

Mokslinis straipsnis

Augimo hormono ir kalcitrino poveikis *in vitro* polimorfonuklearinių leukocitų kolagenolitiniam aktyvumui ir elastazei sergant reumatoidiniu artritu su išreikšta osteoporoze

A. Keturkienė, V. Alekna, A. Venalis

Vilniaus universiteto Eksperimentinės ir klinikinės medicinos institutas

Santrauka

Darbo tikslas: bandymuose *in vitro* įvertinti naujus hormoninių vaistinių preparatų derinius reumatoidiniam artritui su išreikšta osteoporoze gydyti.

Tiriamieji asmenys ir tyrimo metodikos. Bandymuose *in vitro* ištirtas augimo hormono ir kalcitrino poveikis kolagenolitiniam ir elastazės aktyvumui polimorfonukleariniuose leukocituose (PMN), išskirtuose iš 14 sveikų asmenų ir 10 ligonių, sergančių RA su išreikšta osteoporoze, kraujo.

PMN iš kraujo išskirti fikolo-verografino gradiente, eritrocitai pašalinti lizės būdu, įvertinti mikroskopiškai, likę be eritrocitų PMN suardyti CO₂ ir acetono mišinyje ir užšaldyti 20°C temperatūroje iki fermentų aktyvumo tyrimų. Naudotos hormonų dozės: augimo hormono 0,025 U/ml ląstelių suspensijos, kalcitrino – 0,025 U/ml ląstelių suspensijos. Į PMN suspensiją vienu metu įdėta 0,0125 U/ml kiekvieno hormono. Fermentų aktyvumas kraujo PMN apskaičiuotas mg baltymo, nustatyto Lowry metodu, bei ląstelių milijonui. Kolagenolitinio ir elastazės aktyvumo kitimas PMN suspensijoje įvertintas naudojant substratus Kongo-kolageną ir Kongo-elastiną.

Duomenų analizė atlikta naudojant kompiuterinę statistinę programą „Statistika“.

Rezultatai. Bandymuose *in vitro* gauti duomenys, kad kraujo PMN leukocitų kolagenolitinio ir elastazės aktyvumas sumažėjo sergant RA su išreikšta osteoporoze, palyginus su sveikais asmenimis. Kalcitonino dozė 0,025 U/ml ląstelių suspensijos 14% sumažino kolagenolitinį aktyvumą PM leukocituose, išskirtuose iš ligonių kraujo. Įdėjus *in vitro* į ląstelių suspensiją 0,025 U/ml augimo hormono padidėjo kolagenolitinio aktyvumas 39% – ligonių PMN leukocituose ir 29% – sveikų asmenų ląstelėse. Po 0,0125 U/ml kalcitonino ir augimo hormono vienu metu įėjus *in vitro* į išskirtus iš kraujo PMN leukocitus padidėjo kolagenolitinio aktyvumas: 30% – tirtų ligonių ląstelėse ir 9% – sveikų asmenų ląstelėse.

Sergant RA su išreikšta osteoporoze gerokai sumažėjusio elastazės aktyvumo kraujo PMN leukocituose ($p < 0,01$) naudotos *in vitro* tyrimams hormonų dozės neatstatė.

Išvada. Augimo hormonas ir jo derinys su kalcitrinu koregavo sumažėjusį kolagenolitinį aktyvumą PMN ląstelėse, išskirtose iš sergančių RA su išreikšta osteoporoze ligonių kraujo, o tai gali daryti teigiamą poveikį atstatant sutrikusį kaulinio audinio metabolizmą.

Raktažodžiai:

osteoporozė, reumatoidinis artritas, metalo proteinazės, elastazė, augimo hormonas, kalcitinas

Adresas: A. Keturkienė

Vilniaus universiteto Eksperimentinės ir klinikinės medicinos institutas

Žygimantų g. 9, LT-01102 Vilnius

Tel. (8 5) 2628413; faks. 2123073

El. paštas: aldona.keturkiene@ekmi.vu.lt

Išvadas

Sergant reumatiniu artritu (RA) padidėja osteoporozės išsivystymo rizika. Jau ankstyvoje ligos stadijoje stebimas lokalus epifizinių kaulų masės mažėjimas. Osteoporozė, dažnai komplikuojama kaulų lūžiais, turi įtakos RA eigai.

