

© Р. В. Фафула, У. П. Єфремова, Н. Е. Личковська, О. П. Мельник,

УДК 57.086.8+ 576.314

Р. В. Фафула, У. П. Єфремова, Н. Е. Личковська, О. П. Мельник,

З. Д. Воробець, О. Р. Кулачковський*

МЕТОДОЛОГІЧНИЙ ПІДХІД ДО ВИВЧЕННЯ ЕНЗИМАТИЧНОГО СПЕКТРУ ЛІМФОЦИТІВ ПРИ ПАТОЛОГІЧНИХ СТАНАХ З ВИКОРИСТАННЯМ ДЕТЕРГЕНТА САПОНІНУ (УЛЬТРАСТРУКТУРНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ)

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького (м. Львів)

*Львівський національний університет імені Івана Франка (м. Львів)

Робота виконана в рамках наукової теми Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького «Дослідження функціонально-метаболических резервів стрес-лімітуючих систем організму за екстремальних умов з метою виявлення ефективних способів їх корекції», № держ. реєстрації 011101U000121.

Вступ. Лімфоцити представляють собою гетерогенну популяцію клітин та відіграють провідну роль в забезпеченні компенсаторно-приспосувальних реакцій організму [4]. Дослідження ензиматичного спектру лімфоцитів може бути інформативним показником їх функціонального стану і широко використовується при вивченні аутоімунних, імунодіфіцитних, лімфопроліферативних, алергічних та інших захворюваннях [13, 15, 17, 18].

Для вивчення ензиматичних систем лімфоцитів використовують різні методичні підходи – дослідження на ізольованих субклітинних структурах, цілих клітинах або гомогенатах клітин. Вивчати властивості ензимів на фракції ізольованих мембранних везикул або мітохондрій лімфоцитів практично неможливо внаслідок їх швидкої інактивзації під час препаративного одержання фракції субклітинних структур.

При використанні цілих клітин, різні ензиматичні системи, локалізовані в плазматичній мембрані та різних субклітинних структурах, перебувають в латентному стані і є недоступними для субстратів. Тому, тестування ензиматичної активності цих систем можливе лише після попереднього порушення інтактності плазматичної мембрани лімфоцитів. Цього можна досягти додаванням в інкубаційне середовище фактора перфорації плазматичної мембрани (детергента).

Сапонін є відомим мембранним детергентом, який належить до групи речовин амфільної природи, що здатні зв'язуватися з мембранними протеїнами гідрофобними зв'язками, одночасно взаємодіючи полярними групами з водою. Сапоніни здатні утворювати комплекси з холестерином мембран. Мембрани без холестерину стають перфорованими, внаслідок чого порушується ліпоїдна частина оболонки, яка перетворюється з напівпроникної на проникну [2]. Це дає змогу молекулам детергенту розпушувати мембрану, водночас не порушуючи цілісність та нативність клітини та дозволяє забезпечити доступ реагентів у клітину.

Мета дослідження – визначити ультраструктурні особливості лімфоцитів периферичної крові

донорів і хворих на артрити та оцінити вплив детергента сапоніну на зміни ультраструктури лімфоцитів.

Об'єкт і методи дослідження. Забір крові шляхом венепункції проводився з літньої вени у раннішні години умов фізіологічного спокою, у кількості 20 мл в пробірки, які стабілізували гепарином (кінцеве розведення 1:100). Цільну кров, розведену в співвідношенні 1:1 фізіологічним розчином, на шарувували на градієнт густини фікол-тріумбрасу ($\rho = 1,08 \text{ г/см}^3$) й центрифугували 20 хвилин при 500 г. Зняті інтерфазні кільця мононуклеарних клітин двічі відмивали протягом 10 хв фізіологічним розчином [7, 12]. Після останнього центрифугування до осаду додавали невелику кількість фізіологічного розчину, ресуспензували та інкубували протягом 10 хв. при помірному струшуванні у розчині, який містив сапонін у концентрації 0,2%.

