

УДК 616.72-002-074+612.015.33.+616.153.94.

© Колектив авторів, 2012.

ПАТОГЕНЕТИЧНІ АСПЕКТИ ЙОННОГО ТА ЕНЕРГЕТИЧНОГО ГОМЕОСТАЗУ В ЛІМФОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ ХВОРИХ НА РЕВМАТОЇДНИЙ АРТРИТ ТА АНКІЛОЗИВНИЙ СПОНДИЛОАРТРИТ

З.Д. Воробець, Р.В. Фафула, Н.Е. Личковська, У.П. Єфремова*Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, кафедра медичної біології (науковий керівник – д.б.н, проф. З.Д. Воробець), м. Львів.*

PATHOGENIC ASPECTS OF IONIC AND ENERGY HOMEOSTASIS IN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS AND ANKYLOSING SPONDYLITIS

Z.D. Vorobets, R.V. Fafula, N. E. Lychkovska, U.P. Efremova

SUMMARY

The analysis of the violations of ionic and energy homeostasis of saponin-perforated peripheral blood lymphocytes of patients with rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis was carried out. It was shown the significant reduction of ouabain-sensitive Na^+ , K^+ -ATPase and Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase activity which is probably related to the *energy insufficiency* in patients with rheumatic pathology.

ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ИОННОГО И ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ГОМЕОСТАЗА В ЛИМФОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ И АНКИЛОЗИРУЮЩИМ СПОНДИЛОАРТРИТОМ

З.Д. Воробец, Р.В. Фафула, Н.Е. Лычковская, У.П. Ефремова

РЕЗЮМЕ

Исследованы нарушения ионного и энергетического гомеостаза сапонин-перфорированных лимфоцитов периферической крови у больных ревматоидным артритом и анкилозирующим спондилоартритом. Показано достоверное снижение оубаинчувствительной Na^+ , K^+ -АТФ-азной и Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФ-азной активности, что предположительно связано с энергодифицитом в лимфоцитах в условиях развития ревматической патологии.

Ключові слова: іонний гомеостаз, енергетичний гомеостаз, Na^+ , K^+ -АТФ-аза, Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФ-аза, лімфоцити, ревматоїдний артрит, анкілозивний спондилоартрит.

Ревматичні захворювання – група мультифакторних хвороб, представлених великою кількістю нозологічних форм, які відрізняються за походженням і об'єднані, переважно за ознакою локалізації основного патологічного процесу у сполучній тканині. У структурі ревматичних захворювань головна роль належить ревматоїдному артриті. Ревматоїдний артрит (РА) – одне з найпоширеніших системних захворювань сполучної тканини, яке характеризується значною поширеністю, неухильно прогресуючим перебігом, ураженням багатьох органів і систем організму та ранньою інвалідизацією хворих [2, 15]. За даними експертів ВООЗ, на РА страждає приблизно кожний сотий мешканець Землі. Анкілозивний спондилоартрит (АСА) хронічне системне запальне захворювання сполучної тканини з переважним ураженням суглобів і зв'язок хребта та периферичних суглобів, яке вражає від 0,1 до 1,4 % населення [7].

Протягом останніх десятиліть у вітчизняній і закордонній науковій літературі акцент робиться на імунологічні порушення в патогенезі ревматичних захворювань. Для оцінки функціонального стану імунної системи при ревматичних захворюваннях запропоновано ряд тестів: визначення кількісного і

якісного складу імунокомпетентних клітин, їх мембранних маркерів, циркулюючих імунних комплексів, продуктів імунокомпетентних клітин (цитокіни, імуноглобуліни, компоненти системи комплементу), реакція бласттрансформації лімфоцитів.

Одночасно, постійно йде пошук інтегральних біохімічних показників, які б відображали про зміни функціонального стану організму. В цьому плані найбільшу увагу привертають лімфоцити периферичної крові, які є ключовими клітинами імунної системи та відіграють провідну роль в забезпеченні компенсаторно-приспосувальних реакцій організму. Лімфоцити представляють собою гетерогенну популяцію клітин і є центральною ланкою в специфічних імунологічних реакціях. Дослідження ензиматичного спектру лімфоцитів широко використовується при вивченні аутоімунних, імунодифіцитних, лімфопроліферативних та інших захворюваннях. Проте, нез'ясованим залишається зміни йонного гомеостази в лімфоцитах за умов розвитку ревматичної патології.

