

АКТИВНІСТЬ АРГІНАЗИ В ЛІМФОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ ХВОРИХ НА РЕАКТИВНИЙ АРТРИТ

Досліджено зміни ензиматичної активності аргінази лімфоцитів периферичної крові хворих на реактивний артрит. Встановлено достовірне зростання максимальної миттєвої швидкості аргіназної реакції (у 3,3 раза) та максимальної кількості утвореного продукту реакції (у 2,5 раза) у лімфоцитах периферичної крові хворих порівняно з практично здоровими донорами. Визначено ряд кінетичних параметрів аргіназної реакції.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: автоімунні захворювання, реактивний артрит, аргіназа, оксид азоту, лімфоцити.

ВСТУП. Ревматичні захворювання – одна з найпоширеніших патологій у світі. Вони являють собою гетерогенну групу захворювань з домінуючим ураженням суглобів, що об'єднані тенденцією до хронічного прогресуючого перебігу, негативним впливом на якість життя та високою вірогідністю інвалідизації [6, 9]. Серед них особливо виділяють реактивний артрит (РеА) – системне ураження суглобів і сечостатевої шляхів, яке розвивається внаслідок хламідійної або, рідше, іншої інфекції [1, 3, 10].

У патогенезі РеА центральну роль відводять імунним порушенням, зокрема пов'язаним з функціонуванням Т-лімфоцитів [10, 21]. Також у патогенезі РеА суттєву роль відіграють порушення обмінних процесів. Протягом останнього десятиліття значну увагу приділяють вивченню метаболізму аргініну та ролі оксиду азоту (NO) в патогенезі ревматичних захворювань [20].

Імунні стреси, зумовлені дією цитокінів, у хворих на артрити стимулюють синтез NO [17, 18, 26]. За цих умов NO сприяє імунному захисту організму, відіграючи роль імунорегулятора, а у високих концентраціях також проявляє цитотоксичну дію, яка ускладнює різноманітні прояви автоімунного характеру [8, 27].

Тому, зважаючи на участь NO в імунотоксичних процесах та його вплив на міжклітинну кооперацію ефektorних і мішеневих клітин, об'єктом більш ґрунтовного вивчення все частіше стають NO-залежні механізми та їх роль у

розвитку автоімунних захворювань. Слід відзначити, що оксид азоту, субстратом для якого є амінокислота – L-аргінін, не обмежений лише синтазним шляхом метаболізму. Обмін L-аргініну здійснюється, як мінімум, двома шляхами: окисним (NO-синтазним) і неокисним (аргіназним) [5, 7]. Більшість досліджень метаболізму NO присвячена вивченню окисного NO-синтазного шляху метаболізму. Однак важливо підкреслити, що NO-синтаза та аргіназа можуть конкурувати за субстрат – L-аргінін.

Аргіназа (КФ. 3.5.3.1) – металоензим, який каталізує гідролітичне розщеплення L-аргініну до сечовини і L-орнітину. Аргіназа регулює утворення NO шляхом конкуренції з NO-синтазою за L-аргінін [22]. Фізіологічна роль аргінази, зумовлена її участю в численних метаболічних процесах у клітині, свідчить про те, що ензим належить до важливої ланки у розвитку багатьох патологічних станів організму, зокрема при автоімунних захворюваннях. Відомо, що аргіназа модулює імунну відповідь. Показано [23], що гуморальні протизапальні цитокіни IL-4, IL-10, IL-13 і TGF- β викликають експресію аргінази. Вважають, що висока експресія аргінази свідчить про гуморальну відповідь з боку імунної системи на антиген.

