ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ՀԱՆՐԱՊԵՏՈՒԹՅԱՆ ԱՌՈՂՋԱՊԱՀՈՒԹՅԱՆ ՆԱԽԱՐԱՐՈՒԹՅՈՒՆ
ՄԽԻԹԱՐ ՀԵՐԱՑՈՒ անվան ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ
ԲԺՇԿԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆ

14.00.03
A-868

ՀԱՐՈՒԹՅՈՒՆՅԱՆ ՍՈՆԱ ՍԵՐԳԵՅԻ

ՄԱՐԴՈՒ ԼԻՄՖՈՑԻՏՆԵՐՈՒՄ Ca^{2+} - ից ԱՆԿԱԽ և Ca^{2+} -ից ԿԱԽՅԱԼ K^+/H^+ ՓՈԽԱՆԱԿՈՒՄԸ ՆՈՐՄԱՅՈՒՄ ԵՎ ՈՒՌՈՒՑՔԱՅԻՆ ԱՃԻ ԺԱՄԱՆԱԿ

ԺԴ. 00. 03 ՆԵՐՔԻՆ ՀԻՎԱՆԴՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐ (ալերգոլոգիա և իմունոլոգիա)
մասնագիտությամբ բժշկական գիտությունների թեկնածուի
գիտական աստիճանի հայցման ատենախոսության

ՍԵՂՄԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ - 1998

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ АРМЕНИЯ
ЕРЕВАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ имени МХИТАРА ГЕРАЦИ

АРУТЮНЯН СОНА СЕРГЕЕВНА

Ca^{2+} - НЕЗАВИСИМЫЙ И Ca^{2+} - ЗАВИСИМЫЙ K^+/H^+ - ОБМЕН В ЛИМФОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА В НОРМЕ И ПРИ ОПУХОЛЕВОМ РОСТЕ

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук по специальности
ЖД.00.03 ВНУТРЕННИЕ БОЛЕЗНИ (аллергология и иммунология)

ЕРЕВАН - 1998

© National Library of Armenia OCR by Portmind

Աշխատանքը կատարվել է Հայաստանի Հանրապետության
Առողջապահության նախարարության Մխիթար Հերացու անվ. Երևանի
Պետական Բժշկական համալսարանում և Ա Լ. Միքաելյանի անվ.
վիրաբուժության ինստիտուտում

Գիտական ղեկավարներ
- բժշկական գիտությունների դոկտոր, պրոֆեսոր Գամբարով Ս.Ս.
- կենսաբանական գիտությունների դոկտոր Գյուլխանդանյան Ա.Վ.

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ
- բժշկական գիտությունների դոկտոր, պրոֆեսոր Բորոյան Ռ.Ղ.
- բժշկական գիտությունների դոկտոր Քամալյան Լ.Ա.

Առաջատար կազմակերպություն՝ ՀՀ Առողջապահության նախարարության Առողջապահության ազգային ինստիտուտ

Պաշտպանությունը կայանալու է "12" մարտի 1998թ. ժ._____
Մխիթար Հերացու անվ. Երևանի Պետական բժշկական համալսարանին կից
(375025, ք.Երևան, Կորյունի 2) 028 մասնագիտական խորհրդի նիստում:

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ ԵՊԲՀ-ի գրադարանում:
Սեղմագիրը առաքված է "2" փետրվարի 1998թ.

Մասնագիտական խորհրդի քարտուղար
բժշկական գիտությունների թեկնածու Ջուհանյան Ա.Ռ.

Работа выполнена в Ереванском Государственном Медицинском университете им. Мхитара Гераци и в Институте хирургии им. А.Л. Микаеляна Министерства здравоохранения Республики Армения

Научные руководители
- доктор медицинских наук, профессор Гамбарсв С.С.
- доктор биологических наук Гюльханданян А.В.

Официальные оппоненты
- доктор медицинских наук, профессор Бороян Р.Г.
- доктор медицинских наук Камалян Л.А.

Ведущая организация - Национальный институт здравоохранения Министерства здравоохранения Республики Армения

Защита диссертации состоится "12" марта 1998 г. в_____ч. на заседании специализированного Ученого совета 028 при Ереванском Государственном Медицинском университете им. Мхитара Гераци (375025, г. Ереван, ул. Корюна 2).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ЕрГМУ
Автореферат разослан "2" февраля 1998 г.

Ученый секретарь специализированного совета
кандидат медицинских наук Джуганян А.Р.

549-98

© National Library of Armenia

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы: Значение иммунологии на современном этапе развития медицины трудно переоценить. Вряд ли есть в медицине направление, которое существует само по себе и не связано, прямо или косвенно, с такой жесткой и одновременно слишком пластичной иммунной системой.

Лимфоцит- главный элемент иммунной системы, определяющей как условия физиологической жизнедеятельности организма, так и патогенез целого ряда заболеваний , в том числе аутоиммунных .

Изучение механизмов движения ионов и регуляция их транспорта через мембраны, в частности, изучение ионтранспортирующих систем лимфоцитов, играющих ведущую роль в их активации и функционировании, является одной из актуальных задач современной медицины. Нарушение функции лимфоцитов при тех или иных патологических процессах, вероятно, во многом определяется изменением транспорта ионов Ca^{2+}, H^+, K^+ и Na^+, играющих важную роль во многих физиологических процессах (Liu S.-G.J. et al., 1995). В лимфоцитах человека до сих пор не изучен полностью трансмембранный K^+/H^+ - обмен, тогда как обмен внутриклеточных ионов K^+ на внеклеточные ионы H^+ играет важную роль в регуляции объема и pH клеток (Lee S.C. et al., 1988; Stobo J.D., 1988) и может влиять на многие функции лимфоцитов. Поэтому изучение K^+/H^+ - обмена в лимфоцитах человека, равно как и выявление механизмов этого обмена, представляет большой интерес. В последнее время существенное внимание привлекает Ca^{2+} -зависимый K^+- канал клеток. Однако в доступной нам литературе практически нет данных о влиянии ионов Ca^{2+} на сопряженные потоки K^+ и H^+ в лимфоцитах. Большой интерес представляет также изучение Na^+/H^+ - обмена, так как активация лимфоцитов во многом ассоциирована с увеличением внутриклеточного Ca^{2+} и возрастанием внутриклеточного pH (Grinstein S.et al., 1989) за счет выхода H^+ вследствие активации Na^+/H^+ - обменника. Таким образом, K^+/H^+ - обмен в лимфоцитах , влияя на ионный гомеостаз, может играть важную роль в Na^+ - зависимой регуляции внутриклеточного pH и модулировать состояние лимфоцитов.

