

УДК 577.152.3

О.В. Мельник, Н.Є. Личковська*, О.П. Корнійчук, З.Д. Воробець

АТФ-ГІДРОЛАЗНІ АКТИВНОСТІ ЛІМФОЦИТІВ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ У ХВОРИХ НА РЕАКТИВНИЙ АРТРИТ

Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького,
*Львівська обласна клінічна лікарня

Резюме. Вивчені зміни активності ферментів Na^+ , K^+ -АТФази і H^+ -АТФази лімфоцитів периферичної крові у хворих на реактивний артрит. Виявлено вірогідне зниження оубайнчутливої Na^+ , K^+ -АТФазної активності (на 48,7 %) і H^+ -АТФазної активності мітохондрій (на 42,7 %) у лімфоцитах периферичної крові хво-

рих реактивним артритом порівняно з практично здоровими донорами. Показано, що в результаті лікування відбувається зростання активності обох ферментів і наближення їх до контрольних значень.

Ключові слова: Na^+ , K^+ -АТФаза, H^+ -АТФаза, лімфоцити, реактивний артрит.

Вступ. Патогенез багатьох захворювань пов'язаний зі змінами структури і функцій біомембран, у формуванні яких значна роль належить інтегральним АТФ-залежним транспортувальним системам іонів. Na^+ , K^+ -АТФаза (ЕС 3.6.1.37) – маркерний фермент плазматичної мембрани, селективно інгібується оубаном, є Ca^{2+} -незалежною, Na^+ , K^+ -активованою, Mg^{2+} , АТФ-залежною транспортувальною системою, що здійснює активне трансмембранне перенесення іонів Na^+ і K^+ і тим самим підтримує їх електрохімічні градієнти, необхідні для нормального функціонування клітини [1]. Іони Na^+ залучені також в інші транспортувальні механізми, зокрема, в підтримання гомеостазу Ca^{2+} , регулюють внутрішньоклітинне рН, а звідси, і роботу H^+ -АТФази мітохондрій. Припускається, що іони Na^+ , їх градієнт через плазматичну мембрану можуть бути інтегральним показником життєздатності клітини [10, 11]. Показано, що активність Na^+ , K^+ -АТФази, яка відіграє ключову роль у підтриманні внутрішньоклітинного іонного гомеостазу, осмотичного балансу клітини і трансмембранного потенціалу клітин, змінюється під впливом гормонів, факторів росту і стресу [1]. Більше того, зараз Na^+ , K^+ - АТФазу розглядають і як систему рецепції та передачі сигналів у клітину.

На сьогодні залишаються недостатньо з'ясованими біохімічні механізми розвитку реактивного артрити (РеА) і роль порушення функціональної активності Na^+ , K^+ - та H^+ -АТФаз у цьому процесі. Слід відмітити, що реактивні артрити – це група захворювань суглобів, пов'язаних з інфекцією. При цьому інфекція є тільки пусковим фактором, сам інфекційний збудник в суглобах не виявляється [5].

Вивчення активності та ролі Na^+ , K^+ - та H^+ -помп лімфоцитів периферичної крові, як систем енергозалежного транспортування іонів Na^+ , K^+ та H^+ у регуляції функціональної відповіді клітини дасть можливість сформулювати цілісне уявлення щодо участі цих систем у підтриманні іонного гомеостазу клітини. З іншого боку, підвищена цікавість до лімфоцитів зумовлена їх участю в процесах, пов'язаних із підтримкою гомеостазу на рівні цілого організму. Лімфоцити задіюються

в патологічний процес при хворобах різного генезу [2, 20].

Мета дослідження. Вивчити АТФ-гідролазні реакції за участі Na^+ , K^+ - та H^+ -АТФаз у сапонін-перфорованих лімфоцитах периферичної крові хворих на реактивний артрит.