RA yra uždegiminė autoimuninė liga, kuriai būdingas sąnarių sinovijos dangalo uždegimas, sukeliantis sąnario audinių ir periartikulinę struktūrų progresuojančią destrukciją [1]. Sąnario sinovija intensyviai infiltruojama uždegiminių ląstelių, tarp jų PMN. Pusiau piktybinis RA sinovijos fibroblastų (RASf) dauginimasis suformuoja hiperplastinį panusą, kuris agresyviai ardo kremzlinį ir kaulinį audinius. Šiuo metu genų ekspresijos tyrimų duomenys nurodo RASf patofiziologinius taikinius, kurie stimuliuoja sąnario audinių destrukciją ir uždegimą [2–4]. RASf tiesiogiai indukuoja kremzlės destrukciją išskirdami proteolizinius fermentus [5, 6] ir netiesiogiai, sukretuodami IL-1 β ir TNF- α ir jų pagalba skatindami katabolinius procesus kremzlėje [7].

Osteoporozė yra ankstyvas bei įprastas RA požymis ir gali pasireikšti dviem būdais: generalizuotas kaulinio audinio netekimas, išsivystantis dėl sumažėjusio mobilumo, uždegiminio proceso ir/arba gydymo steroidais; periartikulinė demineralizacija dėl vietinio uždegimo mediatorių poveikio [8, 9].

Sergant RA su išreikšta osteoporozė stebima progresuojanti destrukcija kolageno struktūroje tokiuose sąnario audiniuose kaip kremzlė, kaulas ir sausgyslės. Visų tipų kolagenai yra baltymai ir jų specifinė degradacija – fermentiniai procesai. Jungiamojo audinio baltymų destrukcija sąlygojama kintančio metaloproteinazių ir serino proteazių aktyvumo, produkuojamo sinovijos ląstelių, chondrocitų ir PMN leukocitų. Metaloproteinazių aktyvumas kinta sparčiau negu jų audinių inhibitorių kiekis ir susidaręs proteinazių perteklius, palyginus su inhibitoriais, žymiai prisideda prie kremzlinio audinio destrukcijos [10, 11] bei koreliuoja su kaulų mineralų tankiu ir kaulų apykaitos žymenimis. PMN leukocitai aktyviai dalyvauja nespecifinėje imuninėje sistemoje. Aktyvuoti PMN leukocitai cirkuliuoja lignonų, sergančių RA, kraujyje ir aktyviai dalyvauja uždegimo mediatorių gamyboje [12, 13].

Iš jungiamojo audinio baltymus degraduojančių proteinazių svarbus vaidmuo priskiriamas PMN leukocitų fermentams kolagenazei ir elastazei. Yra keletas kolagenazių (EC 3.4.23) tipų, vadinamų MMP-1 (matriks metaloproteinazė-1 arba fibroblastų tipo kolagenazė) ir MMP-8 (PMN neutrofilų kolagenazė). Skiriasi atskirų tipų kolagenazių aktyvumas [14]. Žmogaus PMN leu-

kocitų kolagenazė (PMN-CI, MMP8) yra viena iš dviejų „intersticinių“ kolagenazių, skaldančių I, II ir III tipo kolagenų molekules. Žinoma, kad žmogaus PMN leukocitų kolagenazė tirpaluose kur kas ryškiau skaldo I tipo kolageną, palyginus su II ir III tipais, kurie sudaro pagrindinį kolageno tipą kauliniame audinyje ir taip turi įtakos sąnario būklei. Sergant artritu PMN leukocitų kolagenazė dalyvauja sąnario audinių destrukcijoje ir yra vertingas patologinės būklės rodiklis [14].

Žmogaus PMN leukocitų elastazė (HLE, EC 3.4.21.11) yra fermentas, dalyvaujantis labai įvairių ekstraląstelinės terpės baltymų degradacijoje: kolageno, elastino, proteoglikanų ir struktūrinių glikoproteinų. Lizosominė elastazė, neutrali serino proteazė, lokalizuojasi PMN leukocitų azurofinėse granulėse ir atpalaiduojama į ekstraląstelinę terpę veikiant chemotaktiniam stimului arba ląstelei žūstant. Intraląstelinės elastazės aktyvumas gali būti naudingas, tačiau patologijų metu stebimas nekontroliuojamas ekstraląstelinis fermento aktyvumas. Sveikame organizme potencialiai žalingas elastazės poveikis slopinamas endogeninių inhibitorių: α -1-proteinazės inhibitoriaus, α -2-makroglobulino. Sergant RA, elastazei veikiant ląstelių membranas, skatinama kolageno, laminimo, fibronektino, heparan sulfato, proteoglikanų degradacija, padidėja PMN leukocitų migracija į uždegimo židinius ir sąnario kremzlės destrukcija. Šio fermento aktyvumas koreliuoja su sąnario kremzlės destrukcijos progresavimu [15].