Мета дослідження полягає у вивченні дисфункції йон-транспортуючих АТФ-гідролітичних систем і порушень йонного гомеостази в сапонін-

перфорованих лімфоцитах периферичної крові за умов розвитку ревматичної патології.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

За темою роботи проведено обстеження та лікування 22 хворих на РА (82 % жінки, 18 % чоловіки) та 17 хворих на АСА (32 % жінки, 68 % чоловіки), віком від 18 до 61 років (середній вік – 38 ± 2 років), які перебували на стаціонарному лікуванні у ревматологічному відділенні Львівської обласної клінічної лікарні. Контролю групу становили практично (клінічно) здорові донори, репрезентативні за віком та статтю ($n = 15$). У дослідження включали осіб зі встановленим діагнозом РА або АСА без наявності супутніх запальних захворювань сполучної тканини, інших запальних захворювань, онкологічної патології на момент початку дослідження.

Моноядерні лімфоцити периферичної крові людини виділяли з гепаринізованої свіжоотриманої крові хворих і донорів у градієнті густини фікол-тріумбасту ($r = 1,08 \text{ г/см}^3$) [8]. Цілісність і життєздатність лімфоцитів, яка в усіх дослідах становила не менше 95 %, оцінювали за забарвленням трипановим синім [12]. Для пермеабілізації мембран лімфоцитів периферичної крові та розкриття латентних АТР-азних активностей до суспензії лімфоцитів додавали сапонін у концентрації 0,1-0,2 % [3].

Визначення загальної АТФазної ензиматичної активності лімфоцитів проводили при 37°C у середовищі інкубації (об'єм – 1 мл) наступного складу (мМ): 120 NaCl, 30 KCl, 5 MgCl₂, 1,5 АТР, 1 ЕГТА, 1 NaN₃ (інгібітор мітохондріальної АТР-ази), 20 Нерес-Трис-буфер (рН = 7,4), 0,1 мкМ тапсигаргін (селективний інгібітор Ca²⁺, Mg²⁺-АТФази ЕПР) [9]. Наявність Ca²⁺-хелатора ЕГТА в середовищі інкубації забезпечувало зв'язування в ньому ендогенних йонів Ca²⁺. Визначення Ca²⁺, Mg²⁺-АТР-азної ензиматичної активності лімфоцитів проводили при 37°C у середовищі інкубації (об'єм – 1 мл) наступного складу (мМ): 150 KCl, 0,05 CaCl₂, 5 MgCl₂, 5 АТР, 1 NaN₃, 1 оубаїн (інгібітор Na⁺, K⁺-АТР-ази), 20 Нерес-Трис-буфер (рН = 7,4).

АТР-гідролазну реакцію ініціювали внесенням до інкубаційного середовища аліквоти лімфоцитарної суміші; кількість білка у пробі не перевищувала 50 – 100 мкг/мл. Вміст білка у лімфоцитарній суміші визначали методом Лоурі [11]. Тривалість інкубації – 5 хв. Реакцію зупиняли додаванням 1 мл охолодженого стоп-розчину наступного складу: 1,5 М натрій ацетат, 3,7 % формальдегід, 14 % етанол, 5 % ТХО.

У дослідах контролем на неензиматичний гідроліз АТР було стандартне середовище інкубації, яке не містило досліджуваної проби. Як контроль на кількість ендогенного P_i в лімфоцитарній суміші

використовували суспензію лімфоцитів у фізіологічному розчині. Кількість P_i визначали за методом W. Rathbun, V. Betlach [13]. Величину оубаїнчутливої Na⁺, K⁺-АТФазної активності обчислювали за різницею між величиною загальної АТР-азної активності і базальної Mg²⁺ активності у присутності оубаїну (1 мМ). Питому активність Ca²⁺, Mg²⁺-АТР-аз лімфоцитів оцінювали як різницю між активністю АТР-азних систем у Ca²⁺-вмісному та безкальцієвому середовищах. Для розділення сумарної Ca²⁺, Mg²⁺-АТР-азної активності на складові: тапсигаргіннечутливу (Ca²⁺, Mg²⁺-АТР-аза плазматичної мембрани - РМСА) та тапсигаргінчутливу (Ca²⁺, Mg²⁺-АТР-аза мембран ендоплазматичного ретикулу - SERCA) до стандартного Ca²⁺- та Mg²⁺-вмісного середовища інкубації додавали селективний інгібітор Ca²⁺, Mg²⁺-АТР-ази ЕПР – тапсигаргін (0,1 мМ).