Метою даного дослідження було вивчити активність та кінетичні властивості аргінази в лімфоцитах периферичної крові хворих на реактивний артрит.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Дослідження проводили на лімфоцитах периферичної крові, яку

забирали у хворих ($n=11$), що перебували на стаціонарному лікуванні у ревматологічному відділенні Львівської обласної клінічної лікарні. Для об'єктивної клінічної оцінки початкового стану хворих, ефективності проведеного лікування діагноз встановлювали на основі уніфікованих діагностичних критеріїв, затверджених на об'єднаному Пленумі ревматологів і ортопедо-травматологів України (2003). Групу контролю становили практично (клінічно) здорові донори віком 20–30 років ($n=16$).

Моноядерні лімфоцити периферичної крові людини виділяли з гепаринізованої свіжо-отриманої венозної крові хворих і донорів у градієнті густини фікол-тріумбаст ($\rho=1,08$) [15]. Підраховували клітини у камері Горяєва, використовуючи як барвник 0,1 % трипановий синій. Цілісність і життєздатність лімфоцитів, яка в усіх досліджах становила не менше 95 %, оцінювали за забарвленням трипановим синім.

Ензиматичну активність аргінази визначали на пермеабілізованих лімфоцитах периферичної крові. Для пермеабілізації мембран лімфоцитів периферичної крові до суспензії лімфоцитів додавали детергент – 0,1 % сапонін. Дана методика ґрунтується на роботах, виконаних на еритроцитах, лімфоцитах і сперматозоїдах, з вивчення іонотранспортувальних та антиоксидантних систем клітини [2, 4].

Ензиматичну активність аргінази визначали за утворенням сечовини, вміст якої визначали за допомогою діагностичного набору відповідно до інструкції фірми-виробника ("Simko", Україна). Ензиматичну реакцію ініціювали шляхом внесення аліквоти пермеабілізованих сапоніном лімфоцитів в інкубаційне середовище такого складу (мМ): 20 Трис HCl, 100 L-аргінін, 2 MnCl₂ (pH=9,5); кількість білка у пробі не перевищувала 50–100 мкг/мл. Вміст білка у лімфоцитарній суміші визначали методом Лоурі [24]. Інкубацію здійснювали протягом різних проміжків часу (1–30 хв) і при температурі 37 °С. Реакцію зупиняли шляхом внесення 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 у нмоль сечовини/хв·мг загального протеїну у пробі [11].

Дослідження кінетичних властивостей ензиматичної реакції аргінази проводили в стандартному середовищі інкубації, модифікованому за часом інкубації, кількістю білка лімфоцитарної суміші у пробі та концентрацією субстрату (L-аргініну). Уявні кінетичні параметри, такі, як максимальна миттєва швидкість реакції V_0 , максимальна (платова) кількість утворення продукту реакції P_{\max} та характеристичний час реакції (період напівнасичення) τ , визначали, як описано в статті (Костерин С. А., Бучинская Н. Ф., 1987).

Кінетичні та статистичні розрахунки проводили в режимі програмного забезпечення MS Office. Результати досліджень обробляли загальноприйнятими методами варіаційної статистики з використанням t-критерію Стьюдента. Абсолютне значення коефіцієнта кореляції становило 0,90–0,99. Достовірність розрахованих параметрів прямої перевіряли за F-критерієм Фішера; достовірною вважали апроксимацію, за якої $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Вивчення змін активності аргінази при патологічних станах викликає значний інтерес у дослідників у медико-біологічній практиці. Однак у 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 є незначними й обмеженими.

З метою вивчення особливостей і механізму роботи аргінази в лімфоцитах крові визначали ряд її кінетичних параметрів. Для цього досліджували динаміку утворення сечовини. Суспензію лімфоцитів інкубували в середовищі інкубації протягом різних проміжків часу. Дані експериментів показали, що кінетику аргіназної реакції сапонін-пермеабілізованими лімфоцитами віддзеркалюють криві, які мають тенденцію до насичення (рис. 1). Аналіз отриманих результатів дозволяє дійти висновку, що кінетика реакції розкладу L-аргініну, каталізованого сапонін-пермеабілізованими лімфоцитами, узгоджується із закономірностями реакції першого порядку в діапазоні 0–30 хв.

