

Bereznyakova A. I., Cheremisina V. F., Mrozkowiak M., Zukow W. Enzymatic homeostasis in peripheral blood lymphocytes in rats with dermatitis = Энзиматический гомеостаз в лимфоцитах периферической крови у крыс при дерматитах. *Journal of Education, Health and Sport*. 2015;5(11):203-216. ISSN 2391-8306. DOI <http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.33850>  
<http://ojs.ukw.edu.pl/index.php/johs/article/view/2015%3B5%2811%29%3A203-216>  
<https://pbn.nauka.gov.pl/works/669303>  
Formerly *Journal of Health Sciences*. ISSN 1429-9623 / 2300-665X. Archives 2011–2014  
<http://journal.rsw.edu.pl/index.php/JHS/issue/archive>

Deklaracja.  
Specyfika i zawartość merytoryczna czasopisma nie ulega zmianie.  
Zgodnie z informacją MNIŚW z dnia 2 czerwca 2014 r., że w roku 2014 nie będzie przeprowadzana ocena czasopism naukowych; czasopismo o zmienionym tytule otrzymuje tyle samo punktów co na wykazie czasopism naukowych z dnia 31 grudnia 2014 r.  
The journal has had 5 points in Ministry of Science and Higher Education of Poland parametric evaluation. Part B item 1089. (31.12.2014).  
© The Author (s) 2015;  
This article is published with open access at Licensee Open Journal Systems of Kazimierz Wielki University in Bydgoszcz, Poland and Radom University in Radom, Poland  
Open Access. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Noncommercial License which permits any noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and source are credited. This is an open access article licensed under the terms of the Creative Commons Attribution Non Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted, non commercial use, distribution and reproduction in any medium, provided the work is properly cited.  
This is an open access article licensed under the terms of the Creative Commons Attribution Non Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted, non commercial use, distribution and reproduction in any medium, provided the work is properly cited.  
The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.  
Received: 25.09.2015. Revised 25.10.2015. Accepted: 10.11.2015.

UDC 616.37-002-036.11

УДК 616.37-002-036.11

## Enzymatic homeostasis in peripheral blood lymphocytes in rats with dermatitis

## Энзиматический гомеостаз в лимфоцитах периферической крови у крыс при дерматитах

A. I. Bereznyakova<sup>1</sup>, V. F. Cheremisina<sup>1</sup>, M. Mrozkowiak<sup>2</sup>, W. Zukow<sup>2</sup>  
A. I. Bereznyakova<sup>1</sup>, V. F. Cheremisina<sup>1</sup>, M. Mrozkowiak<sup>2</sup>, W. Zukow<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Национальный фармацевтический университет, г. Харьков

<sup>1</sup>National University of Pharmacy, Kharkiv

<sup>2</sup>Uniwersytet Kazimierza Wielkiego, Bydgoszcz

<sup>2</sup>Kazimierz Wielki University, Bydgoszcz

### Реферат

В работе изучены нарушения энзиматического гомеостаза сапонин-перфорированных лимфоцитов периферической крови у крыс с дерматитами различной этиологии. Показано, что стимуляция лимфоцитов антигенами запускает каскад энергетически зависимых процессов, которые ведут к перераспределению макроэргов в клетке; это связано с достоверным снижением оубаинчувствительной  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-азной и  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-азной активности, уменьшением пула АТФ в лимфоцитах. Доказано, что при дерматитах различной этиологии, особенно аллергической природы, нарушаются регуляторные механизмы в лимфоцитах за счет перегрузки клеток  $\text{Na}^+$  и  $\text{Ca}^{2+}$ , что приводит к энергодефициту лимфоцитов и нарушению их функциональной активности.

**Ключевые слова:** энзиматический гомеостаз, лимфоциты, периферическая кровь, сапонин, РМСА –  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-аза плазматической мембраны, SERCA –  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-аза саркоплазматического ретикулула.

### Summary

We studied enzymatic disorders of homeostasis saponin-perforated peripheral blood lymphocytes in rats with dermatitis of various etiologies. It has been shown that the

stimulation of lymphocyte antigens triggers a cascade of energy-dependent processes, which lead to a redistribution of macroergs in a cage; is associated with a significant decrease in ouabainsensitive  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATP-ase and  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATP-ase activity, a decrease in the pool of ATP in lymphocytes. It is proved that the dermatitis of various etiologies, especially allergic nature violated regulatory mechanisms in lymphocytes due to overload  $\text{Na}^+$  и  $\text{Ca}^{2+}$ , leading to disruption of the energy deficit lymphocytes and their functional activity.