Sergant RA su išreikšta osteoporozė tikslinga anabolinių priemonių, atstatančių degeneracinius pokyčius sąnario audiniuose, nepasižyminčių androgeniniu aktyvumu, paieška. Kaulinio audinio metabolizmo korekcijai galimos priemonės: osteogenezės stimuliavimas arba kaulinio audinio rezorbcijos slopinimas. Didelis anabolinis poveikis, pasireiškiantis kremzlinio audinio augimo skatinimu, būdingas augimo hormonui. Atsižvelgiant į tai, kad neutralias proteazes reguliuojantys inhibitoriai ir aktyvatoriai yra fermentiniai baltymai, aktualus augimo hormono poveikio PMN leukocitų kolagenolitiniam ir elastazės aktyvumui ištyrimas.

Kalcitoninas yra vienas ryškiausių kaulinio audinio rezorbcijos inhibitorių. Gauti geri rezultatai gydant kalcitonino preparatu kalcitrinu RA sergančius ligonius, tačiau šiuo hormonu RA ligonių su išreikšta osteoporozė gydymas palieka nemažai neaiškumo. Mūsų atlikti ilgalaikio RA su išreikšta osteoporozė gydymo kalcitonino preparatu kalcitrinu duomenys rodo, kad perspektyvu gydymą kalcitrinu derinti su preparatais, skatinančiais kaulinio audinio sintezę.

Tiriami asmenys ir tyrimo metodikos

In vitro tyrimams išskirti PMN leukocitai iš 10 moterų, sergančių RA su išreikšta osteoporozė, ir atitinkamo amžiaus vidurkio kontrolinės grupės 14 moterų kraujo. Ligonų amžiaus vidurkis 47,3 metų, ligos trukmė 12,2 (5–20) metų. Dauguma ligonių turėjo II laipsnio funkcinių nepakankamumą ir proceso aktyvumą. Buvo III–IV rentgenologinės stadijos. Dauguma ligonių (93%) gavo 7,5 mg parai prednizolono, vidutiniškai 4,3 metų. Parinkimas sveikų asmenų kontrolinei grupei atitiko šiuos kriterijus: gera fizinė ir psichinė sveikata, patvirtinta klinikiniais ir biocheminiais tyrimais.

Osteoporozėi įvertinti visiems ligoniams atlikta rankų metakarpinių kaulų rentgenogrammetrija, apskaičiuotas metakarpinis indeksas ir rankos 6 metakarpinių kaulų indeksas. Ultragarso sklidimo kauliniame audinyje greitis įvertintas EOM-01c echoosteometru. Tyrimai atlikti 2-o, 3-io ir 4-o rankos metakarpinių kaulų diafiziniuose bei alkūnkaulio ir šlaunikaulio diafizės proksimalinėse srityse. Po to apskaičiuotas ultragarsinio sklidimo greičio vidurkis.

PMN leukocitų išskyrimas iš kraujo metodikos buvo išsamiai aprašytos mūsų moksliniame straipsnyje [16].

Veninis kraujas buvo renkamas 8–9 val. rytą, 24 val. po atvykimo į ligoninę PMN leukocitai išskirti iš heparinizuoto kraujo (25 U/ml), praskiesto Henkso druskų tirpalu I, santykiu 1 : 1. Centrifuguota fikolio-verografino gradientu, Boyum metodu. Išskirti PMN leukocitai du kartus perplauti Henkso druskų tirpalu II su daugiau Ca^{2+} ir jame resuspenduoti. Per 30 s PMN nuosėdos surinktos ir pašalinti eritrocitai hipotonine lize su lediniu distiliuotu vandeniu. PMN leukocitų suspensijos izotoniškumas po eritrocitų lizės atstatytas Henkso druskų tirpalu III, kratant su juo 15 s. Išskirtuose iš kraujo PMN leukocitų 95–97% buvo neutrofilai (diferenciacinis skaičiavimas nudažius tepinėlių Azur eozinu). Gyvybingumas didesnis negu 97% (tripano mėlynojo testas). Atlikta PMN leukocitų lizė tris kartus užšaldant–atšildant CO_2 -acetono mišinyje ir užšaldyta $-20\text{ }^\circ\text{C}$ temperatūroje iki fermentų aktyvumo nustatymo.