Для електронної мікроскопії фіксацію лімфоцитів периферичної крові проводили з використанням 1,0% розчину OsO_4 у какодилатному буфері 90 хв при 0eC. Фіксовані клітини промивали, обезводнювали в розчинах зі зростаючими концентраціями етанолу й окису пропілену. Зразки переносили в епоксидну смолу Епон 812. Ультратонкі зрізи отримували на ультрамікроскопі УМТП-6 і контрастували цитратом свинцю за Рейнольдсом [16]. Перегляд і фотографування зразків проводили на електронному трансмісійному мікроскопі ПЕМ-100 при прискорюючій напрузі 75 кВ. Вихідне збільшення на мікрофотографіях – 4000 разів. Показники збільшення на електронному мікроскопі подаються з точністю до $\pm 5\%$.

Визначення ензиматичної активності АТФ-гідролазних систем проводили спектрофотометрично, реєструючи процес утворення P_i [10, 11].

Результати досліджень та їх обговорення. Лімфоцит, який є центральною клітиною імунної системи, належить до популяції клітин, які мають різні функції та форми [6]. Результати електронно-мікроскопічних досліджень показали, що як в нормі, так і при ревматичній патології основна частина лімфоцитів периферичної крові характеризуються типовою будовою. Виявлено, що лімфоцити периферичної крові мають чітко окреслені цитоплазматичні та ядерні мембрани (**рис. 1**). Цитоплазматична мембрана суцільна та утворює незначні вигини та вирости.

Лімфоцити мають велике, овальне ядро, яке локалізоване здебільшого ексцентрично. Хроматин дрібнозернистий, розподілений рівномірно, спостерігається характерний рисунок еухроматину на

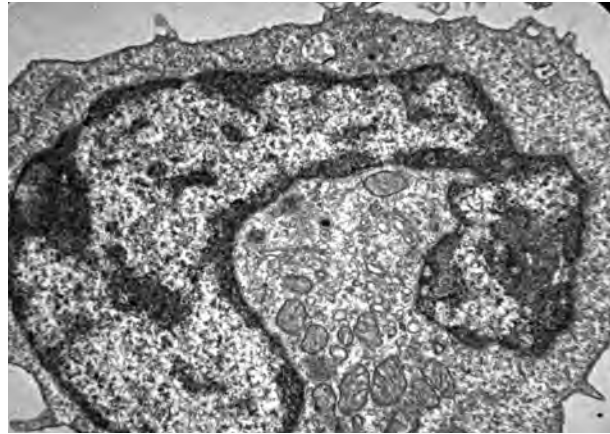
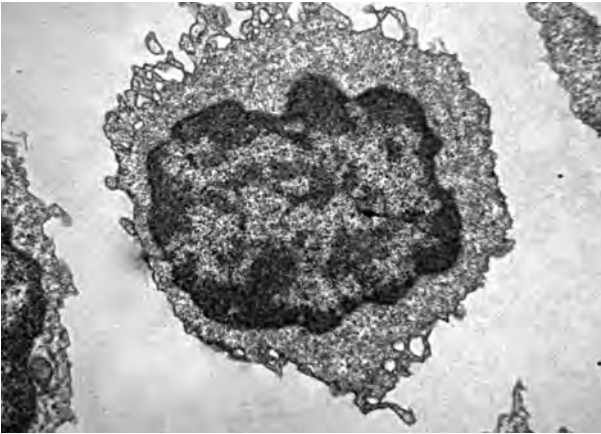


Рис. 1. Ультраструктура типових інтактних лімфоцитів периферичної крові (дані електронної мікроскопії, 36.х44000).

фоні гетерохроматину. Цитоплазматичний матрикс дрібнозернистий, практично однорідної щільності. У цитоплазмі розміщуються поодинокі мітохондрії різної форми, матрикс яких помірно щільний, кристи мітохондрій довгі. Рибосоми формують полісоми, розміщуються дифузно.