Проблема злокачественных новообразований- одна из злободневных проблем современной медицины. Известно, что одной из главных причин возникновения и развития опухолевого процесса является нарушение иммунологического гомеостаза (Mentzer S.J., 1995; Hillman G.G. et al.,1995). Степень развития опухолевого процесса отчетливо коррелирует с уровнем иммунной дисфункции, вероятно, во многом определяемой повреждением мембран иммуно-компетентных клеток и нарушением в них транспорта ионов, что диктует необходимость использования характеристик ионтранспортирующих систем лимфоцитов в качестве критериев прогнозирования эффективности проводимого лечения. В этом аспекте особую важность приобретает изучение сопряженного транспорта Ca^{2+}, K^+ и H^+ в лимфоцитах периферической крови и регионарных лимфатических узлов при опухолевом росте. Так как в функционировании лимфоцитов ионтранспортным системам отводится ведущая роль, то весьма

актуальным является изучение влияния на них лекарственных препаратов, в частности, фенотиазиновых производных трифторперазина (ТФП) и хлорпромазина (ХЛП), являющихся мембраноактивными и используемых в практической медицине. Знание механизмов влияния различных препаратов на ионные потоки поможет целенаправленно регулировать интенсивность последних, следовательно , и состояние клетки.

Настоящее исследование посвящено таким актуальным проблемам, как изучение сопряженных потоков Ca^{2+}, H^+, K^+ и Na^+ в лимфоцитах человека в условиях нормы и при опухолевом росте, а также влиянию на них лекарственных препаратов фенотиазинового ряда - ТФП и ХЛП.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы явилось изучение Ca^{2+} -зависимых и Ca^{2+} - независимых потоков ионов K^+ и H^+ в лимфоцитах человека из различных источников в норме и при опухолевом росте и возможностей регуляции этих потоков.

В соответствии с этим были поставлены следующие задачи:

1. Выявить условия индуцирования Ca^{2+}- зависимого и Ca^{2+}- независимого K^+/H^+- обмена в лимфоцитах лимфатических узлов человека.
2. Выявить возможность активирования Na^+/H^+- обмена с помощью индукции K^+/H^+ - антипорта в лимфоцитах лимфатических узлов и периферической крови.
3. Изучить влияние ингибиторов транспорта Ca^{2+} (лантана и верапамила) на K^+/H^+- обмен в лимфоцитах, выделенных из различных источников.
4. Изучить влияние фенотиазиновых производных (ТФП и ХЛП) на сопряженные потоки Ca^{2+},K^+ и H^+ в лимфоцитах, выделенных из различных источников.
5. Исследовать влияние опухолевого роста на процессы транспорта ионов K^+, Ca^{2+}и H^+ в лимфоцитах лимфатических узлов и периферической крови.

Научная новизна. Впервые выявлен Ca^{2+} - независимый K^+/H^+- обмен в лимфоцитах лимфатических узлов человека , а также Ca^{2+} - зависимый K^+/H^+- обмен в лимфоцитах человека, выделенных из периферической крови, небных миндалин и лимфатических узлов.

Путем подкисления внутриклеточного пространства с помощью протонофора СІССР зафиксирован Na^+/H^+- обмен в лимфоцитах лимфатических узлов человека.

Впервые показано нарушение K^+/H^+- обмена в лимфоцитах человека при опухолевом росте: в лимфоцитах периферической крови угнетен Ca^{2+} - зависимый K^+/H^+- обмен; в лимфоцитах регионарных лимфатических узлов - угнетен как Ca^{2+} - зависимый , так и Ca^{2+} - независимый K^+/H^+ - обмен.

Нами впервые выявлено, что фенотиазиновые производные ТФП и ХЛП регулируют сопряженные потоки Ca^{2+} , K^+ и H^+ в лимфоцитах периферической крови, небных миндалин и лимфатических узлов человека.

Практическая значимость. Выявление нарушения ионтранспортирующих систем лимфоцитов при опухолевом росте и знание механизмов влияния лекарственных препаратов на ионные потоки поможет наметить пути их целенаправленной коррекции при опухолевом росте.

Выявленное нами влияние фенотиазиновых производных ТФП и ХЛП на сопряженные потоки ионов Ca^{2+}, K^+ и H^+ в лимфоцитах человека указывает на возможность их использования при лечении лимфопролиферативных заболеваний, а также других патологий, сопровождающихся нарушениями иммунной системы, в частности, аутоиммунных.

Показатели сопряженных потоков Ca^{2+}, K^+ и H^+ могут использоваться как критерии прогнозировния эффективности лечения при опухолевых заболеваниях.

Из полученных нами данных следует, что при различных патологиях, варьируя ионный состав среды, можно модулировать функциональное состояние лимфоцитов, выделенных экстракорпорально.

Потенциометрическую регистрацию ионных потоков через мембрану лимфоцитов с помощью ионселективных электродов можно применять в качестве экспресс-теста для оценки состояния лимфоцитов человека в диагностических целях.

Внедрение результатов исследования в практику здравоохранения. Полученные результаты использованы на курсе клинической иммунологии и аллергологии ЕрГМУ им. М.Гераци и в институте биохимии им. Г. Бунатяна НАН РА.

Апробация работы. Работа апробирована и рекомендована к защите на совместном заседании курса клинической иммунологии и аллергологии ЕрГМУ, кафедры клинической фармакологии ЕрГМУ и кафедры внутренних болезней N1 ЕрГМУ 10 октября 1997 года.

Материалы диссертации опубликованы и доложены на 40- ом ежегодном конгрессе Американского биофизического общества (Baltimore, Maryland, February, 1996), 13-ом Европейском иммунологическом конгрессе (Amsterdam, June, 1997), 70-ой научной конференции ЕрГМУ им. М.Гераци (Ереван, октябрь,1997 г.)

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 5 работ.

Обьем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения , обзора литературы, описания методов исследования, результатов собственных исследований, обсуждения, выводов и практических рекомендаций. Указатель литературы включает работы отечественных и иностранных авторов.
Диссертация изложена на страницах машинописи, иллюстрирована рисунками.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования. Объектом исследования служили лимфоциты лимфатических узлов , периферической крови и небных миндалин человека.

Метод выделения лимфоцитов из периферической крови человека. Лимфоциты из периферической крови человека выделялись методом седиментации клеток в одноступенчатом градиенте фиколл-верографин (Boyum

© National Library of Armenia

А.,1968), основанным на свойстве клеточных элементов крови разделяться благодаря различной плотности.

Метод выделения лимфоцитов из лимфатических узлов и небных миндалин человека. Лимфатические узлы и небные миндалины, полученные сразу после оперативных вмешательств, измельчали в среде RPMI 1640, затем взвесь пропускали через иглу для переливания крови (с помощью шприца) и полученную суспензию клеток фильтровали через нержавеющее сито. Взвесь клеток промывали центрифугированием. Далее лимфоциты выделялись в одноступенчатом градиенте фиколл- верографин.

Приготовление клеточной суспензии тимуса крыс. Тимус белых крыс извлекался после эфирного наркоза и помещался в холодный раствор 0,15 М NaCl. Затем тимус размельчался, гомогенизировался и пропускался через нержавеющее сито. Далее клетки промывались центрифугированием и выделялись в одноступенчатом градиенте фиколл- верографин.

Измерение концентрации ионов K^+ и H^+. Транспорт ионов K^+ и H^+ через мембрану лимфоцитов изучался потенциометрическим методом , основанным на измерении ЭДС гальванического элемента, с помощью K^+ - и H^+ - селективных электродов. Концентрацию ионов H^+ определяли стеклянным водородным электродом. Концентрацию ионов K^+ регистрировали с помощью стеклянного K^+ - селективного электрода марки NAS 2704.

