 43 (5), 939-945. DOI: 10.1590/S1677-5538.IBJU.2016.0191.
4. Nouredin, Y.A., Abdallah Fathy, A., Ahmed, S. et al. (2021). Intralesional injection of mitomycin C following internal urethrotomy of *de novo* bulbar urethral stricture: New experience using a novel adjustable-tip needle. *Arab. Journal of Urology*, 19 (4), 473-479. DOI: 10.1080/2090598X.2021.1891688.
5. Palminteri, E., Berdondini, E., Verze, P., De Nunzio, C., Vitarelli, A., Carmignani, L. (2013). Contemporary urethral stricture characteristics in the developed world. *Urology*, 81 (1), 191-196. DOI: 10.1016/j.urology.2012.08.062.
6. Rourke, K.F., Welk, B., Kodama, R. et al. (2020). Canadian Urological Association guideline on male urethral stricture. *Can. Urol. Assoc.*, 14 (10), 305-316. DOI: 10.5489/cuaj.6792.
7. Wessells, H., Angermeier, K.W., Sean Elliott, S., Christopher, M. Gonzalez, C.M. et al. (2017). Male Urethral Stricture: American Urological Association Guideline. *The J. of Urology*, 197 (1), 182-193. DOI: 10.1016/j.juro.2016.07.087
8. Maciejewski, C., Rourke, K. Imaging of urethral stricture disease (2015). *Transl. Urol.*, 4 (1), 2-9. DOI: 10.3978/j.issn.2223-4683.2015.02.03.
9. Berridge, M.J., Bootman, M.D., Roderick, H.L. (2003). Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 7, 517-529.
10. Bootman, M.D. (2012). Calcium Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, 4 (7), a011171. DOI: 10.1101/cshperspect.a011171
11. Feske, S. (2007). Calcium signalling in lymphocyte activation and disease. *Nat. Rev. Immunol.*, 7, 690-702.
12. Kosterin, S.O., Babich, L.G., Shlykov, S.G. (2017). *Biochemical properties and regulation of Ca^{2+} transport systems of membrane structures of smooth muscle cells.* Kyiv: Naukova Dumka
13. Wu, I., Lian, W., Zhao, L. (2021). Calcium signaling in cancer progression and therapy. *The FEBS Journal*, 288 (21), 6187-6205. DOI: 10.1111/febs.16133
14. Yao, J., Pilko, A., Wollman, R. (2016). Distinct cellular states determine calcium signaling response. *Molecular Systems Biology*, 12 (12), 894. DOI: 10.15252/msb.20167137
15. Zhena, S., Wang, X., Zhao, D., Liu, H., Hu, Y. (2022). Calcium homeostasis and cancer: insights from endoplasmic reticulum-centered organelle communications. *Trends in Cell Biology*, 1858, 1-12. DOI: 10.1016/j.tcb.2022.07.004
16. Revankar, C., Advani, S.H., Naik, N.R. (2006). Altered Ca^{2+} homeostasis in polymorphonuclear leukocytes from chronic myeloid leukaemia patients. *Mol. Cancer*, 275, 55-65.
17. Lapovets, L., Lutsyk, B. (2004). *Laboratory immunology.* Kyiv: Aral [in Ukrainian].

18. Mishell, B.B., Shiigi, S.M. (1980). *Selected methods in cellular immunology*. San Francisco; W.H. Freeman and Company.

19. Fafula, R.V., Yefremova, U.R., Melnyk, O.V., Vorobets, Z.D., Kulachkovskyy O.R. (2012). Methodological approach to the study of the enzymatic spectrum of lymphocytes in pathological conditions using saponin detergent (ultrastructural study). *Bulletin of Problems in Biology and Medicine*, 4(96), 163-166 [in Ukrainian].