При електронно-мікроскопічному дослідженні лімфоцитів периферичної крові інкубованих з сапоніном відмічено значні зміни їх ультраструктури (рис. 2). Ці зміни охоплюють майже всі структурні компоненти лімфоцита, а головним чином його цитоплазматичну мембрану. Плазматична мембрана не є суцільною, виявляються ділянки деструкції мембран. Плазматична мембрана лімфоцитів має множинні дефекти, і цитоплазматичний простір вільно контактує із зовнішньоклітинним середовищем.

Інкубації лімфоцитів з сапоніном веде не тільки до порушень бар'єрних властивостей цитоплазматичної мембрани, але й до змін внутрішньоклітинних ультраструктурних змін. Спостерігається виражене набухання мітохондрій, які відрізняються від нормальних структурою і збільшенням їх розміру. Матрикс мітохондрій має низьку електронну щільність. Ядро лімфоцита зберігає ядерну оболонку, хроматин грубозернистий і розміщується рівномірно, при цьому не спостерігається характерного рисунка

еухроматину на фоні гетерохроматину. Ядерце в ядрі відсутнє.

Схожі результати ультраструктурного дослідження з використанням детергенту сапоніну було отримано також на сперматозоїдах [3]. Дослідниками показано, що при додаванні до суспензії сперматозоїдів 0,5% розчину детергенту сапоніну плазматична мембрана втрачає свою структурованість, цілісність, відшаровується від акросоми та інших клітинних структур.

Отримані дані свідчать про те, що лімфоцити інкубовані з сапоніном зберігають свою структурну цілісність та функціональну активність, а детергент сапонін ефективно пермеабілізує лімфоцитарні мембрани.

Такий експериментальний підхід є перспективним для вивчення «латентних» ензиматичних активностей лімфоцитів, зокрема АТФ-гідролазних систем та аргіназо-NO-синтазної системи.

Відомо, що для вивчення особливостей функціонування АТФ-гідролазних систем, що мають внутрішньоклітинну орієнтацію активних центрів, необхідно пермеабілізувати (перфорувати) мембрану. Такий методологічний підхід був апробований дослідниками нашої лабораторії раніше і успішно використовується нами для вивчення АТФ-гідролазних систем лімфоцитів. Експериментально показано,

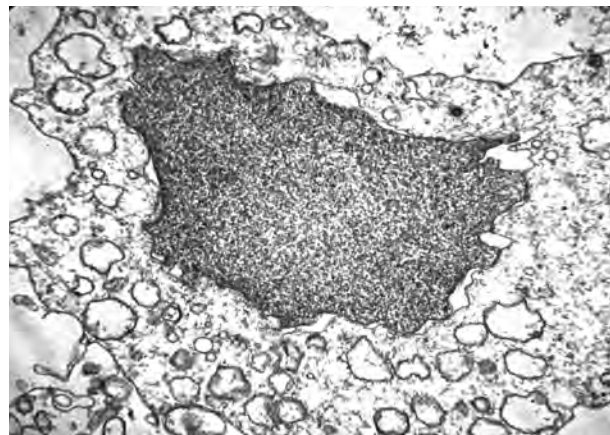
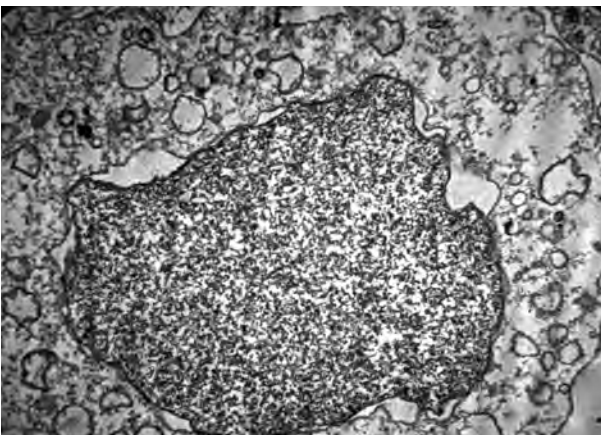


Рис. 2. Ультраструктура оброблених сапоніном лімфоцитів периферичної крові донорів та хворих на ревматоїдний артрит (дані електронної мікроскопії, 36.х44000).

