

ОСОБЕННОСТИ МЕТАБОЛИЗМА ЭНДОГЕННЫХ ПОРФИРИНОВ В ЛИМФОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ДОНОРОВ И ПАЦИЕНТОВ С РАССЕЯННЫМ СКЛЕРОЗОМ

А.Г.¹ Байда, А.С.¹ Федулов, Е.С.² Лобанок

¹Белорусский государственный медицинский университет
²Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси

Рассеянный склероз (РС) — хроническое демиелинизирующее мультифакториальное заболевание центральной нервной системы (ЦНС), поражающее людей молодого возраста и сопровождающееся утратой работоспособности, что обуславливает социально-экономическую значимость проблемы.

На современном этапе изучения механизмов развития РС существенное значение придается вирусной инфекции, которая может играть роль первичного стимула, и при наличии генетически обусловленных особенностей иммунного ответа вызвать активацию аутореактивных Т-лимфоцитов, способных атаковать антигены миелина. Активированные Т-клетки проникают через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) и атакуют антигенпрезентирующие клетки (макрофаги и клетки глии). Последние поглощают и экспрессируют антигены на своей мембране в комплексе с HLA-молекулами класса II, которые соединяясь с рецептором Т-клетки служат главным звеном в развитии аутоиммунного процесса при РС. Происходит их миграция в очаг поражения, выделяются провоспалительные цитокины, нарушается проницаемость ГЭБ, активируются В-клетки и все составляющие гуморального иммунитета, система комплемента, а также моноциты/макрофаги. Макрофаги, продуцируя активные метаболиты кислорода, запускают реакции воспалительного стресса. Результатом являются очаговые разрушения и гибель олигодендроцитов с формированием бляшки [1, 2, 8].

Большинство исследований, проведенных на лимфоидных клетках у пациентов с РС, посвящены выявлению иммунопатологических реакций, тогда как их метаболический статус изучен недостаточно. В последние годы появились сообщения о возможности увеличения содержания эндогенных порфиринов в животных клетках и тканях при добавлении к ним предшественника синтеза гемма-аминолевулиновой кислоты (АЛК). Показано, что АЛК-индуцируемое накопление пигментов выражено при увеличении функциональной активности клеток. Способность ЛПК человека к АЛК-индуцируемому накоплению порфириновых пигментов позволяет проводить исследования метаболизма и уровня порфириновых пигментов при патологии, связанной с изменением функциональной активности клеток иммунной системы, что наблюдается при РС. Имеются работы по исследованию индуцируемого аминокислотой накопления эндогенных порфиринов в лимфоцитах периферической крови больных системной красной волчанкой и ревматоидным артритом [5]. Поэтому исследование порфиринообразования в лимфоцитах периферической крови у пациентов с РС и изменения метаболического состояния иммунных клеток при данной патологии важны для уточнения патогенетических особенностей развития, течения заболевания и модуляции существующих терапевтических опций.

Цель исследования: изучение метаболизма эндогенных порфиринов в лимфоцитах периферической крови доноров и пациентов с рассеянным склерозом.

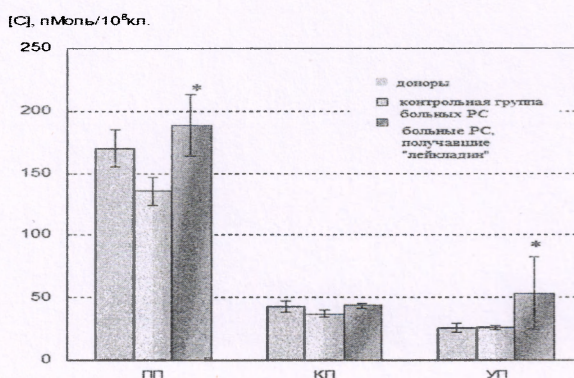
Материал и методы. Исследование проведено на ЛПК доноров (10 человек) и у пациентов с РС (20 человек). Экстракцию из ЛПК основных видов порфириновых пигментов проводили по методу Римингтона [7]. Содержание отдельных видов порфириновых пигментов определяли по интенсивности флуоресценции солянокислых экстрактов и калибровочным прямым. Спектры флуоресценции снимали в диапазоне 550–720 нм при длинах волн возбуждения 405, 399,5 и 407 нм и регистрации 596, 594 и 601 нм для уропорфирина (УП), копропорфирина (КП) и протопорфирина (ПП) соответственно на спектрофлуориметре «JobinYvons».