Тому в подальших експериментах тривалість інкубації лімфоцитів і, відповідно, реакції гідролізу L-аргініну становила 30 хв. Як впливає з рисунка 1, у всьому діапазоні фактора часу кількість утвореної сечовини з участю аргінази лімфоцитів хворих на РеА була у 3,3 раза більшою порівняно з величиною в донорів.

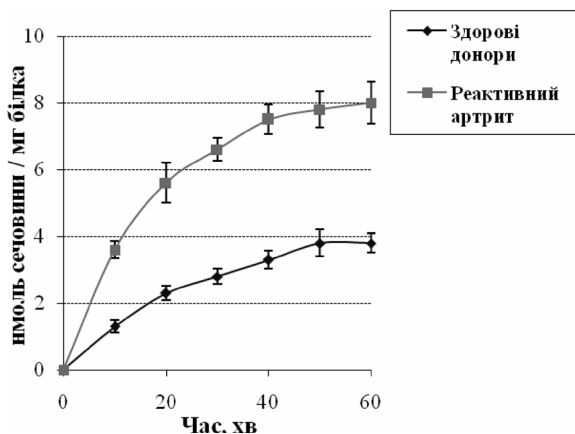


Рис. 1. Динаміка утворення сечовини сапонін-пермеабілізованими лімфоцитами крові донорів і хворих на РеА (M±m, n=11).

При кінетичному аналізі залежності активності аргінази лімфоцитів периферичної крові від концентрації L-аргініну субстрат для ензиматичної реакції аргінази вносили в середовище інкубації у діапазоні концентрацій від 1 до 200 мМ (за сталої концентрації Mn^{2+} 2 мМ). При цьому спостерігали лінійне зростання ензиматичної активності аргінази з наступним виходом на плато. У всьому діапазоні досліджуваних концентрацій L-аргініну активність аргінази у хворих на РеА була підвищеною порівняно з величиною в донорів. Найбільше значення активності досліджуваного ензиму відзначали за наявності в середовищі інкубації 150 мМ L-аргініну (рис. 2).

Шляхом лінеаризації отриманих даних у координатах P/t від P обчислено основні кінетичні характеристики аргіназної реакції сапонін-пермеабілізованими лімфоцитами (табл.).

З даних таблиці випливає, що величина максимальної миттєвої швидкості реакції у донорів та хворих на РеА істотно відрізнялась і складала (160,9±5,5) та (528,4±22,3) нмоль сечовини/хв·мг білка відповідно. Максимальна кількість утвореного продукту реакції у донорів та хворих на РеА також суттєво відрізнялась і становила (5,7±0,1) та (14,2±1,1) нмоль сечовини/хв·мг білка. На основі цього ми припускаємо, що у лімфоцитах периферичної крові хворих на РеА накопичення сечовини аргіназної реакції відбувалося швидше й активніше порівняно з донорами. Водночас

Таблиця – Кінетичні параметри гідролізу L-аргініну сапонін-пермеабілізованими лімфоцитами крові донорів і хворих на реактивний артрит

Кінетичний параметр	Донори	Хворі на РеА
V_0 , нмоль сечовини/ хв·мг білка	160,9±5,5	528,4±22,3***
P_{max} , нмоль сечовини/мг білка	5,7±0,1	14,2±1,1***
τ , хв	35,5±1,8	32,0±1,7

Примітка. Зміни вірогідні стосовно величин у лімфоцитах осіб групи контролю: *** – $p < 0,001$.