Определение Ca^{2+} - независимого и Ca^{2+} --зависимого выхода K^+ из лимфоцитов. Плотный осадок лимфоцитов суспендировали и добавляли в инкубационную ячейку обьемом 1 мл. Инкубация клеток проводилась при непрерывном размешивании на магнитной мешалке ММ-3М. Добавление протонофора ClCCP при определенных условиях приводило к выходу K^+ и входу H^+ . Для определения Ca^{2+} - зависимого выхода K^+ в среде присутствовал $CaCl_2$.

Метод определения индуцированного протонофором Na^+/H^+- обмена в лимфоцитах. Для выявления Na^+/H^+ - обмена впервые с целью подкисления внутриклеточного пространства лимфоцитов использовался протонофор ClCCP. Ударное добавление 30 мМ NaCl приводило к выходу ионов H^+ вследствие активации Na^+/H^+- обменника.

Оценка полученных результатов. Наличие достоверной связи между отсутствием восстановления Ca^{2+} - зависимого K^+/H^+ - обмена и летальностью было показано с помощью критерия χ^2 для оценки связи (Пьяцца А.,1981).

Клиническая характеристика больных. Исследовались больные с немелкоклеточным раком легких (аденокарцинома, эпидермоидная карцинома, крупноклеточная карцинома). До и после оперативного вмешательства, проведенного на Ш-й стадии развития заболевания ($T_3N_2M_0$), больные консервативное лечение не получали. До операции анализ газов артериальной крови установил альвеолярно-артериальный градиент для O_2 в пределах 35,58±8,41 мм рт. ст. Спирометрически определенный форсированный объем выдоха за 1 сек. - $ФОВ_1$ равнялся 2,87± 0,62; форсированная жизненная емкость легких- ФЖЕЛ - 2,87±0,87. Общее количество лейкоцитов составляло 7520±2290 / мкл; лимфоцитов - 1492±503/ мкл; эозинофилов - 207±65/ мкл.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.

Ранее был показан индуцированный протонофором K^+/H^+ - обмен в лимфоцитах периферической крови и небных миндалин человека(Гамбаров С.С. с соавт.,1996). Мы проверили существование подобного обмена в лимфоцитах лимфатических узлов человека.

Лимфоциты лимфатических узлов человека инкубировали в ячейке с безбуферной холинхлоридной средой в течение 3-4 минут: pH суспензии при этом устанавливалось в пределах 6,3-6,8. Для определения pH внутри лимфоцитов (pHi) в ячейку добавляли сапонин (в конечной концентрации 0,01 %), вызывающий лизис клеток. Так как лимфоциты были инкубированы в безбуферной среде, то после добавления сапонина pHi соответствовало pH суспензии и, по результатам экспериментов, равнялось 7,0±0,05. При данных условиях трансмембранный градиент pH (ΔpH = pHex - pHi) отрицателен и варьирует в пределах 0,2-0,7 единиц pH. Добавление 18 мкМ протонофора ClCCP приводит к резкому входу ионов H^+ и выходу K^+ из лимфоцитов со скоростью 1,2 нмоль K^+/мин x 10^6 клеток. Добавление переносчика ионов K^+ валиномицина после 15-и минутной инкубации вызывало небольшой дополнительный выход K^+ и вход H^+. Стехиометрия обмена составила 1,3-1,4 (n=6).

Мы также добавляли протонофор ClCCP к лимфоцитам лимфатических узлов, инкубированным в слабобуферной среде с pH 7,7-7,9, то есть при положительном трансмембранном градиенте pH (ΔpH>0), в результате чего наблюдался незначительный выход ионов K^+ при отсутствии входа ионов H^+ .

Было проверено действие протонофора ClCCP на перераспределение ионов в тимоцитах крыс. Когда тимоциты инкубировали в условиях отрицательного ΔpH, то при добавлении протонофора также происходил резкий вход H^+ и выход K^+.

При добавлении протонофора к тимоцитам при ΔpH >0 также наблюдался небольшой выход K^+, а движение ионов H^+ не происходило. Таким образом, в лимфоцитах лимфатических узлов человека и тимоцитах крыс при ΔpH<0 происходит активация калиевой проницаемости и выход ионов K^+ по градиенту концентрации вследствие увеличения протонофором протонной проницаемости; а при ΔpH>0 - небольшой симпорт ионов K^+ и анионов, возможно, Cl^- - основного аниона цитоплазмы.

Можно предположить, что в безкальциевой среде индуцированный протонофором K^+/H^+ - обмен является результатом увеличения внутриклеточной концентрации Ca^{2+} и, возможно, активации вследствие этого Ca^{2+} - зависимых K^+-каналов, так как протонофор, являясь разобщителем окислительного фосфорилирования в митохондриях и снижая их мембранный потенциал, может приводить к выходу Ca^{2+} из митохондрий. Однако Гуковская А.С. и Зинченко В.П. (1986) показали, что обработка протонофором тимоцитов не приводит к увеличению внутриклеточной концентрации Ca^{2+}. Гамбаров С.С. с соав.(1995) показали, что в лимфоцитах небных миндалин при низких pH даже при добавлении ионофора A23187 K^+/H^+- обмен не происходит , то есть выход K^+ не связан с активацией Ca^{2+} - зависимых K^+ -каналов.

© National Library of Armenia

Можно предположить, что протонофор ClCCP деполяризует клеточную мембрану, что приводит к активации вольтаж-зависимого K^+ - канала и выходу K^+. Условно назовем индуцированный протонофором в отсутствие внеклеточного Ca^{2+} K^+/H^+ - обмен Ca^{2+} - независимым.

Известно, что нормальное функционирование лимфоцитов, равно как и других клеток , возможно в ограниченном физиологическом интервале pH.

Существует несколько механизмов ,поддерживающих постоянство pH в лимфоцитах :1) Na^+/H^+- обменник, 2) HCO_3^-/Cl^- обменник, 3) H^+ - проводящие пути (Grinstein S. et al.,1989). В лимфоцитах присутствие Na^+/H^+ - обменной системы четко установлено различными методическими приемами : 1) измерением потоков меченного изотопа Na^+ (Grinstein S.et al., 1984), 2) определением концентрации клеточного Na^+ (Calalb M.B.et al. 1987) с одновременным определением pH внутри клетки, 3) методом кислотной нагрузки с применением нигерицина (Grinstein S. et al.,1984).

Мы впервые путем подкисления внутриклеточного пространства протонофором ClCCP зарегистрировали Na^+/H^+ -обмен в лимфоцитах лимфоузлов человека и тимоцитах крыс.

Как было сказано выше , в лимфоцитах лимфоузлов добавление протонофора при определенных условиях приводит ко входу H^+ и выходу K^+ из клеток . Когда pH наружной среды устанавливалось на уровне 7,21, добавляли 30 мМ Na^+, что приводило к выходу H^+ (рис1). В этот момент происходил Na^+/H^+ - обмен: вход внешнего Na^+ в обмен на внутренний H^+.