Варіаційно-статистичне опрацювання отриманих результатів проводили з використанням *t*-критерію Стьюдента за допомогою комп'ютерної програми Microsoft Excel 2003.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Для виконання складних функцій лімфоцитів у них повинна існувати досконала система регуляції та внутрішньоклітинної сигналізації та підтриманні клітинного гомеостазу. Йонний гомеостаз є важливим показником функціональної активності лімфоцитів периферичної крові і визначається підтриманням сталої внутрішньоклітинної концентрації йонів K⁺, Na⁺, Ca²⁺, Cl⁻ та H⁺. Прецедійний контроль внутрішньоклітинного рН, величина якого впливає на здатність клітин нормально функціонувати, та йонного гомеостазу забезпечується суперпозицією всіх транспортувальних систем лімфоцитів. Серед них провідна роль у виведенні йонів Na⁺ та Ca²⁺ з цитоплазми лімфоцитів належить Na⁺, K⁺-АТР-азі та Ca²⁺, Mg²⁺-АТР-азі.

Na⁺, K⁺-АТР-аза – маркерний ензим плазматичної мембрани, є Ca²⁺-незалежною, Na⁺, K⁺-активованою, Mg²⁺, АТР-залежною транспортувальною системою, яка здійснює активне трансмембранне перенесення йонів Na⁺ та K⁺ і селективно інгібується оубаном. Ca²⁺, Mg²⁺-АТР-аза здійснюється спряжений гідроліз АТР з транслокацією йонів Ca²⁺ крізь мембрану з клітини назовні або в цистерні ЕПР.

У хворих на РА і АСА оубаїнчутлива Na⁺, K⁺-АТФаза активність лімфоцитів периферичної крові достовірно відрізняється від її величини у практично здорових донорів на $56,3 \pm 3,9\%$ і $60,1 \pm 4,0\%$ відповідно ($P < 0,001$) (рис. 1). Активність Ca²⁺, Mg²⁺-АТР-ази плазматичної мембрани лімфоцитів периферичної крові хворих на РА і АСА достовірно знижується на $56,3 \pm 2,8\%$ і $66,9 \pm 4,2\%$ ($P < 0,001$) відповідно у порівнянні з її величиною в осіб групи контролю. Подібну закономірність встановлено і для тапсигаргін-

чутливої компоненти Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-ази. Відмічається також достовірне зниження активності Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-ази мембран ендоплазматичного ретикулуimu лімфоцитів периферичної крові хворих на РА і АСА. Її активність достовірно відрізняється у хворих на РА на $65,6 \pm 4,5$ %, а у хворих на АСА – на

$86,3 \pm 7,5$ % ($P < 0,001$) у порівнянні з донорами. Зниження ензиматичної активності Na^+ , K^+ -АТР-ази та Ca^{2+} , Mg^{2+} - АТР-ази активності ПМ і ЕПР лімфоцитів периферичної крові має більш виражений характер у хворих на РА, ніж у хворих на АСА.

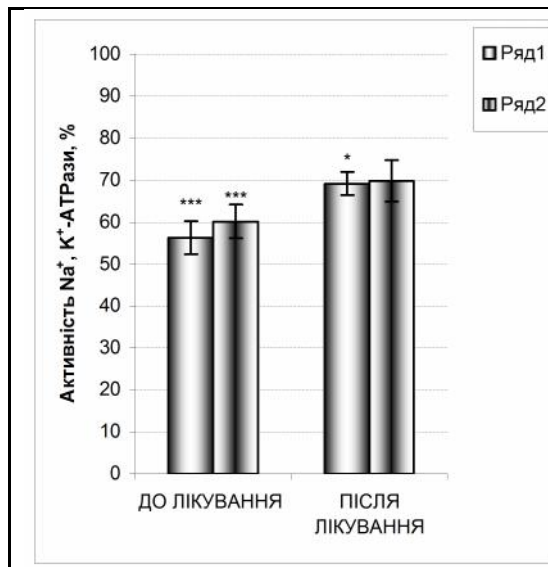


Рис. 1. Зміни Na^+ , K^+ -АТР-азної активності лімфоцитів периферичної крові хворих на РА (ряд 1) та АСА (ряд 2) до та після лікування, % стосовно Na^+ , K^+ -АТР-азної активності у практично здорових донорів.