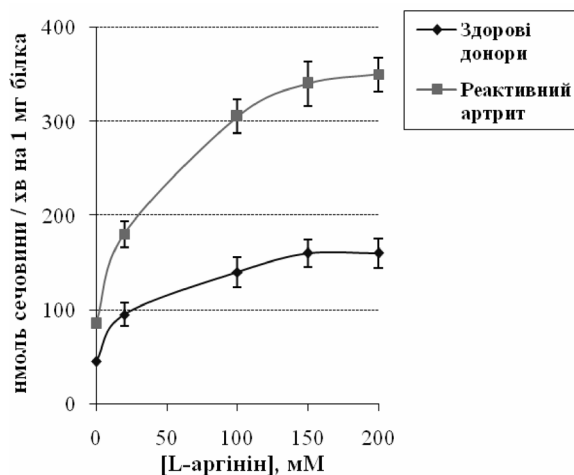


Рис. 2. Концентраційна залежність впливу L-аргініну на активність аргінази лімфоцитів периферичної крові донорів і хворих на реактивний артрит (M±m, n=11).

характеристичний час реакції в нормі й при ревматичній патології суттєво не відрізнявся.

Враховуючи те, що активність аргінази залежить від вмісту білка в лімфоцитарній суміші, аргіназну реакцію ініціювали шляхом внесення в інкубаційне середовище білка в діапазоні концентрацій від 30 до 150 мкг білка/мл. Установлено, що поступове підвищення концентрації лімфоцитарного білка у середовищі інкубації призводило до зростання V_0 аргіназної реакції. Максимальна величина досягалась приблизно при 120 мкг/мл і надалі вірогідно не змінювалась.

Проведені в останні роки дослідження засвідчують, що імунopatологічні процеси залежать від рівня оксиду NO в організмі. Вивчення змін ензиматичної активності аргінази – одного з ключових ензимів метаболізму NO дає інформативну оцінку про перебіг патологічних змін в організмі, зокрема і при аутоімунних захворюваннях.

Зростання аргіназної активності лімфоцитів свідчить про зміни функціональної активності в імунокomпетентних клітинах, що може бути зумовлено порушеннями метаболічних процесів у цих клітинах або також може опосередковуватись через інші регуляторні механізми клітини (іони Ca^{2+} , NO).

Щодо зростання активності аргінази при патологічних станах існують інші дані. Так, з'я-

совано, що при експериментальній гострій ішемії-реперфузії міокарда відбувається підвищення активності аргінази в уражених ділянках серця [12]. Показано зростання рівня аргіназної активності мононуклеарів периферичної крові у ВІЛ-позитивних пацієнтів [19]. Спостерігають підвищення активності аргінази мононуклеарів після травматичних станів [13].

Встановлено збільшення рівня аргіназної активності плазми крові лише у хворих на ревматоїдний артрит, тоді як у пацієнтів із системним червоним вовчаком і остеоартритом не спостерігають значних змін [14]. Показано зростання активності аргінази синовіальної рідини у макрофагах, виділених із синовіальної рідини хворих на ревматоїдний артрит [16, 25].

Більшість досліджень проведено на лізатах клітин, при отриманні яких відбувається певна

інактивація субклітинних структур. Використання пермеабілізованих детергентом клітин дозволяє забезпечити доступ реагентів (субстратів реакції) всередину клітин та зберегти високу нативність, природне співвідношення об'ємів внутрішньоклітинних структур, цілісність клітини і стабільність внутрішньоклітинних структур.