20. Shkrabak, O.A., Veklich, T.O., Rodik, R.V., Kalchenko, V.I., Kosterin, S.O. (2022). Inhibition of plasma membrane Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase by calixarene sulfonylamidines. structure-activity relationship. *Ukrainian Biochemical Journal*, 94 (4), 18–35.

21. Rathbun, W., Betlach, V. (1969). Estimation of enzymically produced orthophosphate in the presence of cysteine and adenosine triphosphate. *Anal. Biochem.*, 28, 436-447.

D. R. Sheremeta, O. P. Sverdan, D. Z. Vorobets, R. V. Fafula, Z. D. Vorobets
DANYLO HALYTSKY LVIV NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY

INCREASE IN Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase ACTIVITY OF CELLS AS ONE OF THE MECHANISMS OF ANTIPROLIFERATIVE EFFECT OF MITOMYCIN C IN THE TREATMENT OF URETHRA STRICTURE

Summary

Introduction. In the clinic, the antiproliferative activity of mitomycin C is used to prevent the formation of scars in tissues, since scar changes are one of the complications of surgical interventions. In urology, strictures of the urethra are quite common, in particular, it is associated with catheterization, transurethral surgery, urinary tract infection, and injuries. Relapses after unsuccessful urethroplasty are 18–40 %.

The aim of the study – to investigate the effect of mitomycin C on the Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase activity of the plasma membrane and endoplasmic reticulum membranes of peripheral blood lymphocytes.

Research Methods. The study was conducted on peripheral blood lymphocytes of practically healthy men, as lymphocytes are considered the "metabolic mirror" of the body and promptly respond to all external and internal influences. Determination of the total Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase activity of blood lymphocytes was carried out at 37 °C in the incubation medium of the following composition (mM): 150 KCl; 0.05 CaCl_2 ; 5 MgCl_2 ; 5 ATP; 1 NaN_3 (mitochondrial ATPase inhibitor); 1 ouabain (inhibitor of Na^+ , K^+ -ATPase); 20 HEPES-Tris buffer (pH = 7.4). To separate the total Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase activity into components: thapsigargin-insensitive Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase of the plasma membrane (PM) and thapsigargin-sensitive Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase of the reticulum membranes (SER) were added to the standard Ca^{2+} - and Mg^{2+} -containing incubation medium SER Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase inhibitor – thapsigargin (0.1 μM).

Results and Discussion. Under the influence of different concentrations of mitomycin C, the amount of Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase activity of PM increased dose-dependently and was the highest at a concentration of 10^{-3} M (3.98 ± 0.42) $\mu\text{mol Pi/min per 1 mg of protein}$ ($p < 0.05$), i.e. 1.36 times. The thapsigargin-sensitive component of the Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase of lymphocytes in the control was (2.19 ± 0.27) $\mu\text{mol Pi/min per 1 mg of protein}$, and with an increase in the concentration of mitomycin C in the incubation medium it increased to (2.97 ± 0.29) $\mu\text{mol Pi/min per 1 mg of protein}$ ($p < 0.05$), i.e. 1.35 times. The initial maximum rate of ATP hydrolysis by Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase PM and SER of lymphocytes under the action of 10^{-3} M mitomycin C increased by 1.3 times.

Conclusions. An increase in the Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase activities of the plasma membrane and endoplasmic reticulum under the influence of mitomycin C indicates that it can prevent overloading of the cytosol with Ca^{2+} ions and, thus, inhibit proliferative processes and the formation of strictures. An increase in the activity of Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase PM and SER membranes of blood lymphocytes occurs due to an increase in the number of revolutions of the enzyme, but not due to an increase in affinity to the substrate.

KEY WORDS: mitomycin C; urethral stricture; Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase; lymphocytes; plasma membrane; endoplasmic reticulum.

Отримано 27.01.23

Адреса для листування: З. Д. Воробець, Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, вул. Пекарська, 69, Львів, 79010, Україна, e-mail: kaf_medicalbiology@meduniv.lviv.ua.