**Tags: enzymatic homeostasis, cells, peripheral blood, saponin, RMSA -  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase of plasmic membrane, SERCA -  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase of sarcoplasmic reticulum.**

## Реферат

ЕНЗИМАТИЧНИЙ ГОМЕОСТАЗ В ЛІМФОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ У ЩУРІВ ПРИ ДЕРМАТИТАХ. В роботі вивчено порушення ензиматичного гомеостазу сапонін-перфорованих лімфоцитів периферичної крові у щурів з дерматитами різної етіології. Показано, що стимуляція лімфоцитів антигенами запускає каскад енергетично залежних процесів, які ведуть до перерозподілу макроергів у клітині; це пов'язано з достовірним зниженням оубаїнчутливої  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-азної та  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-азної активності, зменшенням пулу АТФ в лімфоцитах. Доведено, що при дерматитах різної етіології, особливо алергічної природи, порушуються регуляторні механізми в лімфоцитах за рахунок перевантаження клітин  $\text{Na}^+$  і  $\text{Ca}^{2+}$ , що призводить до енергодефіциту лімфоцитів і порушення їх функціональної активності.

**Ключові слова: ензиматичний гомеостаз, лімфоцити, периферична кров, сапонін, РМСА –  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-аза плазматичної мембрани, SERCA –  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-аза саркоплазматичного ретикулула.**

**Introduction.** In recent decades, in domestic and foreign scientific literature the focus is on learning immunological disorders in the pathogenesis of allergic diseases. However, at the same time, is constantly searching for integrated biochemical parameters that reflect changes in the functional state of the organism. In this regard, attention is drawn to peripheral blood lymphocytes, which are key cells of the immune system and play a leading role in the compensatory-adaptive reactions of the organism. Lymphocytes are a heterogeneous population of cells, and are central to the specific immunological reactions [1]. Research enzymatic spectrum of lymphocytes are widely used in the study of autoimmunity, immunodeficiency, lymphoproliferative and other diseases. However, the outstanding are changes in ion and energy homeostasis in lymphocytes in conditions of development of allergic diseases and, particularly, in the skin [2].

**The purpose of the study** is to examine the enzymatic homeostasis in peripheral blood lymphocytes in rats with dermatitis of various etiologies.

**Materials and Methods.** Experiments carried out on non-linear 30 male rats weighing 180.0 - 200.0 g, were divided into 3 groups: Group I - intact animals; Group II - rats with contact dermatitis; Group III - rats with atopic dermatitis.

To model of contact dermatitis (CD) [3] to animals on depillar portion of dorsal skin of size 3·x 3 cm<sup>2</sup> for 10 days, was applied five drops of turpentine, which is then carefully rubbed into the skin using glass rod. On the 10th day of the experiment the animals skin conditions were scored on the degree of development of dermatitis: 0 points - visible damage was observed; 1 point - poorly marked hyperemia with finely scaly desquamation; 2 points - moderately severe redness, peeling, petechial hemorrhages; 3 points - severe redness, skin ulcers; 4 points - a sharp erythema with signs of hemorrhage, severe infiltration ulcers.

Atopic dermatitis (AD) caused in rats sensitized by the method Zalkan PM and Ievleva EA [4] 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB). 3 drops of 5% DNCB solution in the form of application once loaded in place sensitization (back surface) with the additional application to the other skin areas 7 1 drop of 1% solution. On day 8 develops an inflammatory reaction to total necrosis of the epidermis and the formation of large subepidermal blistering. On the severity of atopic dermatitis was assessed by the general condition and behavior of animals [5], was evaluated by the same score as contact dermatitis.

Multi peripheral blood lymphocytes were isolated from heparinized blood of freshly prepared from the tail vein density gradient fikoltriumbrast ( $r = 1,08 \text{ g /cm}^2$ ) [6]. Integrity and viability of lymphocytes, which in all tests was at least 95%, assessed by trypan blue staining [7]. For permeabilization of the membranes of peripheral blood lymphocytes and disclosure latent ATP-ase activity towards lymphocyte suspension Saponin was added at a concentration of 0.1-0.2%. [8]

ATP hydrolase reaction is initiated by introduction into incubation medium aliquots lymphocytic mixture: the amount of protein in the sample is not greater than 50 - 100 mcg / ml. The protein content was determined lymphocytic mixture by the Lowry method [9]. Duration of incubation - 5 min. The reaction was stopped by adding 1 ml of stop solution with the following composition: 1.5 M sodium acetate, 3.7% formaldehyde, 14% ethanol, 5% TCA.

In experiments on the control outenzymatic ATP hydrolysis was the standard incubation medium that did not contain the test sample . The quantity ouabainsensitive  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATP-ase activity was calculated from the difference between the value of the total ATPase activity and the basal  $\text{Mg}^{2+}$  activity the presence of ouabain (1 mmol). The specific activity of

$\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATP-ase lymphocytes was assessed as the difference between the activity of the ATP-ase  $\text{Ca}^{2+}$  containing and without  $\text{Ca}^{2+}$  environments. For the separation of the summarized  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATP-ase activity components: thapsigargin insensitive ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase of plasmatic membrane - PMSA) and thapsigargin sensitive ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase the membrane of the endoplasmic reticulum - SERCA) to a standard  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$ -containing the incubation environment added selective inhibitor of  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase of the endoplasmic reticulum (ER) - thapsigargin (0.1 mmol).