Мы провели эксперименты с целью выявить активность Na^+/H^+ - обменника в лимфоцитах при низких значениях pH внешней среды. К лимфоцитам, инкубированным в среде с начальным pH 5,6, добавляли протонофор. При этом происходил резкий K^+/H^+ - обмен и pH суспензии устанавливалось на уровне 6,6. Последующие "ударные" внесения 30 мМ NaCl не вызывали активации Na^+/H^+ - обмена. Когда же протонофором вызывали K^+/H^+ -обмен в лимфоцитах с pH суспензии 6,4, то добавление 30 мМ NaCl при установлении pH суспензии 6,93 приводило к активации Na^+/H^+ -обменника. Очевидно, для активации Na^+/H^+ - обменника существует оптимум pH суспензии лимфоцитов.

Таким образом, мы показали, что после индукции K^+/H^+ -антипорта, внесение NaCl приводит к активации Na^+/H^+ -обменника и реверсии потока H^+. Очевидно, что эти процессы могут регулировать состояние лимфоцитов.

О существовании в лимфоцитарных мембранах Ca^{2+} - зависимого K^+ - канала, активируемого увеличением концентрации Ca^{2+} ,имеется немало данных. Мы исследовали влияние активаторов таких каналов ионофора A23187 и β-адреноблокатора пропранолола на Ca^{2+} -зависимый выход K^+ в лимфоцитах лимфатических узлов человека при различных значениях pH суспензии клеток.

Мы показали, что при pH 7,1-7,2 добавление 5 мкМ A23187 к лимфоцитам, инкубированным в присутствии ионов Ca^{2+} в среде, не вызывает существенного выхода ионов K^+ и входа H^+. Однако при таких же условиях добавление A23187 к лимфоцитам, инкубированным с ClCCP, резко усиливает слабый K^+/H^+ -обмен, индуцированный протонофором. Совместное действие ионофора и протонофора приводит к K^+/H^+ -обмену со стехиометрией 1,1-1,2 (n=5). В данном случае

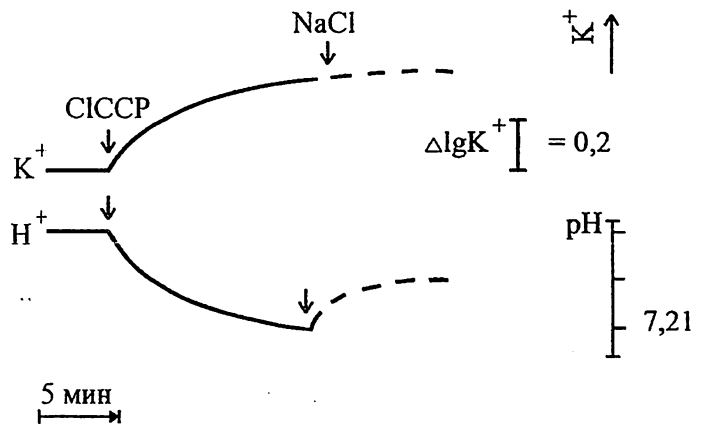

Рис1. Индуцирование Na^+/H^+ - обмена в лимфоцитах лимфатических узлов (50×10^6/мл). Среда инкубации содержит 150мМ холина хлорида и 0,1мМ KCl. pH суспензии 7,26. ClCCP и NaCl добавлены в конечной концентрации 18мкМ и 30мМ, соответственно.

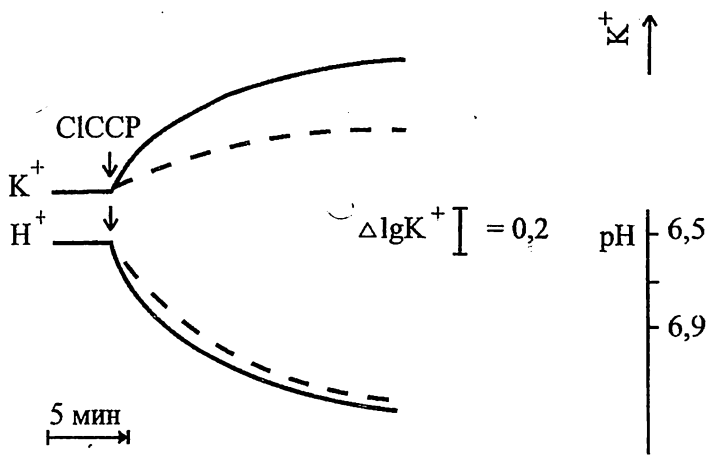

Рис.2 Действие ТФП на ClCCP - индуцированный K^+/H^+- обмен в лимфоцитах периферической крови (40×10^6/мл). Среда инкубации содержит 150мМ холина хлорида и 0,1мМ KCl. pH суспензии 6,5. Пунктирная линия показывает ингибирование ТПФ выхода K^+ и входа H^+.

© National Library of Armenia

активация K^+/H^+ -обмена есть результат увеличения концентрации ионов Ca^{2+} в лимфоцитах, опосредованного кальциевым ионофором А 23187.

При инкубации лимфоцитов в присутствии ионов Ca^{2+} в среде с pH 7,8-7,9 0,4 мМ пропранолола вызывает выход ионов K^+ из клеток (Ca^{2+} - зависимый). При pH суспензии 7,1-7,2 эффект движения ионов при добавлении пропранолола не наблюдается. Незначительный K^+/H^+ - обмен, индуцированный протонофором в лимфоцитах, инкубированных в присутствии ионов Ca^{2+} при pH 7,2-7,6, усиливается при добавлении пропранолола, и стехиометрия обмена составляет 1,05-1,15.

К лимфоцитам в тех же условиях сначала добавляли пропранолол, затем ClCCP: при этом имел место резкий K^+/H^+ - обмен . В безкальциевой среде инкубации пропранолол не воздействовал на движение ионов в лимфоцитах.

Механизм активации пропранололом Ca^{2+} - зависимого выхода K^+ не ясен. Скорее всего, это происходит в результате увеличения концентрации Ca^{2+} в клетке, возможно, вследствие ингибирования пропранололом кальмодулин-зависимой Ca^{2+} -АТФазы (Meltzer H.L.,Kassir S.,1983). Кроме этого, пропранолол повышает чувствительность канальных белков к Ca^{2+} ,что показано Schwartz W.et al.,(1989), то есть способствует входу ионов Ca^{2+}.Отметим, что эти данные получены на эритроцитах.

Наши эксперименты показали, что повышение концентрации Ca^{2+} в цитозоле, вызванное пропранололом и А23187, приводит к активации K^+/H^+ - обмена, который мы назвали Ca^{2+} - зависимым.

Для подтверждения наличия Ca^{2+} -зависимого K^+/H^+ -обмена мы провели серию экспериментов с известными ингибиторами транспорта Ca^{2+} лантаном и верапамилом.