Reagentai ir tirpalai

Augimo hormonas (Kaunas, Endokrininių preparatų gamykla), kalcitinas, tripsinas, kristalinas, EC 3.5.21.4 (Sofija, Čekija), Sojos pupelių tripsino inhibitorius (Reanal, Vengrija), azureozinatas, tripno mėlynasis (Sigma, JAV), Fikolis 400 (Serva, Vokietija), NaOH (Lachema, Čekija), kolagenas, liofilizuotas, grynas M ca. 80.000

(Serva). Elastinas, grynas (Serva), elastazė iš žmogaus neutrofilų, ca.18 U/mg (Serva), kolagenazė 0,71 U/mg (Serva), kolalitinai 148 mU/mg (Maskva), elastolitinai 0,5 mU/mg (Maskva).

Heparinizuotas kraujas (25 U/ml) buvo praskiestas Henkso druskų tirpalu I, pH 6,8 naudojant substratu Kongo raudonąjį elastiną.

Fermentų aktyvumo tyrimas. PMN kolagenolitinis aktyvumas nustatytas naudojant substratu Kongo raudonąjį kolageną.

PMN elastazės aktyvumas nustatytas naudojant substratu Kongo raudonąjį elastiną.

Kolageno ir elastino substratai inkubuoti 5 min. $37\text{ }^\circ\text{C}$ temperatūroje, po to pridėta PMN lizato. Iš standartinio kristalinio fermento tirpalo išvestos standartinės kreivės. Kontrolės paruoštos iš atitinkamų inaktyvuotų PMN lizatų (virinant 3 min. vandens vonioje).

PMN kolagenolitinis aktyvumas ir elastazė aktyvinti in vitro, pridėdant 0,1 ml tripsino (dozė 10 mkg/ml) į 0,2 ml ląstelių suspensijos ir inkubuoti 90 min. esant $37\text{ }^\circ\text{C}$, paskui panardinant į ledo vonią 3 min. Aktyvacija sustabdoma pridėdant 0,1 ml sojos pupelių tripsino inhibitoriaus (dozė 10 mkg/ml) [18].

Fermentų aktyvumas įvertintas spektrofotometriškai, esant 510 nm bangos ilgio – kolagenolitiniam aktyvumui ir 540 nm – elastazei.

Kolagenolitinio aktyvumo vienetas – fermento kiekis, kuris hidrolizuoja 1 mkg kolageno per min. esant $30\text{ }^\circ\text{C}$, pH 7,4. Elastazės aktyvumo vienetas – fermento kiekis, kuris hidrolizuoja 1 mg elastino per minutę esant $30\text{ }^\circ\text{C}$, pH 8,8.

Išskirti PMN perplauti ir resuspenduoti Henkso druskų tirpale II, pH 6,8 praturtintame Ca^{2+} (1,5 mM NaCl, 0,05 mM gliukozės, 0,01 mM MgSO_4 , 0,01 mM MgCl_2 , 0,025 mM CaCl_2).

Baltymo kiekio analizė. Baltymų koncentracija įvertinta Lowry metodu, standartas jaučio serumo albuminas.

Tyrimų rezultatai įvertinti statistiškai, naudojant kompiuterinę statistinę programą „Statistic for Windows“.

Rezultatai

Kalcitonino ir augimo hormono poveikis kraujo PMN leukocitų kolagenolitiniam aktyvumui

Kraujo PMN leukocitų kolagenolitinio aktyvumo kitimas veikiant kalcitrinu ir augimo hormonu nurodytas 1 ir 2 lentelėse.

Gauti rezultatai parodė, kad RA ligonių su išreikšta

osteoporoze polimorfonuklearinių leukocitų kolagenolitinis aktyvumas buvo sumažėjęs, palyginus su sveikais asmenimis (1 lentelė). Šio fermento aktyvumo sumažėjimas labai ryškus ir statistiškai patikimas (10 kartų, $p < 0,001$).

Kalcitinas, įdėtas *in vitro* po 0,025 U/ml į ląstelių suspensiją, sumažino kolagenazės aktyvumą dar 14%. Augimo hormonas, įdėtas po 0,025 U/ml į ląstelių suspensiją, padidino kraujo PMN kolagenazės aktyvumą tiek sveikų, tiek tirtų ligonių grupėse (atitinkamai 39 ir 29%). Kai į išskirtus iš kraujo PMN leukocitus buvo įdėta vienu metu kalcitrino ir augimo hormono, abiejų po 0,0125 U/ml, kolagenolitinis aktyvumas sveikų asmenų grupėje buvo padidėjęs tikrai 9%, o RA ligonių su išreikšta osteoporoze grupėje – 30%. Vertinant kolagenolitinio aktyvumo kitimą, išreikštą U/10⁶ ląstelių, nė vienas iš tiriamų hormoninių preparatų neatstatė dėl ligos ryškiai sumažėjusio šio fermento aktyvumo.