ВИСНОВОК. У результаті проведених досліджень визначено ряд кінетичних параметрів аргіназної реакції та встановлено достовірне зростання максимальної миттєвої швидкості аргіназної реакції в лімфоцитах периферичної крові хворих на РеА (у 3,3 раза) та максимальної кількості утвореного продукту реакції (у 2,5 раза) порівняно з практично здоровими донорами.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Джус М. Б. Клініко-імунологічні особливості перебігу реактивного артриту / М. Б. Джус // Укр. ревматол. журн. – 2004. – **17**, № 3. – С. 44–48.
2. Коноварт О. В. Вплив омега-3 на активність ферментів глутатионової антиоксидантної системи лімфоцитів периферичної крові / О. В. Коноварт, З. Д. Воробець // Буковин. мед. вісник. – 2004. – **9**, № 2. – С. 112–114.
3. Корнійчук О. П. Реактивні артрити та інфекційні чинники / О. П. Корнійчук, О. В. Мельник, Н. Е. Личковська // Клін. та експерим. патологія. – 2012. – **11**, № 1. – С. 181–185.
4. Кочешкова Н. С. Еозин-чутлива АТФазна активність у сперматозоїдах чоловіків як біохімічний тест на олігозооспермію / Н. С. Кочешкова, З. Д. Воробець // Укр. біохім. журн. – 2007. – **79**, № 2. – С. 45–55.
5. Марков Х. М. О биорегуляторной системе “L-аргинин – окись азота” / Х. М. Марков // Пат. физ. експер. терапия. – 2000. – № 1. – С. 34–39.
6. Нейко Є. М. Ревматоїдний артрит: сучасний погляд на проблему / Є. М. Нейко, Р. І. Яцишин, О. В. Штефюк // Укр. ревмат. журн. – 2009. – **36**, № 2. – С. 35–39.
7. Перетятко Ю. Особливості аргіназного та NO-синтазного шляхів метаболізму L-аргініну в лейкоцитах периферичної крові щурів за хронічного рентгенівського опромінення / Ю. Перетятко, Н. О. Сибірна // Укр. біохім. журн. – 2009. – **81**, № 2. – С. 40–48.
8. Петухов В. И. Активные формы кислорода в прогрессировании хронического миелейкоза: перспективы применения натуральных антиоксидантов / В. И. Петухов // Тер. арх. – 2000. – **8**, № 72. – С. 64–67.
9. Ревматичні хвороби в Україні: сучасний стан проблеми і надання медичної допомоги та шляхи покращення / В. М. Коваленко, В. М. Корнацький, Н. М. Шуба, О. П. Борткевич. – Київ, 2002. – 42 с.
10. Спаська Г. О. Реактивний артрит: сучасний погляд на проблему / Г. О. Спаська // Укр. мед. часопис. – 2011. – **11–12**, № 6. – С. 55–59.
11. Шугалей В. С. Содержание мочевины и активность аргиназы в органах крыс при акклиматизации к холоду / В. С. Шугалей, А. С. Козина // Физиол. журн. СССР. – 1977. – № 8. – С. 1199–1202.
12. Юзьків М. Я. Експериментальна гостра ішемія-реперфузія міокарда: роль системи оксиду азота : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. мед. наук / М. Я. Юзьків. – К., 2004. – 20 с.
13. Arginase I Expression and activity in human mononuclear cells after injury / J. B. Ochoa, A. C. Bernard, W. E. O'Brien [et al.] // Ann Surg. – 2001. – **233**, № 3. – P. 393–399.
14. Arginase levels are increased in patients with rheumatoid arthritis / L. W. Huang, K. L. Chang, C. J. Chen [et al.] // Kaohsiung J. Med. Sci. – 2001. – **17**, № 7. – P. 358–363.
15. Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood / A. Boyum // Scand. J. Clin. Lab. Invest. – 1968. – **21**, № 97. – P. 77–79.
16. Corraliza I. Increased expression of arginase II in patients with different forms of arthritis. Implications of the regulation of nitric oxide / L. Corraliza, S. Moncada // J. Rheumatol. – 2002. – **29**, № 11. – P. 2261–2265.
17. Elevated nitric oxide production in patients with primary Sjogren's syndrome / A. Wanchu, M. Khwar, A. Sud [et al.] // Clin. Rheumatol. – 2000. – **19**, № 5. – P. 360–364.
18. Evidence for a pathogenic role of nitric oxide in inflammation-induced osteoporosis / K. E. Amour,

R. J. Van't Hof, P. S. Grabovska [et al.] // J. Bone Miner. Res. – 1999. – **14**, № 12. – P. 2137–2141.

19. Increased level of arginase activity correlates with disease severity in HIV-seropositive patients / T. E. Cloke, L. Garvey, B. S. Choi [et al.] // J. Infect Dis. – 2010. – **202**, № 3. – P. 374–385.