В суспензию лимфоцитов периферической крови ,инкубированных в среде, содержащей 1 мМ $CaCl_2$, при pH 7,1, вносили 100 мкМ $LaCl_3$, затем добавляли протонофор и пропранолол. Внесение La^{3+} приводило к заметному ингибированию K^+/H^+ - обмена, причем выход K^+ подавлялся на 60-70%, а вход H^+ на 40-45% . В безкальциевой среде с pH 6,8 La^{3+} не ингибирует индуцированный протонофором K^+/H^+ -обмен. Как показали наши исследования, верапамил (400 мкМ), подобно La^{3+}, ингибировал индуцированный ClCCP и пропранололом Ca^{2+} - зависимый антипорт K^+ и H^+ в лимфоцитах периферической крови. В лимфоцитах небных миндалин и лимфатических узлов La^{3+} и верапамил также подавляли Ca^{2+} -зависимый K^+/H^+ -обмен.

Таким образом, лантан и верапамил не оказывают эффекта на индуцированный ClCCP K^+/H^+ - обмен, но подавляют K^+/H^+ - обмен, индуцированный ClCCP совместно с пропранололом, что также говорит о существовании двух типов K^+/H^+ -обмена в лимфоцитах: Ca^{2+} - независимого и Ca^{2+} - зависимого.

Известно, что фенотиазиновые производные ТФП и ХЛП являются ингибиторами Ca^{2+} - и Pb^{2+} - зависимых K^+- каналов эритроцитов (Gyulkhandanyan A.V. et al., 1996), а также K^+ - каналов некоторых других типов клеток (Mueller M. et al.,1991). Мы проверили их действие на пути транспорта ионов в лимфоцитах. При инкубации лимфоцитов периферической крови в безкальциевой среде при pH 6,5 в присутствии 80 мкМ ТФП выход ионов K^+

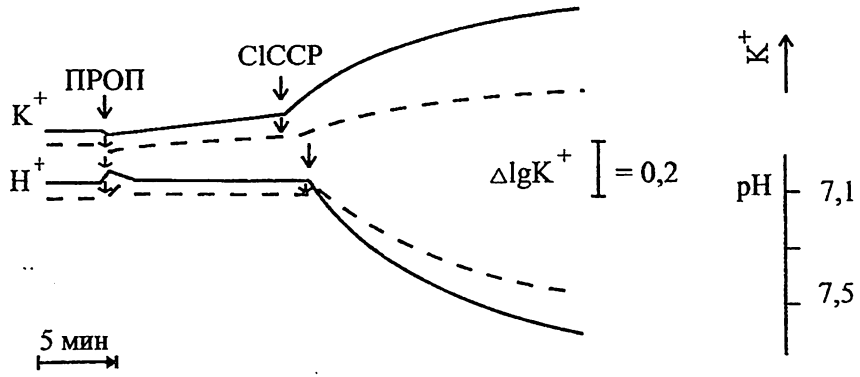

Рис. 3 Влияние ТФП на пропранолол - и ClCCP - индуцированный транспорт ионов в лимфоцитах периферической крови (40×10^6/мл). Среда инкубации содержит 150мМ холина хлорида, 0,1мМ KCl , дополнительно 1мМ $CaCl_2$. pH суспензии 7,1. ТПФ добавлен в конечной концентрации 80мкМ. Пунктирная линия показывает подавление ТПФ выхода K^+ и входа H^+

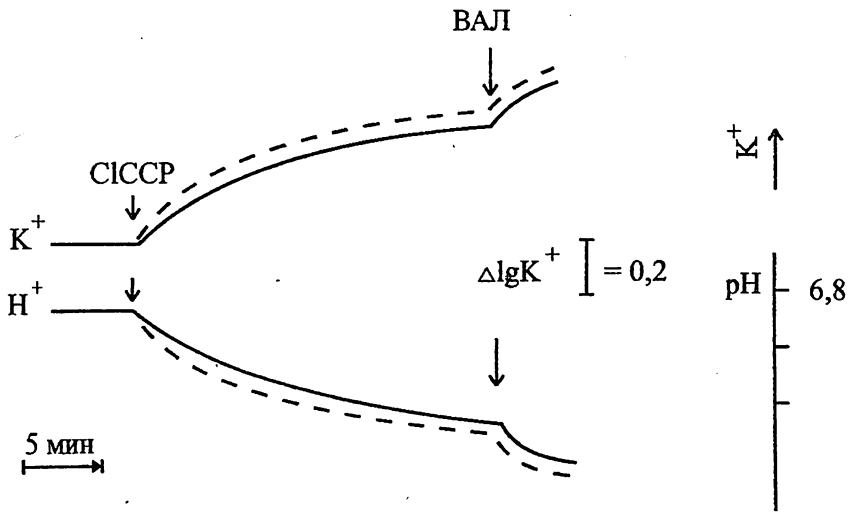

Рис. 4 ClCCP - индуцированный выход K^+ и вход H^+ в лимфоцитах периферической крови при опухолевом росте (40×10^6/мл).Среда инкубации содержит 150мМ холина хлорида и 0,1мМ KCl. pH суспензии 6,8. ClCCP и валиномицин добавлены в конечной концентрации 18мкМ и 1,2мкМ, соответственно. Пунктирная линия показывает контроль (лимфоциты периферической крови донора).

© National Library of Armenia

подавлялся более чем на 50%, в то время как вход ионов H^+ практически не менялся. (рис.2). Как было сказано выше, совместное действие протонофора и пропранолола в лимфоцитах, инкубированных в среде, содержащей 1 мМ $CaCl_2$ с pH 7,1-7,2 вызывает выраженный K^+/H^+- обмен. В таких системах предварительная инкубация лимфоцитов с 80 мкМ ТФП также приводит к заметному подавлению выхода K^+ и входа H^+ (рис.3), причем выход K^+ подавляется на 60-80 %, а вход H^+ - на 30-40%. В случае индуцирования K^+/H^+ - обмена ионофором А23187 и протонофором в присутствии ионов Ca^{2+}, предварительная инкубация клеток с ТФП также приводила к ингибированию K^+/H^+- антипорта. Аналогичные эффекты на Ca^{2+} -зависимые и Ca^{2+} - независимые потоки ионов K^+ и H^+ оказывал и ХЛП.

Подобные результаты по влиянию ТФП и ХЛП на K^+/H^+ - обмен были получены также в лимфоцитах небных миндалин и лимфатических узлов.

Из полученных нами данных видно, что при Ca^{2+}- независимом K^+/H^+-обмене потоки K^+ и H^+ не сопряжены, и это может говорить о том, что Ca^{2+}-независимый K^+/H^+- обмен происходит благодаря активации K^+- каналов протонами (или деполяризации мембраны), а не в результате функционирования K^+/H^+-обменника. При Ca^{2+}-зависимом K^+/H^+- обмене ингибирование фенотиазиновыми производными выхода K^+ и входа H^+ в разной степени говорит о возможности различных путей выхода K^+: 1) за счет функционирования K^+/H^+-обменника и 2) через Ca^{2+}-зависимый K^+-канал, для активации которого, кроме ионов Ca^{2+}, необходимо наличие протонной проницаемости. Исходя из того, что ТФП является классическим антагонистом кальмодулина, мы предполагаем, что Ca^{2+}-зависимый K^+/H^+-обмен может быть кальмодулин-зависимым, как и большинство Ca^{2+}-зависимых клеточных процессов.