Norėdami išsiaiškinti, ar tirtų hormonų veikla priklausė nuo baltymo kiekio kitimo ląstelėse, apskaičiavome kolagenolitinio aktyvumo kitimą kraujo PMN U/mg baltymo (2 lentelė). Palyginus sveikų asmenų ir RA ligonių su išreikšta osteoporoze grupes, gauti duomenys, kad PMN kolagenolitinis aktyvumas buvo sumažėjęs visose ligonių grupėse, tačiau priklausė nuo pridėtų *in vitro* hormonų. Statistiškai patikimas ($p < 0,001$) kolagenazės aktyvumo sumažėjimas buvo tikrai įdėjus kalcitonino dozę po

0,025 U/ml ląstelių suspensijos. Pridėjus *in vitro* augimo hormono arba augimo hormono su kalcitrinu, kolagenolitinio aktyvumo statistiškai patikimo skirtumo, palyginti su sveikų asmenų grupėmis nebuvo, nors ir išliko sumažėjimas (atitinkamai 59 ir 65%). Nustatyta, kad augimo hormono poveikis kraujo PMN kolagenolitiniam aktyvumui ryškiai priklauso nuo baltymo kiekio kitimo ląstelėse.

Remiantis gautais rezultatais, galima daryti išvadą, kad sergant RA su išreikšta osteoporoze, kolagenolitiniam aktyvumui didžiausią poveikį darė augimo hormono su kalcitrinu derinys.

Kalcitrino ir augimo hormono poveikis kraujo PMN leukocitų elastazės aktyvumui

Kraujo PMN leukocitų elastazės aktyvumo kitimas veikiant kalcitrinui ir augimo hormonui nurodytas 3 ir 4 lentelėse.

Palyginus elastazės aktyvumą PMN leukocituose, išskirtuose iš sveikų asmenų kraujo ir šio fermento aktyvumą sergant RA su išreikšta osteoporoze, matyti ryškus (5,7 karto) ir statistiškai patikimas ($p < 0,01$) aktyvumo sumažėjimas (3 lentelė). Skirtumas tarp sveikų žmonių kraujo PMN leukocitų ir ligonių atitinkamų ląstelių elastazės aktyvumo išliko ir paveikus jas *in vitro* kalcitrinu su augimo hormonu. Tačiau, kolagenolitinio aktyvumo PMN leukocituose, ryškesnį stimuliuojantį poveikį darė ne augimo hormonas, bet kalcitinas. Kalcitinas 0,025 U/ml ląstelių suspensijos padidino PMN elastazės akty-

1 lentelė. Kalcitrino ir augimo hormono įtaka kraujo PMN leukocitų kolagenolitiniam aktyvumui U/10⁶ ląstelių (M±m)

Grupės Nr.	Grupė	RA ligonių su išreikšta OP kraujo PMNL kolagenazės aktyvumas	Sveikų žmonių kraujo PMNL kolagenazės aktyvumas
I	PMN suspensija	0,84 ± 0,12	8,55 ± 1,72
II	PMN susp.+CT	0,72 ± 0,10	9,83 ± 2,28
III	PMN susp.+AH	1,17 ± 0,20	11,09 ± 3,13
IV	PMN susp.+CT+AH	10,9 ± 0,13	9,37 ± 2,00

Statistinis patikimumas: $P_{I-II} < 0,001$; $P_{II-III} < 0,001$; $P_{III-IV} < 0,001$;

2 lentelė. Kalcitrino ir augimo hormono įtaka kraujo PMN leukocitų kolagenolitiniam aktyvumui U/mg baltymo (M ± m)

Grupės Nr.	Grupė	RA ligonių su išreikšta OP kraujo PMNL kolagenolitinis aktyvumas	Sveikų žmonių kraujo PMNL kolagenolitinis aktyvumas
I	PMN suspensija	44,76 ± 7,52	86,60 ± 13,44
II	PMN susp.+CT	43,66 ± 6,46	91,50 ± 14,22
III	PMN susp.+AH	61,96 ± 10,15	103,40 ± 22,57
IV	PMN susp.+CT+AH	62,00 ± 11,45	94,77 ± 15,88

Statistinis patikimumas: $P_{I-II} < 0,01$; $P_{II-III} < 0,001$; $P_{III-IV} < 0,1$; $P_{I-IV} < 0,1$; $P_{II-IV} < 0,05$

3 lentelė. Kalcitrino ir augimo hormono įtaka kraujo PMN leukocitų elastazės aktyvumui U/10⁶ ląstelių (M ± m)