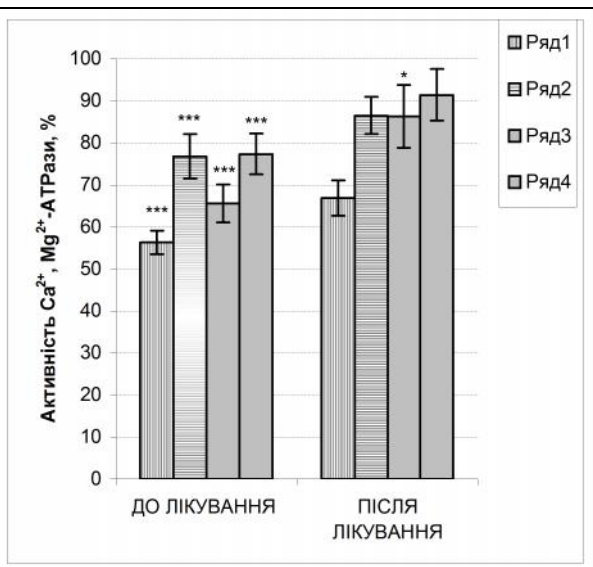


Рис. 2. Зміни Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-азної активності плазматичної мембрани (ряд 1, 2) і мембран ендоплазматичного ретикулуimu (ряд 3, 4) лімфоцитів периферичної крові хворих на РА (ряд 1, 3) та АСА (ряд 2, 4) до та після лікування, % стосовно Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-азної активності у практично здорових донорів.

У ряді ДО ЛІКУВАННЯ *** $P < 0,001$ стосовно величин у лімфоцитах в осіб групи контролю (практично здорові донори); у ряді ПІСЛЯ ЛІКУВАННЯ * $P < 0,05$ стосовно величин у лімфоцитах у хворих на момент поступлення у стаціонар.

Водночас, в хворих обох досліджуваних груп зниження ензиматичної активності РМСА має більш виражений характер, ніж у випадку SERCA. Пригнічення активності Na^+ , K^+ -АТР-ази і Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-ази свідчить про зростання концентрації йонів Na^+ та Ca^{2+} у цитозолі лімфоцитів. Отримані експериментальні дані узгоджуються з результатами отриманими дослідниками раніше. Зокрема, показано інгібування ензиматичної активності Ca^{2+} , Mg^{2+} - АТР-ази ПМ та зростання $[\text{Ca}^{2+}]_i$ у лімфоцитах крові щурів з модельованим артритом [14].

Досліджувані ензиматичні системи повторно визначали у хворих на РА та АСА після проведеного лікування у стаціонарі. Спостерігається наближення значень гідролазної активності Na^+ , K^+ -АТР-ази та Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-ази ПМ і ЕПР лімфоцитів периферичної крові хворих на РА та АСА до контрольних значень, що може свідчити про незначне відновлення у функціонального стану імункомпетентних клітин після проведеного лікування хворих у стаціонарі.

Відомо, що стан внутрішньоклітинного йонного гомеостазу тісно пов'язаний з енергетичним обміном практично всіх біохімічних, біофізичних та фізіологічних процесів. Дослідниками вивчається тісний взаємозв'язок між функціональною активністю лімфоцитів та їх енергетичним обміном. Зокрема, показано [1, 5, 6, 10], що вже з перших хвилин реакції бласттрансформації має місце збільшення споживання АТР. Встановлено, що при розпізнаванні ефектором клітини-мішені відбувається локальний викид АТР в міжклітинний простір, утворений в зоні контакту клітин. Зниження внутрішньоклітинної концентрації макроергів в лімфоцитах компенсується внаслідок активації метаболічних процесів тільки через 1-2 год. Це співпадає у часі з переходом активованих лімфоцитів в G_1 -фазу, а згодом – в S-фазу клітинного циклу. Проте, при вичерпанні субстратного пулу відбувається інгібування енергетичних процесів в лімфоцитах, що веде до розвитку імунопатологічних процесів. Дослідники припускають, що при розвитку імунної відповіді

ймовірність зриву енергетичного гомеостазу імункомпетентних клітин зростає, що веде до порушень функціональної активності лімфоцитів [4].