Мы исследовали сопряженный транспорт ионов Ca^{2+}, K^+ и H^+ в лимфоцитах периферической крови и регионарных лимфатических узлов больных, страдающих немелкоклеточным раком легких.

При добавлении протонофора ClCCP к инкубированным в безбуферной среде с pH 6,8 лимфоцитам периферической крови наблюдался вход ионов H^+ и выход K^+. Последующее внесение валиномицина (1.2 мкМ) вызывало незначительный дополнительный выход K^+ и вход ионов H^+ (рис.4). Из рисунка 4 видно, что реакция лимфоцитов периферической крови при немелкоклеточном раке легких практически не отличалась от контроля.Чтобы определить, происходит ли Ca^{2+} - зависимый K^+/H^+ - обмен в лимфоцитах периферической крови при опухолевом росте, мы инкубировали клетки в стандартной холинхлоридной среде, содержащей 1 мМ $CaCl_2$ с pH 7,0-7,1 и добавили ионофор А23187 и протонофор: наблюдался слабый выход K^+ и вход H^+, по сравнению с контролем-лимфоцитами периферической крови доноров (рис.5). Добавление протонофора и пропранолола к лимфоциам, инкубированным в Ca^{2+} - содержащей среде с pH 7,0-7,1 вызывало слабый выход K^+ и вход H^+ по сравнению с котролем.

При инкубации лимфоцитов регионарных лимфатических узлов в безбуферной среде с pH 6.3-6.7 при добавлении ClCCP (18 мкМ), в отличие от контроля-лимфоцитов лимфатических узлов при спонтанном пневмотораксе, регистрировался слабый вход H^+ и малозаметный выход K^+ (рис.6). При

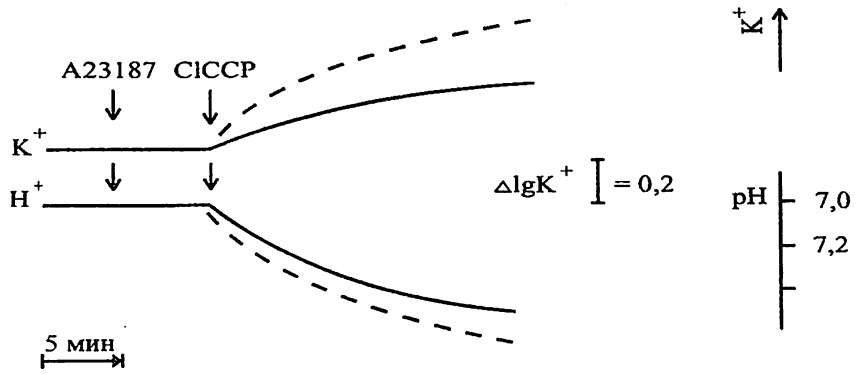

Рис.5 Влияние А 23187 и ClCCP на движение ионов в лимфоцитах периферической крови при опухолевом росте (40×10^6/мл). Среда инкубации содержит дополнительно 1мМ $CaCl_2$. pH суспензии 7,0. Добавлено 5мкМ А 23187 и 18 мкМ ClCCP. Пунктирная линия - контроль (лимфоциты периферической крови донора).

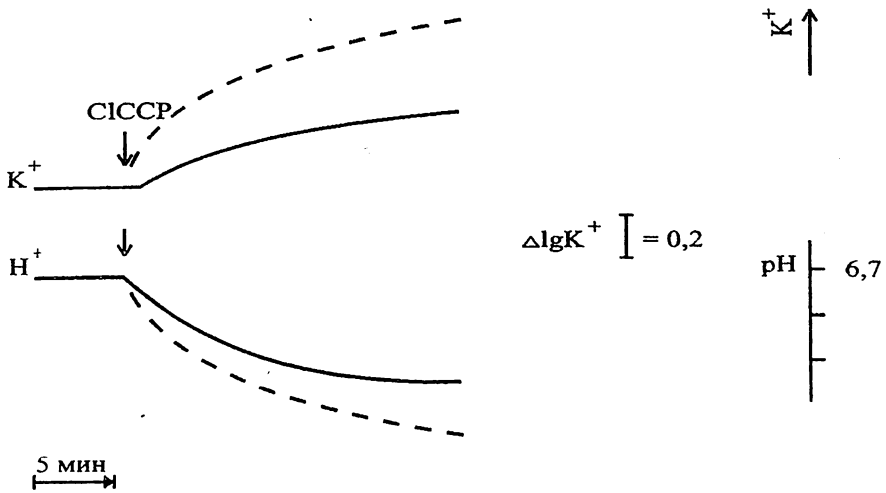

Рис.6 ClCCP - индуцированный выход K^+и вход H^+в лимфоцитах лимфатических узлов при опухолевом росте (40×10^6/мл).Среда инкубации содержит 150мМ холина хлорида и 0,1мМ KCl. pH суспензии 6,7. Добавлено18мкМ ClCCP. Пунктирная линия показывает контроль (лимфоциты лимфатических узлов при спонтанном пневмотораксе).

© National Library of Armenia

инкубации лимфоцитов лимфоузлов в присутствии 1мМ $CaCl_2$ при pH 7.0-7.4 последующее добавление протонофора и ионофора A23187 или пропранолола вызывало незначительный, по сравнению с контролем, вход H^+ и выход K^+ (рис.7).

Таким образом, мы показали, что при опухолевом росте Ca^{2+} - независимый K^+/H^+ - обмен угнетен в лимфоцитах регионарных лимфатических узлов, а Ca^{2+} - зависимый K^+/H^+ - обмен подавлен как в лимфоцитах регионарных лимфоузлов, так и периферической крови. Отметим, что в лимфоцитах регионарных лимфатических узлов он подавлен сильнее, скорее всего, из-за того, что это клетки из лимфатического коллектора пораженной опухолью ткани, фактически, из Locus minoris.

У лиц, перенесших оперативное вмешательство по поводу немелкоклеточного рака легких, через 45 дней после операции в лимфоцитах периферической крови мы проверили активность Ca^{2+} - зависимого K^+/H^+ -обмена.

При инкубации лимфоцитов в среде, содержащей ионы Ca^{2+}, при pH 7,1-7,3 при добавлении пропранолола и протонофора у 15-и из 20-и исследованных лиц регистрировался выраженный K^+/H^+ -обмен, то есть Ca^{2+} - зависимый K^+/H^+-обмен был восстановлен. При индуцировании Ca^{2+} - зависимого K^+/H^+ - обмена совместным воздействием на лимфоциты протонофора и ионофора A23187 также наблюдалось восстановление Ca^{2+} -зависимого K^+/H^+ - обмена.

У 5-и лиц в лимфоцитах периферической крови восстановление Ca^{2+} - зависимого K^+/H^+- обмена не происходило: при его индуцировании протонофором и ионофором , или протонофором и пропранололом имел место слабый выход K^+ и вход H^+. В группе с невосстановленным Ca^{2+} -зависимым K^+/H^+ -обменом (через 45 дней после операции) наблюдался летальный исход в течение 6-12 месяцев после оперативного вмешательства.