Grupės Nr.	Grupė	RA ligonių su išreikšta OP kraujo PMN elastazės aktyvumas	Sveikų žmonių kraujo PMN elastazės aktyvumas
I	PMN suspensija	30,82 ± 8,04	178,04 ± 31,44
II	PMN susp.+CT	43,57 ± 7,64	167,35 ± 35,26
III	PMN susp.+AH	33,41 ± 9,42	148,72 ± 33,66
IV	PMN susp.+CT+AH	44,34 ± 19,08	169,08 ± 39,05

Statistinis patikimumas: $P_{I/II} < 0,01$; $P_{III/II} < 0,01$; $P_{III/IV} < 0,01$; $P_{IV/II} < 0,01$

4 lentelė. Kalcitrino ir augimo hormono įtaka kraujo PMNL elastazės aktyvumui U/mg baltymo (M ± m)

Grupės Nr.	Grupė	RA ligonių su išreikšta OP kraujo PMN elastazės aktyvumas	Sveikų žmonių kraujo PMN elastazės aktyvumas
I	PMN suspensija	19,22 ± 6,13	15,99 ± 2,30
II	PMN susp.+CT	20,49 ± 4,87	13,46 ± 2,16
III	PMN susp.+AH	14,02 ± 1,99	12,39 ± 2,40
IV	PMN susp.+CT+AH	16,74 ± 4,88	13,81 ± 3,11

vumą 43%, tuo tarpu tokia pati augimo hormono dozė šio fermento aktyvumą didino tikrai 10%. Palyginus kraujo PMN leukocitų elastazės aktyvumo kitimą ir baltymo kiekį šiose ląstelėse, išliko ryškiai (2 kartus) ir statistiškai patikimai ($p < 0,01$) sumažėjęs šio fermento aktyvumas ląstelėse, išskirtose iš RA ligonių su išreikšta osteoporoze kraujo (4 lentelė). Nė vienas iš tirtų hormonų neatstatė PMN leukocitų elastazės aktyvumo ląstelėse, išskirtose iš RA ligonių su išreikšta osteoporoze kraujo, nors ryškesnė tendencija stebėta veikiant kalcitrinui.

Aptarimas

Mūsų atlikti *in vitro* tyrimai parodė, kad, esant išreikštai osteoporozei, RA ligoniams ryškiai sumažėja kolagenolitinis ir elastazės aktyvumas kraujo PMN leukocituose.

Sergant RA padidėja PMN leukocitų kolageną skaldančių fermentų aktyvumas [15]. Šie duomenys atitinka mūsų anksčiau paskelbtų darbų rezultatus [16]. Šiais atliktais tyrimais gauti duomenys, kad, esant išreikštai osteoporozei reumatoidinio artrito metu, ryškiai sumažėja elastazės ir kolagenolitinis aktyvumas kraujo PMN leukocituose. Kaip žinoma, osteoporozės metu vyrauja kaulinio audinio rezorbcijos procesai, tuo tarpu baltymų sintezė ryškiai sumažėjusi, kaulo formavimasis nuslopintas [22]. Uždegiminių procesų rodikliai osteoporoze sergančių ligonių kraujyje neišreikšti. Todėl, sergant RA, vyraujant uždegiminiams procesams ir esant išreikštai

osteoporozei, jungiamojo audinio baltymus skaldančių fermentų aktyvumas tokiose uždegiminėse ląstelėse kaip kraujo PMN gali sumažėti dėl kelių priežasčių. Sergant osteoporoze slopinama kraujo PMN matriksų proteinazių apofermento sintezė, nes sutrinka augimo hormono indukuojamų į insuliną panašių augimo faktorių IGF_I ir IGF_II sintezė [21]. Taip pat galimas IGF surišančių baltymų (GHRb proteinų) sintezės slopinimas, nes šie baltymai koreliuoja ne tik su kūno masės indeksu, bet ir su kaulų mineralų tankiu [23].

Sergant tiek RA, tiek osteoporoze, pakinta ne tik vietinė, bet ir sisteminė baltymų apykaitos hormoninė reguliacija [24]. Tiriant osteoporozės patogenazę RA metu, gauti duomenys, kad padidėja ne osteoklastų skaičius, bet jų rezorbcinis aktyvumas [18]. Šiuo metu vėl vis daugiau dėmesio skiriama hipotalamo–hipofizės–antinksčių sistemai [19, 20], kurioje didelis vaidmuo priklauso kortikosteroidų ir AG santykio kitimui. Kraujo PMN leukocitai palaiko uždegiminiuosius procesus sergant RA, išskirdami metalo proteinazes ir serino proteazes bei dalyvaudami susidarant reaktyviems deguonies junginiams (ROS). Periartrikulinis uždegimas RA metu lydimas sąnario audinių infiltracijos PMN leukocitais. Sergant RA su išreikšta osteoporoze įdėtas *in vitro* į kraujo PMN ląstelių kultūrą AH koregavo kolagenolitinį aktyvumą ligonių ląstelėse iki kontrolinės grupės reikšmių, o tai parodo galimą tiesioginį AH poveikį, nebūtinai per jo indukuojamą IGF_I ir IGF_II sintezę kepenyse [21]. Šie duomenys leidžia