Statistical analysis was performed using the software package Statistica for Windows 6.0 using the Student t-test and correlation analysis [10]. Results were considered significant at  $p < 0,05$ .

**Results and discussion.** The ion homeostasis is an important indicator of the functional activity of peripheral blood lymphocytes and determined by the content of constant intracellular concentration of  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$  and  $\text{H}^+$ . Precenzion control of intracellular pH, the value of which affect the ability of cells to function normally, and ion homeostasis is provided by superposition of all transport systems lymphocytes. Among them the leading role in the removal  $\text{Na}^+$  and of  $\text{Ca}^{2+}$  from the cytoplasm of lymphocytes belong to  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATP-ase and  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase.

$\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase - marker plasma membrane enzyme, is  $\text{Ca}^{2+}$  independent,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -active,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATP dependent conveyor system, which carries the active transmembrane transport  $\text{K}^+$  and  $\text{Na}^+$  and selectively inhibited by ouabain.  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase carries conjugate hydrolysis of ATP to the translocation  $\text{Ca}^{2+}$  ions through the cell membrane of the outside of the tank or the endoplasmic reticulum [2, 11, 12].

In rats, CD and AD ouabainsensitive  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase activity of peripheral blood lymphocytes was significantly different from its value in intact animals to  $56,3 \pm 3,9\%$  and  $60,1 \pm 4,0\%$  ( $p < 0,05$ ) (Figure 1).

The activity of  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase of plasma membrane of peripheral blood lymphocytes from rats CD and AD was significantly reduced to  $56,3 \pm 2,8\%$  and  $66,9 \pm 4,2\%$  ( $p < 0,05$ ) respectively, compared to its value from the control group (Figure 1). A similar pattern is set for thapsigargin sensitive components  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase. It was also found a significant decrease in the activity of  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase membrane of the endoplasmic reticulum of peripheral blood lymphocytes of rats with CD and AD. Its activity is significantly different from the animals with the CD to  $65,6 \pm 4,5\%$ , and the rats with AD to  $86,3 \pm 7,5\%$  ( $p < 0,05$ ) compared with the intact group of animals (Figure 2).

Reduction of the enzyme activity  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase and  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase plasma membrane and endoplasmic reticulum of peripheral blood lymphocytes was more pronounced in rats with AD in rats than with the CD.

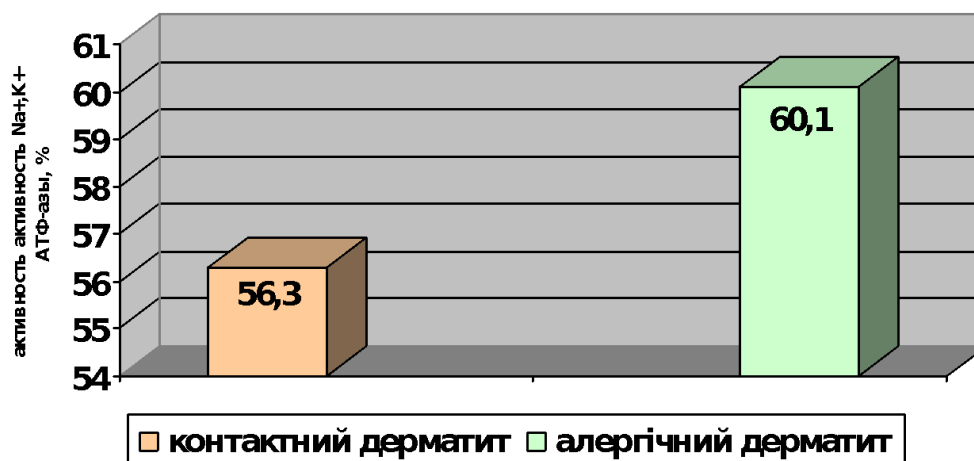


Fig. 1. Changes  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATP-ase activity lymphocytes peripheral blood of rats with CD and AD compared to intact animals, %