Матеріал і методи. Дослідження проводили на лімфоцитах периферичної крові клінічно здорових донорів, віком 20-40 років ($n=15$) і хворих на РеА, віком 20-40 років, які перебували на стаціонарному лікуванні в ревматологічному відділенні Львівської обласної клінічної лікарні ($n=14$). Моноядерні лімфоцити периферичної крові людини виділяли з гепаринізованої свіжоотриманої крові хворих і донорів у градієнті концентрації фікол-тріумбразу ($\tau=1,08 \text{ г/см}^3$) [9]. Цілісність і життєздатність лімфоцитів, яка в усіх дослідах становила не менше 95 %, оцінювали за забарвленням трипановим синім.

Для пермеабілізації мембран лімфоцитів периферичної крові та розкриття латентних Na^+ , K^+ -АТФазної та H^+ -АТФазної активностей до суспензії лімфоцитів додавали 0,2 % сапонін. Ця методика ґрунтується на роботах, виконаних на лімфоцитах раніше [3, 4]. Сапонін належить до групи речовин амфіфільної 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 транспортувальних систем. Вміст білка в лімфоцитарній суміші визначали методом Лоурі.

Визначення загальної АТФазної ензиматичної активності лімфоцитів проводили при 37° С у середовищі інкубації (об'ємом 1 мл) наступного складу (мМ): 30 NaCl, 120 KCl, 5 MgCl₂, 1,5 АТФ, 1 ЕГТА, 1 NaN₃ (інгібітор мітохондріальної АТФази) [7], 20 Hepes-Tris-буфер 7,4), 0,1 мкМ тапсигаргін (селективний інгібітор Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФази ЕПР) [8]. Наявність Ca^{2+} -хелатора ЕГТА в середовищі інкубації забезпечувало зв'язування в ньому ендогенних іонів Ca^{2+} . Ензиматичну реакцію ініціювали внесенням до інкубаційного середовища аліквоти лімфоцитарної суміші (100 мкл); кількість білка у пробі не перевищува-

ла 50-100 мкг/мл. Тривалість інкубації – 1-15 хв. Ензиматичну реакцію зупиняли додаванням 1 мл охолодженого стоп-розчину наступного складу: 1,5 М натрій ацетат, 3,7 % формальдегід, 14 % етанол, 5 % ТХО (рН = 4,3). Базальну Mg^{2+} -АТФазну активність лімфоцитів тестували в аналогічному середовищі інкубації, але за наявності 1 мМ оубаїну – селективного інгібітора Na^+ , K^+ -АТФази. Оубаїнчутливу Na^+ , K^+ -АТФазну активність обчислювали за різницею між величиною загальної АТФазної і базальної Mg^{2+} активності. H^+ -АТФазну активність мітохондрій визначали за величиною компоненти, яка інгібується специфічним блокатором 1 мМ NaN_3 .

У дослідях контролем на неензиматичний гідроліз АТФ було стандартне середовище інкубації, яке не містило досліджуваної проби. Як контроль на кількість ендogenous неорганічного фосфору (P_i) в лімфоцитарній суміші використовували суспензію лімфоцитів у фізіологічному розчині. Кількість продукту реакції P_i визначали за методом W. Rathbun, V. Betlach [12] і виражали у мкмоль P_i /хв×мг білка.

Результати дослідження та їх обговорення.

Оскільки зміни концентрації іонів Na^+ в клітинах можуть характеризувати їх фізіологічний чи патологічний стан [1, 6, 20, 21], ми досліджували активність та деякі кінетичні параметри Na^+ , K^+ -АТФази в лімфоцитах периферичної крові клінічно здорових людей і хворих на реактивний артрит.

Для встановлення оптимальних умов Mg^{2+} -залежного гідролізу АТФ, який каталізується Na^+ , K^+ -АТФазою лімфоцитів, досліджували динаміку накопичення продукту АТФ-гідролізу реакції. Для цього суспензію лімфоцитів інкубували в стандартному середовищі інкубації протягом різних проміжків часу (1-15 хв). Дані експериментів показали, що кінетику Na^+ , K^+ -активованого, Mg^{2+} -залежного гідролізу АТФ сапонін-перфорованими лімфоцитами відзеркалюють криві, які мають тенденцію до насичення.