manyti, kad, sergant RA ir esant išreikštai osteoporozei, uždegiminių ląstelių fermentų aktyvumą AH gali veikti tiesiogiai stimuliuodamas anabolinius procesus.

Mūsų tirtu hormono kalcitrino poveikis kraujo PMN kolagenazei nebuvo išreikštas tiek įdėjus prie ląstelių *in vitro* vieno kalcitrino, tiek kalcitrino su AH. Ryškiai sumažėjusį elastazės aktyvumą kraujo PMN leukocituose sergant RA su išreikšta osteoporoze galima paaiškinti įvairiapusišku šios serino proteazės poveikiu ne tik tai jungiamojo audinio baltymams, bet ir imuniniams procesams, ypač IgM [15].

Nė vienas iš tirtų hormonų neatstatė PMN leukocitų elastazės aktyvumo ląstelėse, išskirtose iš RA ligonių su išreikšta osteoporoze kraujo, nors ryškesnė korekcijos tendencija stebėta veikiant kalcitrinui.

Išvada

Sumažėjusį kolagenolitinį aktyvumą PMN leukocituose, išskirtuose iš ligonių, sergančių reumatoidiniu artritu su išreikšta osteoporoze, kraujo, kompensavo augimo hormonas ir jo derinys su kalcitrinu, o tai patvirtina teigiamą sinergistinį šių hormonų poveikį kaulinio audinio metabolizmui.

Literatūra

1. Müller-Lander U, Pap T, Gay RE, Neidhart M, Gay S. Mechanisms of disease: the molecular and cellular basis of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2005; 1: 102–10.
2. Devauchelle V, Marion S, Cagnard N, et al. DNA microarray allows molecular profiling of rheumatoid arthritis and identification of pathophysiological targets. *Genes Immun*. 2004; 5: 597–608.
3. Justen HP, Grunewald E, Totzke G, et al. Differential gene expression in synovium of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Mol Cell Biol Res Commun*. 2000; 3: 165–72.
4. Ruschpler P, Lorenz P, Eichler W, et al. High CXCR3 expression in synovial mast cells associated with CXCL9 and CXCL10 expression in inflammatory synovial tissues of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2003; 5: R241–R252.
5. Huber LC, Distler O, Tarner I, Gay RE, Gay S, Pap T. Synovial fibroblasts: key players in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2006; 45: 669–75.
6. Karouzakis E, Neidhart M, Gay RE, Gay S. Molecular and cellular basis of rheumatoid joint destruction. *Immunol Lett*. 2006; 106: 8–13.

7. Goldring SR. Pathogenesis of bone and cartilage destruction in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2003; 42(Suppl 2): ii11–ii16.

8. Böttcher J, Pfeil A. Diagnosis of periarticular osteoporosis in rheumatoid arthritis using digital X-ray radiogrammetry. *Arthritis Research and Therapy*. 2008; 10:103.

9. Sambrook PN. The skeleton in rheumatoid arthritis: common mechanism for bone erosion and osteoporosis? *J Rheumatol*. 2000; 27: 2541–2.

10. Luo X-H, Guo L-J, Shan P-F, et al. Relationship of circulating MMP. *Osteoporos Int*. 2006; 17:521–526.

11. Peterson TJ. Matrix metalloproteinase inhibitor development and the remodeling of drug discovery. *Heart Failure Reviews*. 2004; 9: 63–79.

12. Nagashima M, Yoshino H, Tanaka H, Yoshida N, Kashiwagi N, Saniabadi AR. Granulocyte and monocyte apheresis suppresses symptoms of rheumatoid arthritis: a pilot study. *Rheumatol Int*. 1998; 18: 113–8.

13. Bartūnkova J, Araujo A, Hrušak O, Šediva A. Autoimmunity to polymorphonuclears: functional consequences of the binding of antibodies to membrane and cytoplasmic target antigens of polymorphonuclear leukocytes. *Journal of Clinical Immunology*. 1997; 17(6): 455–61.

14. Mandal M, Mandal A, Das S, Chakraborti T, Chakraborti S. Clinical implications of matrix metalloproteinases. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2003; 252: 305–29.