Для статистической обработки данных с использованием приведенных выше критериев использовался пакет прикладных программ STATISTICA-6.0 в среде WINDOWS XP. Оценка результатов проводилась исходя из средних значений с учетом стандартных отклонений и ошибок.

Результаты исследования. Для анализа содержания в клетках отдельных видов пигментов проведена экстракция отдельных видов порфириновых пигментов из суспензий ЛПК, проинкубированных в течение 4 часов с АЛК. Сравнение спектров возбуждения и флуоресценции солянокислых экстрактов из клеток со спектрами стандартных растворов порфиринов подтвердило присутствие

в образцах ЛПК основных порфиринов — ПП, КП и УП. В ЛПК в ответ на добавление АЛК преимущественно накапливался ПП, наименьший уровень образования зарегистрирован для УП, в то время как содержание КП имело промежуточное значение. Таким образом, при добавлении АЛК к суспензии ЛПК в них активируется синтез гемма и наблюдается накопление безметалльных порфиринов.

Установлено, что по сравнению с контрольными образцами (ЛПК здоровых доноров) лимфоциты больных РС в первые 4 часа инкубации с АЛК накапливают меньше порфириновых пигментов. Суммарное количество экстрагируемых из лимфоцитов порфириновых пигментов снижено в 1,2 раза, уровни ПП и КП в 1,3 раза. В тоже время образование УП в ЛПК больных РС не изменяется (рисунок 1).



Примечание: * — различие статистически значимо в сравнении с группой доноров.

Рисунок 1. Содержание порфиринов в суспензиях лимфоцитов периферической крови, инкубированных 4 часа в присутствии аминолевулиновой кислоты доноров (n = 10), пациентов с РС контрольной группы (n = 20)

Как следует из рисунка 1, суммарное количество экстрагируемых из лимфоцитов порфириновых пигментов у пациентов, получавших лейскадин, статистически значимо выше, чем у пациентов с РС контрольной группы. Далее была проведена экстракция порфиринов из ЛПК у пациентов с РС, после инкубации клеток в течение 18 часов с АЛК.

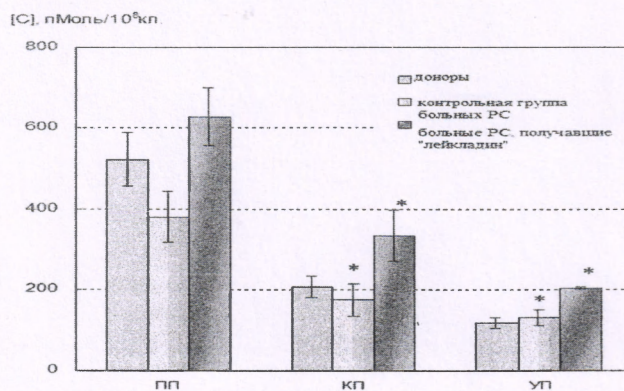


Рисунок 2. Содержание порфиринов в суспензиях лимфоцитов периферической крови, инкубированных 18 часов в присутствии аминолевулиновой кислоты у доноров (n = 10), пациентов с РС контрольной группы (n = 20)

На рисунке 2 видно, что содержание ПП в солянокислых экстрактах из ЛПК достоверно не отличается от уровня у доноров. В тоже время накопление КП имеет тенденцию к увеличению в 1,3 раза, УП достоверно возрастает в 1,5 раза.

При РС наблюдалось изменение активности ряда ферментов: происходило ингибирование ферментов, ответственных за синтез протопорфириногена III и ПП, в частности протопорфиринооксидазы. У пациентов с РС наблюдалось не только изменение содержания пигментов, но и отношения количества отдельных порфиринов. Так, отношение между уровнем ПП и КП, ПП и УП при РС уменьшалось в 1,5 раза по сравнению с группой сравнения.