20. Influence of blood and synovia fluid immune complexes of patients with rheumatoid arthritis on production of nitric oxide and rowth and viability of chondrocytes / A. Verbuen, L. S. de Clerck, C. H. Bridts [et al.] // J. Rheumatol. – 2000. – **27**, № 1. – P. 35–40.

21. Lower level of synovial fluid interferon-gamma in HLA-B27-positive than in HLA-B27-negative patients with Chlamidia trachomatis reactive arthritis / S. Bas, T. K. Kvien, N. Buchs [et al.] // Rheumatology (Oxford). – 2003. – **42**, № 3. – P. 461–467.

22. Morris S. M. Jr. Enzymes of arginine metabolism / S. M. Jr. Morris // J. Nutr. – 2004. – **134**, № 10. – P. 2743–2747.

23. Production of nitric oxide during graft rejection is regulated by the Th1/Th2 balance, the arginase ac-

tivity, and Larginine metabolism / V. Holan, J. Pindjakova, M. Krulova [et al.] // Transplantation. – 2006. – **81**. – P. 1708–1715.

24. Protein measurement with the Folin phenol-reagent / O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr [et al.] // J. Biol. Chem. – 1951. – **193**. – P. 265–275.

25. Relationship between synovial fluid and plasma manganese, arginase, and nitric oxide in patients with rheumatoid arthritis / S. Sarban, U. E. Isikan, Y. Kocabey [et al.] // Biol. Trace Elem. Res. – 2007. – **115**, № 2. – P. 97–106.

26. Rivier C. Role of nitric oxide and carbon monoxide in modulating the ACTH response to immune and nonimmune signals / C. Rivier // Neuroimmunomodulation. – 1998. – **5**. – P. 203–213.

27. Virgili F. Procyanidins extracted from Pinus maritima: scavengers of free radical species and modulators of nitrogen monoxide metabolism inactivated murine RAW 264/7 macrophages / F. Virgili, H. Kobuchi, L. Packer // Free Radical Biol. Med. – 1998. – **24**, № 7–8. – P. 1120–1129.

О. В. Мельник, О. П. Корнийчук, З. Д. Воробец

ЛЬВОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ ДАНИЛА ГАЛИЦКОГО

АКТИВНОСТЬ АРГИНАЗЫ В ЛИМФОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ РЕАКТИВНЫМ АРТРИТОМ

Резюме

Исследовано изменения энзиматической активности аргиназы лимфоцитов периферической крови больных реактивным артритом. Установлено достоверное возрастание максимальной мгновенной скорости аргиназной реакции (в 3,3 раза) и максимального количества образованного продукта реакции (в 2,5 раза) в лимфоцитах периферической крови больных по сравнению с практически здоровыми донорами. Определены кинетические параметры аргиназной реакции.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: аутоиммунные заболевания, реактивный артрит, аргиназа, оксид азота, лимфоциты.

O. V. Melnyk, O. P. Korniiichuk, Z. D. Vorobets

DANYLO HALYTSKYI LVIV NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY

ARGINASE ACTIVITY OF PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES IN PATIENTS WITH REACTIVE ARTHRITIS

Summary

The changes of peripheral blood lymphocytes arginase enzymes activity were investigated in patients with reactive arthritis. Accurate growth of arginase activity in peripheral blood lymphocytes of patients (in 3.3 times) was set in comparison with the practically healthy persons. The raw of kinetic parameters of arginase reaction was determined.

KEY WORDS: autoimmune disease, reactive arthritis, arginase, nitric monoxide, lymphocytes.

Отримано 10.12.12

Адреса для листування: З. Д. Воробець, Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, вул. Пекарська, 69, Львів, 69010, Україна.