Активність АТР-гідролазних систем лімфоцитів периферичної крові у хворих на ревматичні захворювання, мкмоль Р_i/хв на 1 мг протеїну, М±m

Ензиматична система	Здорові донори (n = 20)	Ревматоїдний артрит (n = 30)	Анкілозивний спондилоартрит (n = 25)	Реактивний артрит (n = 20)
Na ⁺ , K ⁺ -АТР-аза	6,32±0,24	3,63±0,29	3,80±0,26	3,24±0,14
Ca ²⁺ , Mg ²⁺ -АТР-аза ПМ	2,97±0,26	1,58±0,14	1,83±0,19	–
Ca ²⁺ , Mg ²⁺ -АТР-аза мембран ЕПР	2,25±0,17	1,45±0,1	1,8±0,14	–

що максимальна активність Na⁺, K⁺-АТР-ази відмічається за 0,2%, а Ca²⁺, Mg²⁺-АТР-ази – 0,1% концентрації сапоніну [9].

У результаті проведених досліджень з'ясовано, що Na⁺, K⁺-АТР-азна активність лімфоцитів периферичної крові практично здорових донорів становить 6,32±0,24 мкмоль Р_i/хв на 1 мг протеїну. У хворих на ревматоїдний артрит, анкілозивний спондилоартрит та реактивний артрит значення Na⁺, K⁺-АТР-азної активності статистично достовірно відрізняється від величини у здорових донорів і становить 3,63±0,29, 3,80±0,26 та 3,24±0,14 мкмоль Р_i/хв на 1 мг протеїну відповідно (табл.).

Ca²⁺, Mg²⁺-АТР-азна активність плазматичної мембрани і мембран ендоплазматичного ретикулуму лімфоцитів периферичної крові у практично здорових осіб становить 2,97±0,26 і 2,25±0,17 мкмоль Р_i/хв на 1 мг протеїну відповідно. У хворих на ревматоїдний артрит Ca²⁺, Mg²⁺-АТР-азна активність плазматичної мембрани і мембран ендоплазматичного ретикулуму лімфоцитів статистично достовірно відрізняється від здорових донорів та становить 1,58±0,14 і 1,45±0,1 мкмоль Р_i/хв на 1 мг протеїну відповідно. У хворих на анкілозивний спондилоартрит відмічається дещо нижчі відхилення значень гідролазної активності досліджуваних ензиматичних систем стосовно осіб групи контролю – Ca²⁺, Mg²⁺-АТР-азна активність плазматичної мембрани і мембран ЕПР лімфоцитів складає відповідно 1,83±0,19 і 1,8±0,14 мкмоль Р_i/хв на 1 мг протеїну.

Таким чином, модель перфорованих лімфоцитів є зручним об'єктом для тестування не тільки АТР-азних систем, які є мембранозв'язаними ензимами, але й для ензимів субклітинної локалізації. Такий методологічний підхід апробований нами для визначення аргінази та NO-синтази лімфоцитів периферичної крові.

Використання сапоніну для пермеабілізації лімфоцитарних мембран проводилось також дослідниками для вивчення Ca²⁺-гомеостазу лімфоцитів, гепатоцитів та секреторних клітин [1, 8, 14]. Проте, слід зазначити, деякі дослідники для вивчення Ca²⁺-гомеостазу лімфоцитів як пермеабілізуючий агент використовували дигітонін [5].

Висновки. Отже, використання суспензії лімфоцитів, попередньо оброблених сапоніном з метою порушення бар'єрної функції плазматичної мембрани, є адекватним для коректного тестування АТР-гідролазних та аргіназо-NO-синтазної системи лімфоцитів. За таких умов зберігається нативність і природне співвідношення об'ємів внутрішньоклітинних депо.

Перспективи подальших досліджень. Подальше вивчення ультраструктурних особливостей лімфоцитів периферичної крові у поєднанні з дослідженням їх ензиматичного спектру сприятиме отриманню нових наукових фактів стосовно патогенетичних механізмів розвитку ревматичної патології та нових можливостей імунокорекції ревматичних захворювань.