Обсуждение и выводы. Важным звеном в оценке состояния биохимических показателей является исследование метаболизма порфиринов при РС. Порфирины — промежуточные или побочные продукты биосинтеза важнейших биологических субстратов. Спектр выполняемых ими в животных клетках функций чрезвычайно широк. Комплексы порфиринов с ионами железа образуют ключевое биологическое соединение — гем. Изменения в синтезе порфиринов и гема могут приводить к их недостаточности и дефициту гемсодержащих соединений (гемоглобин, миоглобин, каталаза, пероксидаза, цитохромы и др.). Многие авторы рассматривают порфирины как высокоактивные соединения, оказывающие действие на ЦНС, железы внутренней секреции и все виды обменных процессов. Эти циклические соединения образованы четырьмя пиррольными кольцами, связанными между собой метильными мостиками [6]. Различные биологически активные порфирины содержат кроме порфиринового кольца атом металла, который замещает два атома водорода, соединенных с атомами азота. Наиболее важные металлопорфириновые комплексы содержат железо или магний. Железопорфириновый комплекс составляет активную часть различных гемопротеидов (гемоглобин, цитохромы).

В организме животных и человека естественными метаболитами являются: уропорфирины I и III (УП), копропорфирины I и III (КП), протопорфин IX (ПП) и в небольших количествах дейтеропорфин IX и мезопорфин IX [3]. Порфиринообразование происходит в различных тканях, однако в норме скорость процесса такова, что содержание отдельных пигментов в клетках весьма низко (10^{-9} – 10^{-7} моль/л). Скорость синтеза порфириновых пигментов зависит от типа клеток и наиболее интенсивна в эритроблестах костного мозга, клетках печени, значительно слабее в клетках остальных органов. Причем, превращение порфириногенов происходит с такой скоростью, что свободные уропорфин, копропорфин и протопорфин накапливаются в клетках лишь в незначительных количествах.

Увеличение количества порфиринов может наблюдаться при добавлении к клеткам *in vitro* или введении в организм экзогенной АЛК. Важно отметить, что клетки с повышенной пролиферативной активностью, Т-лимфоциты при РС, опухолевые, злокачественно и вирус трансформированные проявляют более высокую способность к АЛК-индуцируемому синтезу порфиринов по сравнению с другими клетками [4].

Выводы.

1. Безметалльные и ряд металлосодержащих порфиринов обладают интенсивной флуоресценцией, поэтому использование высокочувствительных спектрально-люминесцентных методов позволяет проводить качественную и количественную оценку содержания различных видов порфиринов. В суспензиях лимфоцитов периферической крови здоровых доноров наблюдается флуоресценция в красной области спектра при возбуждении при 390–410 нм, которую по структуре спектра (наличию максимумов при 630 нм и 690 нм) можно отнести к флуоресценции безметалльных порфиринов.

2. Установлено, что ЛПК способны к индуцируемому АЛК синтезу эндогенных порфиринов. Преимущественно образуется ПП, его количество после 4 часов инкубации ЛПК здоровых людей с АЛК в 3,9 раза превышает уровень КП и в 6,6 раза — УП.

3. Выявлено нарушение метаболизма эндогенных порфиринов в ЛПК больных РС, проявляющееся в дисбалансе содержания отдельных видов порфириновых пигментов в условиях избыточного накопления в присутствии экзогенной АЛК. В ЛПК больных РС за 4 часа АЛК-индуцируемого синтеза образование ПП снижено более, чем в 1,3 раза, через 18 часов — 1,4 раза.

4. Приведенные данные свидетельствуют о модификации метаболизма эндогенных порфиринов в ЛПК больных РС. Изучение АЛК-индуцируемого накопления порфиринов, отдельных их типов, активности ключевых ферментов синтеза гема может существенно дополнить комплекс тестов, характеризующих состояния ЛПК у пациентов с РС и в совокупности с традиционными методами анализа дать дополнительную информацию о функциональном статусе иммунокомпетентных клеток

5. Параметры порфириновой флуоресценции ЛПК могут быть использованы как один из критериев клинических проявлений РС.