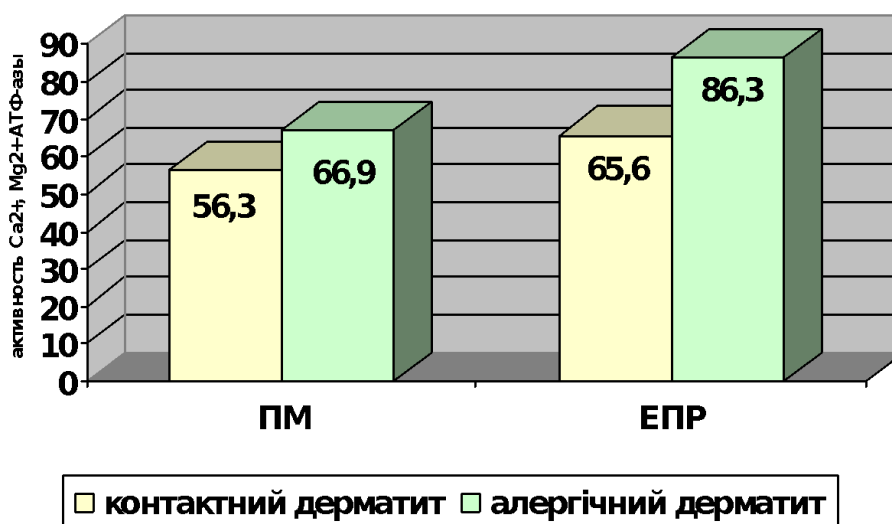


Fig. 2. Changes in  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATP-ase activity of the plasma membrane (PM) and the membrane of the endoplasmic reticulum (ER) of rat peripheral blood lymphocytes from a CD and AD compared to intact animals, %

The However, in patients with both groups of rats reduction PMSA enzyme activity

(Ca<sup>2+</sup>-ATPase plasma membrane) than for SERCA (Ca<sup>2+</sup>-ATPase of sarcoplasmic reticulum). Suppression activity Na<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup>-ATPase and Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-ATPase shows the growth of the concentration Na<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> in the cytosol of lymphocytes, particularly inhibition of the enzymatic activity of Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-ATPase PM and increase Ca<sup>2+</sup> in blood lymphocytes of rats with simulated AD [12].

It is known that the state of the intracellular ion homeostasis is closely linked to energy metabolism of almost all biochemical, biophysical and physiological processes. We have found a close relationship between the functional activity of lymphocytes and their energy metabolism. It proved that with the recognition of effector target cells occurs local release of ATP in the extracellular space formed in the contact zone cells. Reduced intracellular macroergs lymphocytes offset due to the activation of metabolic processes. However, the exhaustion of the substrate pool is inhibited energy processes in lymphocytes, leading to the development of immunopathological processes.

The results obtained are confirmed by other investigators [2, 13], and suggest the possibility that the development of an immune response probability of disruption of energy homeostasis immuno competent cells increases, which leads to violations of the functional activity of lymphocytes with dermatitis of various etiologies, especially of allergic origin.

### **Conclusions**

1. Stimulation of lymphocyte antigens leads to impaired functional activity of lymphocytes.

2. Suppression activity of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase and Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-ATPase shows the growth of the concentration Na<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> in the cytosol of lymphocytes, which can reduce energy processes in the development of lymphocytes and immunopathogenetic processes.

### **References**

1. The local and systemic immune response in patients with severe atopic dermatitis / DD Niyazov, T. M. Filimonov, Slisyutina O. et al. // Russian journal Allergy. - 2011. - № 5. - S. 24-29.

2. Augustine NH Comparison of ATP production in whole blood and lymphocyte proliferation in response to phytohemagglutinin / NH Augustine, BM Pasi, HR Hill // J. Clin. Lsb.Anal. - 2007. - Vol. 21, № 5. - P. 265-270.

3. Study of anti-inflammatory activity of ointment with amikacin turpentine dermatitis model in rats / SM Drogovoz AV Dorovsky, J. A. Butko, and others. // Medicine. - 2006. - № 3-4. - S. 43-46.

4. Zalkan P. Influence of detergents on the reactivity of the skin of sea vinok / PM

Zalkan, EA Ievleva // Actual issues of professional dermatology. - M., 1965. - S. 106-112.2.

5. Dzikavitski IG Contact dermatitis: clinical and therapy / IG Dzikavitski, IM Korsun // Svoremennye problems dermatology, immunology and medical cosmetology. - 2012. - № 4. - pp 49-51.

6. Boyum A. isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood / A. Boyum // Scand. J. Clin. Lab. Invest. - 1968. - Vol. 21 (97). - P. 77-79.

7. Muller LR Nitroblue tetrazolium reduction in monocytes and monocytes derivated macrophages / LR Muller, A. Rollag, SS Froland // Immun. Today. - 1989. - Vol. 97. - P. 490-496.

8. Cocco R. Patch test in the diagnosis of food allergy / R. Cocco, D. Sole // Allergol. Immunopathol. - 2009. - Vol. 37, № 4. - P. 205-207.

9. Protein measurement with the Folin phenolreagent / OH Lowry, NJ Rosebrough, AL Farr et al // J. Biol. Chem. - 1951. - Vol. 193. - P. 265-275.

10. The junkers VI Mathematical and statistical processing of medical research / VI Juncker ST Grigoriev. - SPb. : MMA, 2005. - 292 p.

11. Savchenko AA Contents of ATP and activity of NAD [P] -dependent dehydrogenase in lymphocytes during immune deficiency-related diseases in the alien inhabitants Evenki / AA Savchenko, Smirnov, A. Borisov // Bulletin SB ramps. - 2010. - V. 30, № 3. - S. 33-38.

12. Low frequency and low intensity pulsed electromagnetic field exerts its anti-inflammatory effect through restoration of plasma membrane calcium ATPase activity / R. Selvan, K. Ganesan, R. Narayana Raju et al // Life Sci. - 2007. - Vol. 80, № 26. - P. 2403-2410.