Список літератури

1. Бичкова С. Вікові особливості взаємодії між внутрішньоклітинними Ca²⁺-транспортуючими системами пермеабілізованих гепатоцитів щурів / С. Бичкова // Вісник Львів. ун-ту. Серія біологічна. – 2008. – Вип. 48. – С. 146-152.
2. Болдырев А. А. Введение в биомембранологию / А. А. Болдырев. – М.: Изд. -во МГУ, 1990. – 208 с.
3. Вплив детергентів на ферментативну активність та ультраструктуру сперматозоїдів / Н. С. Кочешкова, З. Д. Воробець, В. Ф. Горчев [та ін.] // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. – 2007. – Т. 37, № 2. – С. 24-29.
4. Гжегоцький М. Р. Система крові. Фізіологічні та клінічні основи / М. Р. Гжегоцький, О. С. Заячківська. – Львів: Світ, 2001. – 173 с.
5. Гребіник Д. М. Кальцієвий гомеостаз в тимоцитах при апоптозі. Акумуляція Ca²⁺ мітохондріями і ендоплазматичним ретикулумом / Д. М. Гребіник, І. І. Гринюк, О. П. Матишевська // Укр. біохім. журн. – 2005. – Т. 77, № 2. – С. 76-81.
6. Казмірчук В. Є. Клінічна імунологія і алергологія / В. Є. Казмірчук, Л. В. Ковальчук. – Вінниця: Нова Книга, 2006. – 528 с.
7. Лаповець Л. Лабораторна імунологія / Л. Лаповець, Б. Луцик. – Київ: Арал, 2004. – 173 с.
8. Манько В. Вплив рутенію червоного на вміст Ca²⁺ у тканині слинних залоз личинки *Chironomus plumosus* / В. Манько, С. Стельмах // Вісник Львів. ун-ту. Серія біологічна. – 2002. – Вип. 29. – С. 171-176.
9. Підковка Н. О. Дослідження деяких властивостей АТФази у лімфоцитах крові людини / Н. О. Підковка, З. Д. Воробець, А. Б. Зіменковський // Експерим. та клініч. фізіологія і біохімія. – 2002. – Т. 7, № 1. – С. 38-41.
10. Фафула Р. В. Кінетичні властивості Na⁺, K⁺-активованої, Mg²⁺-залежної АТР-гідролази лімфоцитів периферичної крові у хворих на ревматоїдний артрит та анкілозивний спондилоартрит / Р. В. Фафула, У. П. Єфремова, Н. Е. Личковська [та ін.] // Укр. біохім. журн. – 2012. – Т. 84, № 3. – С. 44-54.
11. Фафула Р. В. Ca²⁺, Mg²⁺-АТР-азна активність лімфоцитів периферичної крові у хворих на анкілозивний спондилоартрит / Р. В. Фафула, Н. Е. Личковська, У. П. Єфремова [та ін.] // Вісник Луганс. ун-ту. Серія біологічна. – 2012. – № 17 (252). – С. 151-156.

13. 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.
14. Dolgushin M. V. Activity of enzymes in peripheral lymphocytes in simulated allergic disease caused by combined effects of chemical and biologic occupational factors / M. V. Dolgushin, L. M. Sosedova // Med. Tr. Prom. Ekol. – 2006. – Vol. 8. – P. 24-28.
15. Eberl G. Ca²⁺ uptake and IP₃-induced Ca²⁺ release in permeabilized human lymphocytes / G. Eberl, K. Schnell // FEBS Lett. – 1987. – Vol. 222, №. 2. – P. 349-352.
16. Reduced purine 5'-nucleotidase activity in lymphocytes of patients with systemic lupus erythematosus: results of a pilot study / J. Stolk, D. G. de Koning, A. Pennings [et al.] // Ann Rheum Dis. – 1999. – Vol. 58, №. 2. – P. 122-125.
17. Reynolds E. S. The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy / E. S. Reynolds // J. Cell Biol. – 1963. – Vol. 17. – P. 208-212.
18. Ruiz P. Multicolor cytoenzymatic evaluation of dipeptidylpeptidase IV (CD26) function in normal and neoplastic human T-lymphocyte population / P. Ruiz, N. Zacharievich, M. Shenkin // Clin. Diagn. Lab. Immunol. – 1998. – Vol. 5. – P. 362.
19. Terminal deoxynucleotidyl transferase deficiency reduces the incidence of autoimmune nephritis in (New Zealand Black x New Zealand White) F1 mice / C. Conde, S. Weller, S. Gilfillan [et al.] // J. Immunol. – 1998. – Vol. 161, №. 12. – P. 7023-7030.