Аналіз отриманих результатів дозволяє дійти висновку, що кінетика Na^+ , K^+ -активованого, Mg^{2+} -залежного гідролізу АТФ, каталізованого сапонін-перфорованими лімфоцитами, узгоджується із закономірностями реакції нульового порядку в діапазоні 0-5 хв: у цьому інтервалі часу графік залежності P_i від періоду інкубації є практично лінійним. Тому в подальших експериментах тривалість інкубації лімфоцитів і, відповідно, реакції гідролізу АТФ становила 5 хв. У всьому діапазоні фактора часу кількість вивільненого неорганічного фосфору P_i оубаїнчутливою Na^+ , K^+ -АТФазою лімфоцитів хворих на РеА була значно нижча порівняно з величиною в донорів.

Оскільки протягом 5 хв залежність активності Na^+ , K^+ -АТФази від часу інкубації практично лінійна, можна розрахувати, що в контрольній групі (клінічно здорові чоловіки) в пермеабілізованих сапоніном лімфоцитах периферичної крові активність ферменту складає $6,32 \pm 0,24$ мкмоль P_i /хв×мг білка (рис. 1).

У пацієнтів з РеА ця величина значно менша та складає $3,24 \pm 0,14$ мкмоль P_i /хв×мг білка. Можна стверджувати, що має місце вірогідне зниження Na^+ , K^+ -АТФазна активність лімфоцитів периферичної крові у хворих на РеА, яке становить 48,7 %.

Порушення Na^+ , K^+ -АТФазної активності лімфоцитів свідчать про зміни функціональної активності в імункомпетентних клітинах, що може бути зумовлено певними впливами на мембранозв'язаний ензим з боку інших патологічних змін і процесів у цих клітинах, а також може опосередковуватися через інші регуляторні механізми клітини (іони Ca^{2+} , NO).

Na^+ , K^+ -АТФазну активність лімфоцитів периферичної крові хворих на РеА визначали також повторно після проведення лікування у стаціонарі. Спостерігається зростання ензиматичної активності Na^+ , K^+ -АТФази лімфоцитів периферичної крові хворих. Так, значення Na^+ , K^+ -АТФази у хворих на РеА після проведеного стаціонарного лікування становить $4,87 \pm 0,25$ мкмоль P_i /хв×мг білка (n=11), що становить 77 % від контрольних значень. Таким чином, можна зробити припущення, що зростання Na^+ , K^+ -АТФазної ензиматичної активності свідчить про незначне відновлення у функціонуванні лімфоцитів, як імункомпетентних клітин після проведеного лікування хворих у стаціонарі.

H^+ -АТФазна активність мітохондрій пермеабілізованих лімфоцитів периферичної крові контрольної групи складала $3,63 \pm 0,28$, а дослідної – $2,08 \pm 0,14$ мкмоль P_i /хв×мг білка, тобто знижувалась на 42,7 % (рис. 2).

Визначення даної АТФазної активності після проведеного лікування показало її зростання до $3,12 \pm 0,25$ мкмоль P_i /хв×мг білка, тобто має місце наближення до контрольних значень.

Вивчення змін Na^+ , K^+ -АТФазної активності при патологічних станах викликає значний інтерес у дослідників у медико-біологічній практиці [6, 20, 21]. Результати дослідження функціональної активності Na^+ , K^+ -АТФази лімфоцитів периферичної крові в клінічних дослідженнях є вкрай обмеженими, що пояснюється невеликою кількістю біологічного матеріалу, який можна виділити з крові хворих. Зокрема показано значні порушення механізмів оубаїнчутливого і оубаїнрезистентного транспортування моновалентних іонів при багатьох психічних порушеннях. Виявлено вірогідне зниження активності Na^+ , K^+ -АТФази еритроцитів в осіб із миготливою аритмією, шлуночковою і надшлуночковою екстрасистолею, гіпертонією; має місце порушення механізмів роботи Na^+ , K^+ -АТФази і при інших серцево-судинних захворюваннях. Показано, що має місце зниження ензиматичної активності Na^+ , K^+ -АТФази клітин печінки і головного мозку у хворих за тривалої дії етанолу. Виявлені значні зміни функціональної активності Na^+ , K^+ -АТФази лімфоцитів у пацієнтів з маніакально депресивним психозом, підвищення рівня АТФазної акти-