ВИСНОВКИ

Стимуляція лімфоцитів антигенами запускає каскад енергетично-залежних процесів, які ведуть до перерозподілу макроергів у клітині з чим ймовірно можуть бути пов'язані зниження ензиматичної активності оубаїчутливої Na^+ , K^+ -АТР-ази та Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-ази ПМ і ЕПР лімфоцитів периферичної крові у хворих з ревматичною патологією. Ми припускаємо, що зниження активності досліджуваних ензиматичних систем пов'язані із зменшенням пулу АТР в лімфоцитах. Це свідчить про енергодефіцит лімфоцитів, перевантаження клітин Na^+ і Ca^{2+} та порушення їх регуляторних механізмів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Буланова Е.Г. Исследование внутриклеточного аденозинтрифосфата в мононуклеарных клетках периферической крови человека при помощи биоломинесцентного анализа / Е.Г. Буланова, Л.Ю. Бровко, В.Ю. Розенков // Иммунология. – 1994. – № 3. – С. 55-57.
2. Коваленко В.М. Стан ревматології в Україні / В.М. Коваленко // Укр. ревматол. журн. – 2003. – № 2. – С. 3-8.
3. Підковка Н.О. Дослідження деяких властивостей АТФаз у лімфоцитах крові людини / Н.О. Підковка, З.Д. Воробець, А.Б. Зіменковський // Експерим. та клін. фізіологія і біохімія. – 2002. – Т. 7, №1. – С. 38-41.
4. Савченко А.А. Содержание АТФ и активность НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах при иммунодефицит-ассоциированных заболеваниях у пришлых жителей эвенкии / А.А. Савченко, С.В. Смирнова, А.Г. Борисов. // Бюллетень СО РАМН. – 2010. – Т. 30, № 3. – С. 33-38.
5. Augustine N.H. Comparison of ATP production in whole blood and lymphocyte proliferation in response to phytohemagglutinin / N.H. Augustine, B.M. Pasi, H.R. Hill // J.Clin. Lab. Anal. – 2007. – V. 21., N. 5. – P. 265-270.
6. Bodin P. Purinergic signalling: ATP release / P. Bodin, G. Burlstock // Neurochem. Res. – 2001. – V. 26, N. 15. – P. 959-969.
7. Boonen A. Withdrawal from labour force due to work disability in patients with ankylosing spondylitis / A. Boonen, A. Chorus, H. Miedema [et al.] // Ann. Rheum. Dis. – 2001. – V. 60. P. 1033-1039.
8. Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood / A. Boyum // Scand. J. Clin. Lab. Invest. – 1968. – V. 21 (Supp. 97). – P. 77-79.
9. Flynn E.R. Functionally Separate Intracellular Ca^{2+} Stores in Smooth Muscle / E.R. Flynn, K.N. Bradley, T.C. Muir [et al.] // J.Biol. Chemistry. – 2001. – V. 276, N. 39. – P. 36411-36418.
10. Kowalski R.J. Immunodiagnosics: evaluation of functional T-cell immunocompetence in whole blood independent of circulating cell numbers / R. Kowalski, A. Zeevi, R. Mannon [et al.] // J. Immunotoxicol. – 2007. – V. 4., N. 3. – P. 225-232.
11. Lowry O.H. Protein measurement with the Folin phenolreagent / O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr [et al.] // J. Biol. Chem. – 1951. – V. 193. – P. 265-275.
12. Mishell B.B. Selected Methods in Cellular Immunology / B.B. Mishell, S.M. Shiigi // San Francisco: W. H. Freeman and Company. – 1980. – P. 486.
13. Rathbun W. Estimation of enzymically produced orthophosphate in the presence of cysteine and adenosine triphosphate / W. Rathbun, V. Betlach // Anal. Biochem. – 1969. – V. 28. – P. 436-447.
14. Selvam R. Low frequency and low intensity pulsed electromagnetic field exerts its antiinflammatory effect through restoration of plasma membrane calcium ATPase activity / R. Selvam, K. Ganesan, R. Narayana Raju [et al.] // Life Sci. – 2007. – Vol. 80, N. 26. – P. 2403-2410.
15. Young A. How does functional disability in early rheumatoid arthritis affect patients and their lives? Results of 5 years of follow-up in 732 patients from Early RA Study (ERAS) / A. Young, J. Dixey, N. Cox // Rheumatol. – 2003. – V. 39. – P. 603-611.