13. Immunodiagnosics: evaluation of functional T-cell immunocompetence in whole blood independent of circulating cell numbers / RJ Kowalski, A. Zeevi, R. Mannon et al // J. Immunotoxicol. - 2007. - Vol. 4, № 3. - P. 225-232.

**Вступление.** В течение последних десятилетий в отечественной и зарубежной научной литературе акцент делается на изучение иммунологических нарушений в патогенезе аллергических заболеваний. Вместе с тем, одновременно, постоянно идет

поиск интегральных биохимических показателей, которые отражали бы изменения функционального состояния организма. В этом плане наибольшее внимание привлекают лимфоциты периферической крови, которые являются ключевыми клетками иммунной системы и играют ведущую роль в обеспечении компенсаторно-приспособительных реакций организма. Лимфоциты представляют собой гетерогенную популяцию клеток и являются центральным звеном в специфических иммунологических реакциях [1]. Исследования энзиматического спектра лимфоцитов широко используются при изучении аутоиммунных, иммунодефицитных, лимфопролиферативных и других заболеваний. Однако, невыясненными остаются изменения ионного и энергетического гомеостаза в лимфоцитах в условиях развития аллергической патологии, и, конкретно, в коже [2].

**Цель исследования** заключается в изучении энзиматического гомеостаза в лимфоцитах периферической крови у крыс с дерматитами различной этиологии.

**Материалы и методы.** Эксперименты проведены на 30 нелинейных крысах-самцах, массой 180,0 – 200,0 г, которые были разделены на 3 группы: I группа – интактные животные; II группа – крысы с контактным дерматитом; III группа – крысы с аллергическим дерматитом.

Для моделирования контактного дерматита (КД) [3] животным на депилированный участок кожи спины размером 3×3 см<sup>2</sup> ежедневно в течение 10 дней, наносили по пять капель скипидара, который затем тщательно втирали в кожу с помощью стеклянной палочки. На 10-й день эксперимента у животных состояние кожного покрова оценивали в баллах, по степени развития дерматита: 0 баллов – видимых повреждений не наблюдали; 1 балл – слабо выраженная гиперемия с мелкочешуйчатым шелушением; 2 балла – умеренно выраженная гиперемия, шелушение, точечные кровоизлияния; 3 балла – выраженная гиперемия, язвы кожи; 4 балла – резкая эритема с явлениями геморрагий, выраженной инфильтрацией, язвами.

Аллергический дерматит (АД) вызывали у крыс, сенсibilизированных по методу Залкан П.М. и Иевлевой Е.А. [4] 2,4-динитрохлорбензолом (ДНХБ). 3 капли 5 % раствора ДНХБ однократно в виде аппликации наносили на место сенсibilизации (поверхность спины) с дополнительным нанесением на 7 других участков кожи по 1 капле 1 % раствора. На 8 сутки развивалась воспалительная реакция с тотальным некрозом эпидермиса и образованием больших субэпидермальных пузырей. О тяжести аллергического дерматита судили по общему состоянию и поведению животных [5], оценивали по тем же баллам, что и контактный дерматит.



Многоядерные лимфоциты периферической крови выделяли из гепаринизированной свежеполученной крови из хвостовой вены в градиенте плотности фикольтриумбраса ( $\rho=1,08 \text{ г/см}^3$ ) [6]. Целостность и жизнеспособность лимфоцитов, которая во всех опытах составляла не менее 95 %, оценивали по окраске трипановым синим [7]. Для пермеабиллизации мембран лимфоцитов периферической крови и раскрытию латентных АТФ-азных активностей к суспензии лимфоцитов добавляли сапонин в концентрации 0,1-0,2 % [8].

АТФ-гидролазную реакцию инициировали внесением в инкубационную среду аликвоты лимфоцитарной смеси: количество белка в пробе не превышало 50 – 100 мкг/мл. Содержание белка в лимфоцитарной смеси определяли по методу Лоури [9]. Продолжительность инкубации – 5 мин. Реакцию останавливали добавлением 1 мл охлажденного стоп-раствора следующего состава: 1,5 М натрий ацетат, 3,7 % формальдегид, 14 % этанол, 5 % ТХУ.

В опытах контролем на позаэнзиматический гидролиз АТФ была стандартная среда инкубации, которая не содержала исследуемой пробы. Величину оубаинчувствительной  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-азной активности вычисляли по разнице между величиной общей АТФ-азной активности и базальной  $\text{Mg}^{2+}$  активности в присутствии оубаина (1 ммоль). Удельную активность  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-аз лимфоцитов оценивали как разницу между активностью АТФ-азных систем в  $\text{Ca}^{2+}$ -вмещающей и безкальциевой средах. Для разделения суммарной  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-азной активности на составляющие: тапсигаргиннечувствительную ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-аза плазматической мембраны – РМСА) и тапсигаргинчувствительную ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-аза мембран эндоплазматического ретикулума - SERCA) к стандартному  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$ -вмещающей среды инкубации добавляли селективный ингибитор  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-азы эндоплазматического ретикулума (ЭПР) – тапсигаргин (0,1 ммоль).