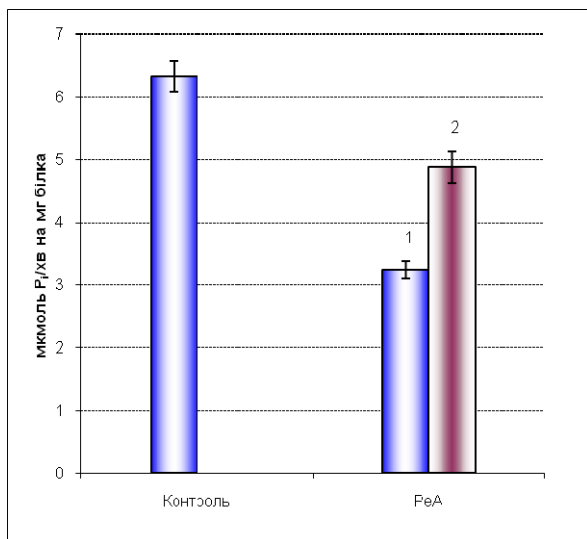


Рис. 1. Na⁺, K⁺-АТФаза активність лімфоцитів периферичної крові у хворих на реактивний артрит на момент надходження до стаціонару (1) і після проведеного лікування (2), мкмоль P_i/хв·мг білка (M±m)

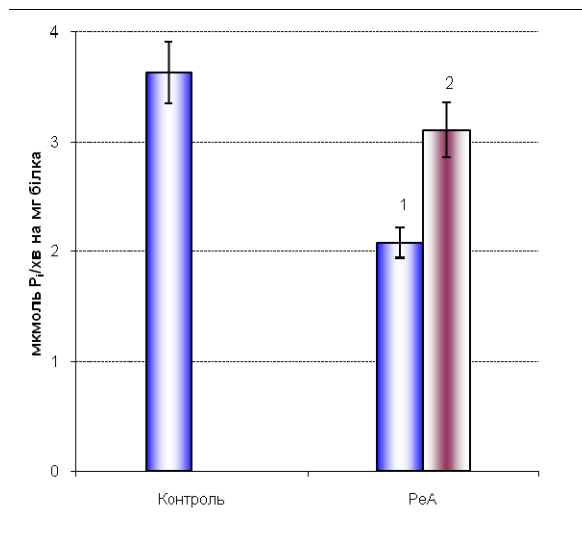


Рис. 2. H⁺-АТФаза активність мітохондрій лімфоцитів периферичної крові у хворих на реактивний артрит до (1) та після проведеного лікування (2), мкмоль P_i/хв·мг білка (M±m)

вності лімфоцитів встановлені у хворих на онкологічні захворювання. Так, показано зниження активності базальної АТФази мембран лімфоцитів при лімфомі Ходжкіна.

Щодо H⁺-АТФази, то вона функціонує і як АТФ-синтаза, забезпечуючи спряження в мітохондріях фосфорилування АДФ з реакціями в дихальному ланцюгу. Пригнічення роботи даної АТФази призводить до енергодефіциту в клітині.

Висновки

1. Виявлено вірогідне зниження Na⁺, K⁺- та H⁺-АТФазних активностей у лімфоцитах периферичної крові хворих на реактивний артрит, відповідно на 48,7 % та 42,7 %, порівняно з практично здоровими донорами.