Для оценки полученных результатов была составлена таблица взаимной сопряженности 2X2 (четырехпольная таблица) и определен критерий χ^2 для оценки связи.

Восстановление Ca^{2+}- K^+/H^+-обмена		Летальность	
		есть	нет
Есть	15	1(a)	14(b)
Нет	5	4(c)	1(d)
		C_1=a+c	C_2=b+d

R_1=a+c
R_2=b+d

$$\chi^2 = \frac{(ad-bc)^2 \cdot N}{R_1 R_2 C_1 C_2}$$

Полученный нами критерий χ^2 соответствует p<0,01и показывает достоверную связь между отсутствием восстановления Ca^{2+} - зависимого K^+/H^+ - обмена в лимфоцитах периферической крови и летальностью при опухолевых процессах.

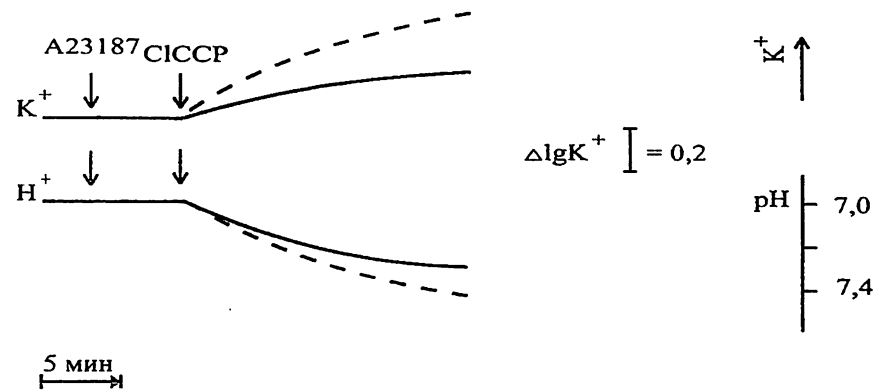

Рис.7 Влияние A 23187 и ClCCP на перераспределение ионов в лимфоцитах лимфатических узлов при опухолевом росте ($50 \cdot 10^6$/мл). Среда инкубации содержит 150мМ холина хлорида, 0,1 мМ KCl и дополнительно 1мМ CaCl. A 23187 и ClCCP добавлены в конечной концентрации 5мкМ и 18мкМ, соответственно. Пунктирная линия - контроль (лимфоциты из лимфатических узлов при спонтанном пневмотораксе).

© National Library of Armenia

ВЫВОДЫ.

1. В человеческих лимфоцитах различного происхождения имеет место Ca^{2+}-независимый и Ca^{2+} - зависимый K^+/H^+ - обмен.
2. Впервые в лимфоцитах лимфатических узлов человека путем подкисления внутриклеточного пространства с помощью протонофора ClCCP зарегистрирован Na^+/H^+ - обмен и показана его pH - зависимость.
3. Ингибиторы транспорта Ca^{2+} лантан и верапамил подавляют Ca^{2+} - зависимый K^+/H^+- обмен в лимфоцитах периферической крови, небных миндалин и лимфатических узлов, не влияя на Ca^{2+} - независимый K^+/H^+ - обмен.
4. В лимфоцитах периферической крови, небных миндалин и лимфатических узлов препараты фенотиазинового ряда в системе Ca^{2+} - независимого K^+/H^+- обмена подавляют выход K^+, практически не влияя на вход H^+.
5. Препараты фенотиазинового ряда в системе Ca^{2+} - зависимого K^+/H^+ - обмена угнетают как выход ионов K^+ , так и вход H^+, причем угнетение выхода ионов K^+ выражено сильнее, чем входа H^+.
6. При опухолевом росте в лимфоцитах, выделенных из регионарных лимфатических узлов, угнетен как Ca^{2+} - зависимый, так и Ca^{2+} - независимый K^+/H^+ - обмен. В лимфоцитах периферической крови угнетен Ca^{2+} - зависимый K^+/H^+ - обмен, в то время как Ca^{2+} - независимый K^+/H^+- обмен не ингибирован.
7. При опухолевом росте отсутствие восстановления Ca^{2+} -зависимого K^+/H^+ - обмена в лимфоцитах периферической крови в послеоперационном периоде является прогностическим критерием летального исхода в ближайшие 6-12 месяцев.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.

1. При опухолевом росте показатель Ca^{2+} - зависимого K^+/H^+- обмена лимфоцитов периферической крови человека может быть использован как критерий прогнозирования эффективности лечения.
2. Препараты фенотиазинового ряда могут быть использованы при лечении лимфопролиферативных заболеваний.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.

1. The coupled transport of Ca^{2+} ,K^+ and H^+ ions in human lymphocytes.// Medical Science of Armenia.-Yerevan,-1995.-V.35.-N1-2.-P.66-74 (S.S.Gambarov, A.V.Gyulkhandanyan, K.M.Markossian, K.G.Nahapetian, S.S.Haroutyunian, A.V.Hakopian, R.M.Tanashian, T.K.Davtian).
2. Coupled fluxes of H^+,K^+ and Ca^{2+} ions across the lymphocyte membranes.// Biophys.J.-1996.-V.70.-A 207 (A.V.Gyulkhandanyan, S.S.Gambarov, K.M.Markossian, S.S.Haroutyunian).
3. Ca^{2+}- зависимые и Ca^{2+}- независимые потоки K^+ и H^+ в лимфоцитах человека// В кн: "Материалы 70-й научной конференции ЕрГМУ им. М. Гераци."- Ереван,1997.-с.6. (С.С. Гамбаров, А.В.Гюльханданян, Т.А. Гюльбаязян, С.С. Арутюнян, К.Г. Нахапетян).
4. K^+/H^+ exchange in human lymphocytes and its alteration during tumor growth.// In:Abstracts resumes of 13th European Immunology Meeting.-Amsterdam, 1997.- abst N P.5.10.16. (S.S.Gambarov, A.V.Gyulkhandanyan, K.M.Markossian, T.A. Gyulbayazyan, S.S.Haroutyunian, K.G.Nahapetian).
5. Изучение K^+/H^+ - обмена в лимфоцитах при опухолевом росте.//В сб.: "Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины". Ереван, 1998.- с. Арутюнян С.С.