Статистическую обработку данных осуществляли с помощью пакета программ Statistica for Windows 6.0 с использованием t-критерия Стьюдента и корреляционного анализа [10]. Результаты считали достоверными при  $p < 0,05$ .

**Результаты и их обсуждения.** Ионный гомеостаз является важным показателем функциональной активности лимфоцитов периферической крови и определяется содержанием постоянной внутриклеточной концентрации ионов  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$  и  $\text{H}^+$ . Прецензионный контроль внутриклеточного рН, величина которого влияет на способность клеток нормально функционировать, и ионного гомеостаза обеспечивается суперпозицией всех транспортировочных систем лимфоцитов. Среди них ведущая роль

в выведении ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{Ca}^{2+}$  из цитоплазмы лимфоцитов принадлежит  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-азе и  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-азе.

$\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-аза – маркерный фермент плазматической мембраны, является  $\text{Ca}^{2+}$ -независимой,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -активной,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-зависимой транспортно-проводящей системой, которая осуществляет активный трансмембранный перенос ионов  $\text{K}^+$  и  $\text{Na}^+$  и селективно ингибируется оубаином.  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-аза осуществляет сопряженный гидролиз АТФ с транслокацией ионов  $\text{Ca}^{2+}$  через мембрану из клетки наружу или в цистерны эндоплазматического ретикула [2, 11, 12].

У крыс на КД и АД оубаинчувствительная  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-азная активность лимфоцитов периферической крови достоверно отличалась от ее величины у интактных животных на  $56,3 \pm 3,9$  % и  $60,1 \pm 4,0$  % ( $p < 0,05$ ) (рис.1).

Активность  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-азы плазматической мембраны лимфоцитов периферической крови крыс у КД и АД достоверно снижалась на  $56,3 \pm 2,8$  % и  $66,9 \pm 4,2$  % ( $p < 0,05$ ) соответственно по сравнению с ее величиной у группы контроля (рис.1). Подобную закономерность установлено и для тапсигаргинчувствительных компонентов  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-азы. Установлено также достоверное снижение активности  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-азы мембран эндоплазматического ретикула лимфоцитов периферической крови крыс с КД и АД. Ее активность достоверно отличалась у животных с КД на  $65,6 \pm 4,5$  %, а у крыс с АД – на  $86,3 \pm 7,5$  % ( $p < 0,05$ ) по сравнению с интактной группой животных (рис. 2).

Снижение ферментативной активности  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-азы и  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-азы плазматической мембраны и эндоплазматического ретикула лимфоцитов периферической крови имел более выраженный характер у крыс с АД, чем у крыс с КД.

В то же время, у больных крыс обеих исследуемых групп снижение

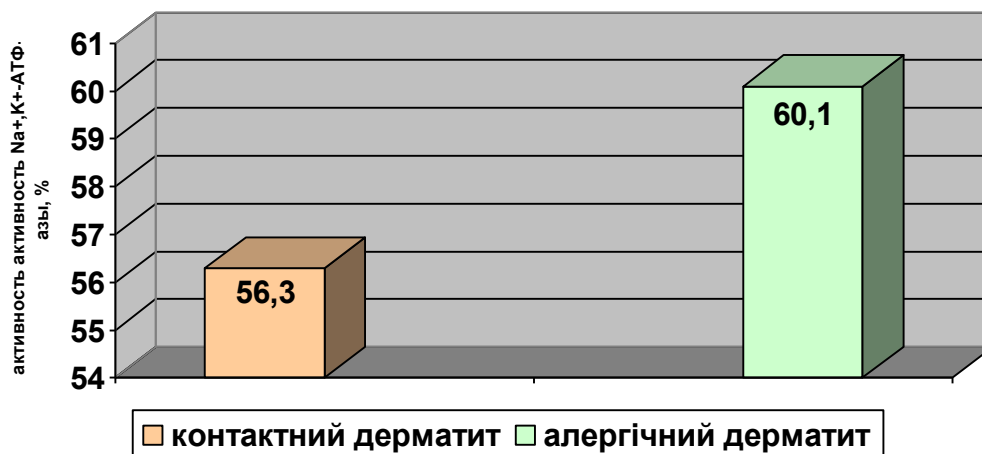


Рис. 1. Изменения Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФ-азной активности лимфоцитов периферической крови крыс с КД и АД по сравнению с интактными животными, %