2. Показані зміни ензиматичної активності Na⁺, K⁺- та H⁺-АТФазних активностей лімфоцитів після проведеного лікування в стаціонарі – спостерігається зростання активності ферментів, що свідчить про відповідне відновлення у функціонуванні імункомпетентних клітин-лімфоцитів.

3. Визначення АТФазних активностей лімфоцитів периферичної крові дає якісну інформаційну оцінку про функціонування імункомпетентних клітин. Їх зіставлення з іншими фізіологічними і біохімічними характеристиками може мати значення в з'ясуванні механізмів ревматичних захворювань.

Перспективи подальших досліджень. У подальших дослідженнях, з метою більш комплексного розуміння біохімічних змін, які відбуваються при реактивному артриті, планується з'ясувати зміни активностей Ca²⁺, Mg²⁺-АТФаз плазматичної мембрани та ендоплазматичного ретикула лімфоцитів, які беруть участь у підтриманні гомеостазу Ca²⁺, як вторинного месенджера, що регулює практично всі клітинні функції.

Література

1. Болдырев А.А. Na⁺, K⁺-АТФаза – свойства и биологическая роль / А.А. Болдырев // Соросовский образовательный ж. – 1998. – № 4. – С. 2-9.
2. Давтян Т.К. О взаимоотношении иммунного и адаптивного ответов / Т.К. Давтян, Л.А. Аванесян // Успехи соврем. биол. – 2001. – Т. 121, № 3. – С. 275-286.
3. Кімакович О.В. Дія квателу та пірензепіну на активність транспортних АТФаз лімфоцитів периферичної крові / О.В. Кімакович, Н.О. Підковка, З.Д. Воробець // Прикт. мед. – 2004. – Т. 10, № 2. – С. 86-89.
4. Кочешкова Н.С. Вплив інгібіторів на Ca²⁺-залежні та Ca²⁺-незалежні АТФазні системи сперматозоїдів / Н.С. Кочешкова, З.Д. Воробець, Л.П. Оліферчук // Світ медицини та біології. – 2007. – № 3. – С. 65-70.
5. Спаська Г.О. Реактивний артрит: сучасний погляд на проблему / Г.О. Спаська // Укр. мед. часопис. – 2011. – Т. 86, № 6. – С. 1-6.
6. Шкаволяк А.В. Дослідження Na-транспортуючих систем в діагностиці іонних мембранопатій (Огляд) / А.В. Шкаволяк, Н.М. Гринчишин // Експерим. та клін. фізіол. і біохімія. – 2000. – №4. – С. 63-66.
7. Bald D. ATP synthesis by F₀F₁-ATP-synthase independent of noncatalytic nucleotide binding sites and insensitive to azide inhibition / D. Bald, T. Amano, E. Muneyuki / J. Biol. Chem. – 1998. – Vol. 273, № 2. – P. 865-870.
8. Bassani R.A. Inhibition of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ pump with thapsigargin to estimate the contribution of Na⁺-Ca²⁺ exchange to ventricular myocyte relaxation / R.A. Bassani, J.W. Bassani // Braz. J. Med. Biol. Res. – 2003. – Vol. 36, № 12. – P. 1717-1723.

9. Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood / A. Boyum // Scand. J. Clin. Lab. Invest. – 1968. – Vol. 21 (Supp. 97). – P. 77-79.
10. Ellegaard J. ATP-ase activity of lymphocytes from normal individuals and patients with cancer / J. Ellegaard, N. Dimitrov // Cancer J. for Clinicians. – 2006. – Vol. 30, № 4. – P. 881-884.
11. Imahashi K. Role of intracellular Na^+ kinetics in preconditioned rat heart / K. Imahashi, T. Nishimura, J. Yoshioka // Circulat. Res. – 2001. – Vol. 88, № 1. – P. 176-182.
12. Rathbun W. Estimation of enzymically produced orthophosphate in the presence of cysteine and adenosine triphosphate / W. Rathbun, V. Betlach // Anal. Biochem. – 1969. – Vol. 28. – P. 436-447.