« ՄԱՐԴՈՒ ԼԻՄՖՈՑԻՏՆԵՐՈՒՄ Ca^{2+} - ԻՑ ԱՆԿԱԽ ԵՎ Ca^{2+} - ԻՑ ԿԱԽՅԱԼ K^+/H^+ - ՓՈԽԱՆԱԿՈՒՄԸ ՆՈՐՄԱՅՈՒՄ ԵՎ ՈՒՌՈՒՑՔԱՅԻՆ ԱՃԻ ԺԱՄԱՆԱԿ »

Հարությունյան Սոնա Սերգեյի

ԱՄՓՈՓՈՒՄ

Ներկայացվող աշխատանքում ուսումնասիրված են մարդու լիմֆոցիտներում Ca^{2+}, H^+, K^+ և Na^+ իոնների համակցված շարժը նորմայում և ուռուցքային աճի ժամանակ, ինչպես նաև ֆենոթիազինային շարքի դեղամիջոցների ազդեցությունը իոնային հոսքերի վրա:

Հայտնաբերված է, որ մարդու տարբեր ծագումի լիմֆոցիտներում տեղի է ունենում Ca^{2+} - ից անկախ և Ca^{2+} -ից կախյալ K^+/H^+ - փոխանակում:

Առաջին անգամ մարդու ավշային հանգույցների լիմֆոցիտներում պրոտոնոֆոր ClCCP- ի միջոցով ներբջջային միջավայրի թթվայնության բարձրացմամբ արձանագրված է Na^+/H^+ -փոխանակում և հայտնաբերված է նրա pH - կախյալությունը:

Ca^{2+} իոնների փոխադրման La^{3+} և վերապամիլ արգելակչները ճնշում են Ca^{2+}-ից կախյալ K^+/H^+ - փոխանակումը արյան, նշագեղձերի և ավշային հանգույցների լիմֆոցիտներում և չեն ազդում Ca^{2+}-ից անկախ K^+/H^+ - փոխանակման վրա:

Հայտնաբերված է, որ ֆենոթիազինային շարքի դեղամիջոցները Ca^{2+}-ից անկախ K^+/H^+- փոխանակման համակարգում ճնշում են K^+ իոնների արտահոսքը և չեն ազդում H^+ իոնների ներհոսքի վրա: Սակայն, Ca^{2+}-ից կախյալ K^+/H^+ - փոխանակման

© National Library of Armenia

համակարգերում նույն դեղամիջոցները ճնշում են ինչպես H^+ իոնների ներհոսքը, այնպես էլ K^+ իոնների արտահոսքը, ընդորում վերջինս ավելի ուժգին:

Ֆենոթիազինային շարքի դեղամիջոցների հայտնաբերված ազդեցությունը մարդու լիմֆոցիտների Ca^{2+}, K^+ և H^+ իոնների համակցված հոսքերի վրա հնարավորություն է ընձեռնում օգտագործել վերոհիշյալ դեղամիջոցները լիմֆոպրոլիֆերատիվ հիվանդությունների բուժման ժամանակ, ինչպես նաև մի շարք այլ ախտաբանական վիճակների դեպքում, որոնք ուղեկցվում են իմուն համակարգի խանգարմամբ, մասնավորապես աուտոիմունային:

Առաջին անգամ մարդու լիմֆոցիտներում ուռուցքային աճի ժամանակ ցույց է տրված K^+/H^+ - փոխանակման խանգարումը:

Թոքի ոչմանրաբջջային քաղցկեղով տառապող հիվանդների ավշային հանգույցների լիմֆոցիտներում ճնշված է և Ca^{2+}-ից անկախ, և Ca^{2+}-ից կախյալ K^+/H^+ - փոխանակումը համեմատած սպոնթան պնևմոթորաքսի կապակցությամբ հեռացված ավշային հանգույցների լիմֆոցիտների հետ: Արյան լիմֆոցիտներում, դոնորների արյան լիմֆոցիտների հետ համեմատ, ճնշված է միայն Ca^{2+}-ից կախյալ K^+/H^+ - փոխանակումը: Հայտնաբերված է, որ թոքի ոչմանրաբջջային քաղցկեղի կապակցությամբ վիրահատական միջամտությունից 45 օր անց հետազոտվածներից մեծ մասի մոտ արյան լիմֆոցիտներում Ca^{2+}-ից կախյալ K^+/H^+ - փոխանակումը վերականգնվում է: Ցույց է տրված հավաստի կապ արյան լիմֆոցիտներում Ca^{2+}-ից կախյալ K^+/H^+ - փոխանակման վերականգման բացակայության և մահացության միջև վիրահատությունից 6-ից 12 ամիս անց:

Այսպիսով, ուռուցքային աճի ժամանակ լիմֆոցիտների իոնափոխադրիչ համակարգերի խանգարման հայտնաբերումը և ֆենոթիազինային շարքի դեղամիջոցների ազդեցության մեխանիզմների բացահայտումը իոնային հոսքերի վրա նախանշում է նրանց նպատակասլաց շտկման ուղիներ ուռուցքային աճի ժամանակ: Ուռուցքային հիվանդների արյան լիմֆոցիտների Ca^{2+}-ից կախյալ K^+/H^+ - փոխանակման ցուցանիշը կարող է ծառայել որպես բուժման արդյունավետության չափանիշ:

Ca^{2+}- INDEPENDENT AND Ca^{2+} - DEPENDENT K^+/H^+ - EXCHANGE IN HUMAN LYMPHOCYTES IN RATE AND DURING TUMOUR GROWTH

Sona S. Haroutyunyan

SUMMARY

The research had investigated coupled fluxes of Ca^{2+} , H^+, K^+ and Na^+ ions in human lymphocytes of different origin in rate and during tumour growth, as well as the impact of phenothiazine drugs - TFP and CLP on the coupled fluxes of ions.

For the firs time Ca^{2+} - independent K^+/H^+ exchange in lymphocytes of lymph nodes, as well as Ca^{2+} - dependent K^+/H^+ exchange in lymphocytes of peripheric blood, palatine tonsils, and lymph nodes had been revealed.

Na^+/H^+ - exchange in human lymphocytes of lymph nodes had been registered during the decrease of intracellular pH with protonophore CCCP.

We had revealed for the first time that phenothiazine drugs - TFP and CLP regulate coupled fluxes of Ca^{2+} , K^+ and H^+ in lymphocytes of peripheric blood, palatine tonsils, and lymph nodes.

For the first time disorder of K^+/H^+ exchange in human lymphocytes during tumour growth had been shown: in lymphocytes of peripheric blood only Ca^{2+} - dependent K^+/H^+

15.05.2014

exchange was depressed, while in lymphocytes of lymph nodes both Ca^{2+} - dependent - and Ca^{2+} - independent K^+/H^+ exchange were depressed.

It was shown that after 45 days of operation of non-small cell lung cancer in lymphocytes of peripheric blood Ca^{2+} - dependent K^+/H^+ exchange had been rehabilitating. Reliable connection between the absence of rehabilitation of Ca^{2+} - dependent K^+/H^+ exchange and lethality during the first 6 to 12 months after the operation was demonstrated.

Consequently the indicator of Ca^{2+} - dependent K^+/H^+ exchange in human lymphocytes of peripheric blood can be used as a criteria for prognosis of effectiveness of treatment.

Revealed disorders of iontransporting systems of lymphocytes during tumour growth and mechanism of impact of phenothiazine drugs on ion fluxes show the possibility of their use for lymphoprolipherative diseases.

From the date that we had received follows that at different pathologies the functional state of lymphocytes, extracted extracorporately, may be modulated by the changing the ion content of medium.

© National Library of Armenia

Հանձնված է տպագրության 23.01.1998 թ.

Տպաքանակ 60

Տպագրված է ՀՀԲՈՀ-ի պատվերով

ԻՆՖՈՍԵՐՎԻՍ Պ/Ձ, Կիևյան 16

© National Library of Armenia