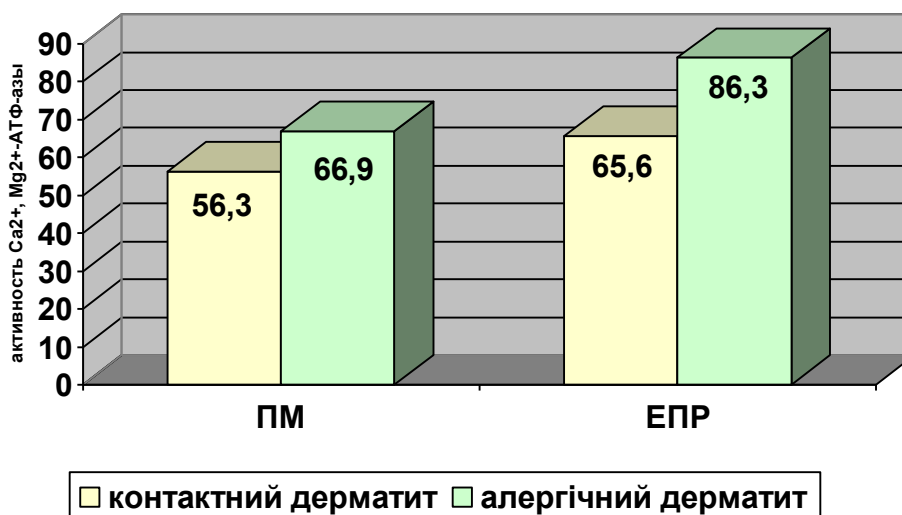


Рис. 2. Изменения Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-АТФ-азной активности плазматической мембраны (ПМ) и мембраны эндоплазматического ретикулума (ЭПР) лимфоцитов периферической крови крыс с КД и АД, по сравнению с интактными животными, %

энзиматической активности РМСА (Ca<sup>2+</sup>-АТФ-аза плазматической мембраны), чем в случае SERCA (Ca<sup>2+</sup>-АТФ-аза саркоплазматического ретикулума). Подавление активности Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФ-азы и Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-АТФ-азы свидетельствует о росте концентрации ионов Na<sup>+</sup> и Ca<sup>2+</sup> в цитозоле лимфоцитов, в частности, ингибирование энзиматической активности Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-АТФ-азы ПМ и рост Ca<sup>2+</sup> в лимфоцитах крови крыс с моделируемым АД [12].

Известно, что состояние внутриклеточного ионного гомеостаза тесно связано с

энергетическим обменом практически всех биохимических, биофизических и физиологических процессов. Нами установлена тесная взаимосвязь между функциональной активностью лимфоцитов и их энергетическим обменом. Доказано, что при распознавании эффектором клетки-мишени происходит локальный выброс АТФ в межклеточное пространство, образованное в зоне контакта клеток. Снижение внутриклеточной концентрации макроэргов в лимфоцитах компенсируется вследствие активации метаболических процессов. Однако, при исчерпании субстратного пула происходит ингибирование энергетических процессов в лимфоцитах, что ведет к развитию иммунопатологических процессов.

Результаты, полученные нами, подтверждаются и другими исследователями [2, 13] и дают возможность предположить, что при развитии иммунного ответа вероятность срыва энергетического гомеостаза иммунокомпетентных клеток возрастает, что ведет к нарушениям функциональной активности лимфоцитов при дерматитах различной этиологии, особенно аллергического генеза.

### **Выводы**

1. Стимуляция лимфоцитов антигенами приводит к нарушениям функциональной активности лимфоцитов.

2. Подавление активности  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-азы и  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-азы свидетельствует о росте концентрации ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозоле лимфоцитов, что может привести к снижению энергетических процессов в лимфоцитах и развитию иммунопатогенетических процессов.

### **Список литературы**

1. Локальный и системный иммунный ответ в больных тяжелыми атопическими дерматитами / Д. Д. Ниязов, Т. М. Филимонова, О. Слисютин и др. // Российский аллергологический журнал. – 2011. – № 5. – С. 24–29.

2. Augustine N. H. Comparison of ATP production in whole blood and lymphocyte proliferation in response to phytohemagglutinin / N. H. Augustine, B. M. Pasi, H. R. Hill // J. Clin. Lab. Anal. – 2007. – Vol. 21, № 5. – P. 265–270.

3. Изучение противовоспалительной активности мази с амикацином на модели скипидарного дерматита у крыс / С. М. Дроговоз, А. В. Доровский, Я. А. Бутко и др. // Лекарства. – 2006. – № 3–4. – С. 43–46.

4. Залкан П. М. Влияние синтетических моющих средств на реактивность кожи морских свинок / П. М. Залкан, Е. А. Иевлева // Актуальные вопросы профессиональной дерматологии. – М., 1965. – С. 106–112.