АТФ-ГИДРОЛАЗНЫЕ АКТИВНОСТИ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У БОЛЬНЫХ РЕАКТИВНЫМ АРТРИТОМ

О.В. Мельник, Н.Э. Личковская, Е.П. Корнийчук, З.Д. Воробец

Резюме. Изучены изменения активностей ферментов Na^+, K^+ -АТФазы и H^+ -АТФазы лимфоцитов периферической крови у больных реактивным артритом. Обнаружено достоверное снижение оубаинзависимой Na^+, K^+ -АТФазной активности (на 48,7 %) и H^+ -АТФазной активности митохондрий (на 42,7 %) в лимфоцитах периферической крови больных реактивным артритом в сравнении с практически здоровыми донорами. Показано, что в результате лечения происходит увеличение активностей обеих ферментов и приближение их к контрольным значениям.

Ключевые слова: Na^+, K^+ -АТФаза, H^+ -АТФаза, лимфоциты, реактивный артрит.

АТФ-HYDROLASE ACTIVITIES OF PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES IN PATIENTS WITH REACTIVE ARTHRITIS

O.V. Melnyk, N.Ye. Lychkovska, O.P. Korniiuchuk, Z.D. Vorobets

Abstract. Changes of Na^+, K^+ -ATPase and H^+ -ATPase enzyme activities of peripheral blood lymphocytes in patients with reactive arthritis have been studied. A significant decrease of the ouabain-sensitive Na^+, K^+ -ATPase activity (by 48,7 %) and H^+ -ATPase activity of mitochondria (by 42,7 %) in peripheral blood lymphocytes of patients with reactive arthritis, as compared to apparently healthy donors, has been revealed. It has been demonstrated that, as a result of a treatment, there occurs an increase of the activity of both enzymes and their approximation to control values.

Key words: Na^+, K^+ -ATPase, H^+ -ATPase, lymphocytes, reactive arthritis.

National Medical University Named after Danylo Halyts'kyi (L'viv),
Regional Clinical Hospital (L'viv)

Рецензент – проф. І.Й. Сидорчук

Buk. Med. Herald. – 2012. – Vol. 16, № 3 (63), part 1. – P. 50-53

Надійшла до редакції 04.04.2012 року

© О.В. Мельник, Н.Э. Личковська, О.П. Корнійчук, З.Д. Воробець, 2012

УДК 616.314.17-002-06:616.127-007.12]-078-092.9

І.Р. Мисула, І.О. Суховолець

ЗМІНА ПОКАЗНИКІВ ГУМОРАЛЬНОГО ІМУНІТЕТУ У ТВАРИН ІЗ РІЗНИМИ ТИПАМИ ЗАПАЛЬНОЇ РЕАКЦІЇ В ПАРОДОНТІ ПРИ ПОЄДНАННІ З АДРЕНАЛІНОВОЮ МІОКАРДІОДИСТРОФІЄЮ

ВДНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачовського»

Резюме. У роботі розглянуто зміни показників гуморального імунітету при поєднаному перебігу різних типів запальної реакції в пародонті з адреналіновою міокардіодистрофією. У щурів змодельовано пародонтит (за допомогою нанесення хронічної травми), та відтворено адреналінову міокардіопатію шляхом введення адреналіну внутрішньоочеревинно. У результаті

проведених експериментів встановлено прогресивне наростання кількості імуноглобулінів, що відбувається при всіх типах запальної реакції, та найбільше при гіперергічному типі.

Ключові слова: адреналінова кардіоміопатія, експериментальний пародонтит, імуноглобуліни.

Вступ. Незважаючи на значний розвиток сучасної медицини і стоматології зокрема, багато питань та проблем залишаються нерозв'язаними. Однією з таких проблем є проблема лікування та

профілактики захворювань пародонта [3, 4, 9]. Протягом останніх років інтенсивно ведеться пошук нових ланок етіології та патогенезу запальних захворювань пародонта та взаємодії і взає-