FEATURES OF METABOLISM OF ENDOGENOUS PORPHYRINS IN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES OF DONORS AND PATIENTS WITH MULTIPLE SCLEROSIS

A.G. Baida, A.S. Fedulau, E.S. Lobanok

The most of studies holdings on lymphoid cells in patients with SD, devoted to revealing immunological reactions, while their immune status has not been studied. Ability of human peripheral blood lymphocytes to the induced accumulation of porphyrin pigments allows to hold a study of metabolism of level of porphyrin pigments at pathology, related to changes in the functional activity of cells of the immune system, that observed in SD.

Study was performed on the donors peripheral blood lymphocytes (10 people) and in patients with SD (20 people). Content of certain types of porphyrin pigments was determined by the intensity of fluorescence hydrochloric acid extracts the calibration line. Revealed an infringement of metabolism of endogenous porphyrins in peripheral blood lymphocytes in patients with SD, manifests imbalance in the content of certain types of porphyrin pigments in excess accumulation in the presence of exogenous aminolevulinic acid. In peripheral blood lymphocytes in patients with SD for 4 hours aminolevulinic acid inducible synthesis of protoporphyrin reduced more than 1,3 times, 18 hours later — 1,4 times.

Studying the aminolevulinic acid inducible accumulation of porphyrins, their individual types, activity of key enzymes of the heme synthesis can significantly complements a suite of tests, characterize the state of peripheral blood lymphocytes in patients with SD and in combination with traditional methods of analysis provide additional information on the functional status of immune cells. Porphyrin fluorescence parameters of peripheral blood lymphocytes can be used one of the criteria of clinical manifestations of SD.

Литература:

1. Завалишин, И.А. Современные представления о патогенезе и лечении рассеянного склероза / И.А. Завалишин, Т.Д. Жученко // Мед. помощь. — 2000. — № 3. — С. 30–34.
2. Завалишин, И.А. Патогенез и лечение рассеянного склероза (состояние проблемы на 2000 г.) / И.А. Завалишин, Т.Д. Жученко, А.В. Пересадова // Вестн. Рос. АМН. — 2001. — № 7. — С. 18–22.
3. Лобанок, Е.С. Индуцируемое 5-аминолевулиновой кислотой накопление порфиринов в ткани и клетках щитовидной железы здоровых и патологически измененных участках органа / Е.С. Лобанок, А.В. Воробей, В.Я. Ребеко // Бюлл. эксперим. биол. и мед. — 1999. — Т. 128, № 8. — С. 222–225.
4. Лобанок, Е.С. Эндогенные порфирины в животных клетках: механизмы образования и фотодинамическая активность / Е.С. Лобанок // Биофизика живых систем: от молекулы к организму; под ред. И.Д. Волоотовского. — Минск: Наука, 2002. — С. 161–173.
5. Лобанок, Е.С. Индуцируемый 5-аминолевулиновой кислотой синтез порфириновых пигментов в лимфоцитах больных системными заболеваниями соединительной ткани / Е.С. Лобанок, Е.С. Каляя, В.В. Лаврещук // Весці НАН. Беларусі. — 2006. — № 4. — С. 63–66.
6. Марри, Р. Порфирины и желчные пигменты / Р. Марри, Д. Греннер, В. Родуэлл // Биохимия человека : в 2-х т. / Р. Марри [и др.] ; под ред. Л.И. Гиномана ; пер. с англ. — М. : Мир, 1993. — Т. 1, гл. 33. — С. 356–372.
7. Rimington. C. Haem biosynthesis and porphyrias: 50 year in retrospect / C. Rimington // J. Clin. Chem. Clin. Biochem. — 1989. — Vol. 27, № 8. — P. 473–486.
8. Weinshenker, B.G. Major histocompatibility complex class II alleles the course and outcome of MS: a population-based study / B.G. Weinshenker, P.Santrach // Neurology. — 1998. — Vol. 51, № 3. — P. 742–747.