5. Диковицкая И. Г. Контактный дерматит : клиника и терапия / И. Г. Диковицкая, И. М. Корсунская // Современные проблемы дерматовенерологии, иммунологии и врачебной косметологии. – 2012. – № 4. – С. 49–51.
6. Boyum A. isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood / A. Boyum // Scand. J. Clin. Lab. Invest. – 1968. – Vol. 21 (97). – P. 77–79.
7. Muller L. R. Nitroblue tetrazolium reduction in monocytes and monocytes derivated macrophages / L. R. Muller, A. Rollag, S. S. Froland // Immun. Today. – 1989. – Vol. 97. – P. 490–496.
8. Cocco R. Patch test in the diagnosis of food allergy / R. Cocco, D. Sole // Allergol. Immunopathol. – 2009. – Vol. 37, № 4. – P. 205–207.
9. Protein measurement with the Folin phenolreagent / O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr et al // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol. 193. – P. 265–275.
10. Юнкеров В. И. Математико-статистическая обработка данных медицинских исследований / В. И. Юнкеров, С. Т. Григорьев. – СПб. : ВМедА, 2005. – 292 с.
11. Савченко А. А. Содержание АТФ и активность НАД [Ф]-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах при иммунодефицит-ассоциированных заболеваниях в пришлых жителей эвенками / А. А. Савченко, С. Смирнова, А. Борисов // Бюллетень СО РАМП. – 2010. – Т. 30, № 3. – С. 33–38.
12. Low frequency and low intensity pulsed electromagnetic field exerts its anti-inflammatory effect through restoration of plasma membrane calcium ATPase activity / R. Selvan, K. Ganesan, R. Narayana Raju et al // Life Sci. – 2007. – Vol. 80, № 26. – P. 2403–2410.
13. Immunodiagnosics : evaluation of functional T-cell immunocompetence in whole blood independent of circulating cell numbers / R. J. Kowalski, A. Zeevi, R. Mannon et al // J. Immunotoxicol. – 2007. – Vol. 4, № 3. – P. 225–232.

### **References in transliteration**

1. Lokal'nyj i sistemnyj immunnyj otvet v bol'nyh tjazhelymi atopicheskimi dermatitami / D. D. Nijazov, T. M. Filimonova, O. Slisjutina i dr. // Rossijskij allergologicheskij zhurnal. – 2011. – # 5. – S. 24–29.
2. Augustine N. H. Comparison of ATP production in whole blood and lymphocyte proliferation in response to phytohemagglutinin / N. H. Augustine, B. M. Pasi, H. R. Hill // J. Clin. Lab. Anal. – 2007. – Vol. 21, # 5. – P. 265–270.
3. Izuchenie protivovospalitel'noj aktivnosti mazi s amikacinom na modeli

skipidarnogo dermatita u krys / S. M. Drogovoz, A. V. Dorovskij, Ja. A. Butko i dr. // *Lekarstva*. – 2006. – # 3–4. – S. 43–46.

4. Zalkan P. M. Vlijanie sinteticheskikh mojušhkih sredstv na reaktivnost' kozhi morskih vinok / P. M. Zalkan, E. A. Ievleva // *Aktual'nye voprosy professional'noj dermatologii*. – M., 1965. – S. 106–112.2.

5. Dikovickaja I. G. Kontaktnyj dermatit : klinika i terapija / I. G. Dikovickaja, I. M. Korsunskaja // *Svoremennye problemy dermatovenerologii, immunologii i vrachebnoj kosmetologii*. – 2012. – # 4. – S. 49–51.

6. Boyum A. isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood / A. Boyum // *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* – 1968. – Vol. 21 (97). – P. 77–79.

7. Muller L. R. Nitroblue tetrazolium reduction in monocytes and monocytes derivated macrophages / L. R. Muller, A. Rollag, S. S. Froland // *Immun. Today*. – 1989. – Vol. 97. – P. 490–496.

8. Cocco R. Patch test in the diagnosis of food allergy / R. Cocco, D. Sole // *Allergol. Immunopathol.* – 2009. – Vol. 37, # 4. – P. 205–207.

9. Protein measurement with the Folin phenolreagent / O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr et al // *J. Biol. Chem.* – 1951. – Vol. 193. – P. 265–275.

10. Junkerov V. I. Matematiko-statisticheskaja obrabotka dannyh medicinskih issledovanij / V. I. Junkerov, S. T. Grigor'ev. – SPb. : VMedA, 2005. – 292 s.

11. Savchenko A. A. Soderzhanie ATF i aktivnost' NAD [F]-zavisimyh degidrogenaz v limfocitah pri immunodeficit-associirovannyh zabolevanijah v prishlyh zhitelej jevenkami / A. A. Savchenko, S. Smirnova, A. Borisov // *Bjulleten' SO RAMP*. – 2010. – T. 30, # 3. – S. 33–38.

12. Low frequency and low intensity pulsed electromagnetic field exerts its anti-inflammatory effect through restoration of plasma membrane calcium ATPase activity / R. Selvan, K. Ganesan, R. Narayana Raju et al // *Life Sci.* – 2007. – Vol. 80, # 26. – P. 2403–2410.

13. Immunodiagnosics : evaluation of functional T-cell immunocompetence in whole blood independent of circulating cell numbers / R. J. Kowalski, A. Zeevi, R. Mannon et al // *J. Immunotoxicol.* – 2007. – Vol. 4, # 3. – P. 225–232.