15. Momohara S, Kashiwazaki S, Inoue K, Saito S, Nakagawa T. Elastase from polymorphonuclear leukocyte in articular cartilage and synovial fluids of patients with rheumatoid arthritis. *Clinical Rheumatology*. 1997; 16(2): 133–40.

16. Keturkienė A, Dadonienė J, Alekna V, Valiukienė K. Effect of polyvinylpyrrolidone on collagenolytic activity and elastase from polymorphonuclear leucocytes of patients with rheumatic diseases. *Acta medica Lituanica*. 1995; 4: 37–44.

17. Yeap SS, Hosking DJ. Management of corticosteroid-induced osteoporosis. *Rheumatology*. 2002; 41: 1088–94.

18. Hirayama T, Danks L, Sabokbar A, Athanasou NA. Osteoclast formation and activity in the pathogenesis of osteoporosis in rheumatoid arthritis. *Rheumatology*. 2002; 41:1232–9.

19. Jessop DS, Harbuz MS. A defect in cortisol production in rheumatoid arthritis: why are we still looking? *Rheumatology*. 2005; 44(9): 1097–100.

20. Phillips JE, Gersbach ChA, Wojtowicz AM, Garcia AJ. Glucocorticoid-induced osteogenesis is negatively regulated by Runx2/Cbfa1 serine phosphorylation. *J Cell Sci.* 2006; 119: 581–91.

21. Toussiro E, Nguyen NU, Dumoulin G, Aubin F, Cedoz JP, Wendling D. Relationship between growth hormone-IGF-I-IGFBP-3 axis and serum leptin levels with bone mass and body composition in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology.* 2005; 44(1): 120–5.

22. Canalis E, Mazziotti G, Giustina A, Bilezikian JP. Glucocorticoid-induced osteoporosis: pathophysiology and therapy. *Osteoporos Int.* 2007; 18:1319–1328.

23. Jassal SK, Muhlen D, Barrett-Connor E, Rosen CJ. Serum insulin-like growth factor binding protein-1 levels and bone mineral density in older adults: The Rancho Bernardo Study. *Osteoporos Int.* 2005; 16: 1948–54.

24. Lašienė D, Lašas L. Žmogaus augimo hormonas, jo deficitas ir gydymas. Kaunas: Kauno medicinos universiteto Endokrinologijos institutas, 2003.

*Straipsnis įteiktas redakcijai 2008 m. sausio 9 d.,
parengtas spaudai 2008 m. kovo 27 d.*

EFFECT OF GROWTH HORMONE AND CALCITRIN *IN VITRO* ON THE COLLAGENOLYTIC AND ELASTASE ACTIVITY IN BLOOD POLYMORPHONUCLEAR LEUCOCYTES

A. Keturkienė, V. Alekna, A. Venalis

Institute of Experimental and Clinical Medicine at Vilnius University

Abstract

To search for the treatment of patients when the course of rheumatoid arthritis is aggravated with expressed osteoporosis, the influence of human growth hormone (GH) and calcitonin preparation calcitriin (CT) on the activity of polymorphonuclear leucocytes (PMN) was evaluated *in vitro*.

Methods. Experiments *in vitro* were carried out as described earlier (*1). The effect of the hormones alone and their combination on the collagenolytic activity and elastase in PMN isolated from the blood of 14 healthy persons and 10 patients was determined.

Results. Collagenolytic and elastase activity in PMN isolated from the blood of patients was lower as compared with he-

althy persons. Under the influence of CT at a dose of 0.025 U/ml cell suspension, collagenolytic activity was lowered in patients' blood PMN by 14%. Addition to the cell suspension of 0.025 U/ml GH increased collagenolytic activity in PMN of patients by 39% and in healthy persons by 29%. CT and GH, given together at a dose of 0.0125 U/ml of each hormone, increased collagenolytic activity in PMN of patients by 30% and of healthy persons by 9%. Elastase activity of was significantly decreased in the PMN of patients with expressed osteoporosis ($p < 0.01$) and wasn't restored by the study hormones used in the applied doses.

Conclusion. Decreased collagenolytic activity in PMN isolated from the blood of patients with expressed osteoporosis in the course of rheumatoid arthritis was increased by GH and its combination with CT, which could have a beneficial effect on bone metabolism.

Keywords:

osteoporosis, rheumatoid arthritis, growth hormone, calcitriin, metalloproteinases, elastase

* *Reference.* 1. Keturkienė A, Dadonienė J, Alekna V, Valiukienė K. *Acta medica Lituanica.* 1995; 4: 37–44.