УДК 57.086.8+ 576.314

МЕТОДОЛОГІЧНИЙ ПІДХІД ДО ВИВЧЕННЯ ЕНЗИМАТИЧНОГО СПЕКТРУ ЛІМФОЦИТІВ ПРИ ПАТОЛОГІЧНИХ СТАНАХ З ВИКОРИСТАННЯМ ДЕТЕРГЕНТА САПОНІНУ (УЛЬТРАСТРУКТУРНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ)

Фафула Р. В., Єфремова У. П., Личковська Н. Е., Мельник О. П., Воробець З. Д., Кулачковський О. Р.

Резюме. Вивчено ультраструктурні зміни лімфоцитів периферичної крові донорів і хворих на артрити після їх обробки детергентом сапоніном. Відзначено, що додавання сапоніну веде до морфологічних перетворень лімфоцитів, які виявляються головним чином у дезінтеграції і порушенні цілісності плазматичних мембран. Підтверджено, що такий експериментальний підхід до вивчення ензиматичного спектру лімфоцитів, зокрема АТФ-гідролазних систем та аргіназо-NO-синтазної системи, з використанням цілих перфорованих сапоніном клітин є перспективним у медико-біологічних дослідженнях.

Ключові слова: лімфоцити, сапонін, пермеабілізація мембран, ультраструктура клітин.

УДК 57.086.8+ 576.314

МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЙ ПОДХОД К ИЗУЧЕНИЮ ЭНЗИМАТИЧЕСКОГО СПЕКТРА ЛИМФОЦИТОВ ПРИ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЯХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДЕТЕРГЕНТА САПОНИНА (УЛЬТРАСТРУКТУРНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

Фафула Р. В., Эфремова У. П., Лычковская Н. Е., Мельник О. П., Воробец З. Д., Кулачковский О. Р.

Изучены ультраструктурные изменения лимфоцитов периферической крови доноров и больных артритом после их обработки детергентом сапонином. Отмечено, что добавление сапонина ведет к морфологическим преобразованиям лимфоцитов, которые проявляются главным образом в дезинтеграции и нарушении целостности плазматических мембран. Подтверждено, что такой экспериментальный подход к изучению энзиматического спектра лимфоцитов, в частности АТФ-гидролазных систем и аргиназно-NO-синтазной системы, с использованием целых перфорированных сапонином клеток является перспективным в медико-биологических исследованиях.

Ключевые слова: лимфоциты, сапонин, пермеабелизация мембран, ультраструктура клеток.

UDC 57.086.8+ 576.314

Methodological Approaches to the Study of Enzymatic Spectrum of Lymphocytes at Patological States with the Application of Saponin (ultrastructure research)

Fafula R., Efremova U., Lychkovska N., Melnyk O., Vorobets Z., Kulachkovskiy O.

Summary. The ultrastructural changes in peripheral blood lymphocytes of donors and patients with arthritis after lymphocyte incubation with detergent saponin were studied. It is noted that the addition of saponin leads to morphological transformation of lymphocytes, which are expressed mainly in the disintegration and violation of the integrity of the plasma membrane. It was confirmed that this experimental approach to the study of enzymatic spectrum of lymphocytes, including ATP-hydrolase systems and arginase-NO-synthase system using perforated by saponin whole cell is perspective in biomedical research.

Key words: lymphocytes, saponin, membrane permeabilization, cell ultrastructure.

Стаття надійшла 7.11.2012 р.
Рецензент – проф. Олійник С. А.