

ХАРАКТЕРИСТИКА Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-аз ЛІМФОЦИТІВ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ ХВОРИХ З РЕВМАТИЧНОЮ ПАТОЛОГІЄЮ

Р. В. ФАФУЛА, У. П. ЄФРЕМОВА, З. Д. ВОРОБЕЦЬ

*Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, Україна;
e-mail: roman_fafula@ukr.net, vorobets@meduniv.lviv.ua*

Проведено аналіз кінетичних властивостей Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-ази сапонін-перфорованих лімфоцитів периферичної крові здорових донорів і хворих на ревматоїдний артрит та анкілозивний спондилоартрит. За оцінкою змін гідролазної активності Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-ази встановлено, що спорідненість Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-ази плазматичної мембрани і мембран ендоплазматичного ретикулума до АТР вірогідно не відрізняється. В умовах розвитку ревматичної патології інгібування активності досліджуваних ензиматичних систем в імункомпетентних клітинах відбувається за змішаним типом – як за рахунок зменшення числа обертів ензиму, так і за рахунок зниження спорідненості Ca^{2+} -АТР-аз до субстрату. Доведено, що в лімфоцитах осіб з ревматичною патологією Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-аза вірогідно характеризується нижчою спорідненістю до субстрату транспортування, ніж у здорових донорів.

Ключові слова: Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-аза, лімфоцити, ревматоїдний артрит, анкілозивний спондилоартрит.

Відомо, що внутрішньоклітинний Ca^{2+} є ключовим сигнальним месенджером практично в усіх типах клітин, зокрема і в імункомпетентних. У лімфоцитах зміни $[\text{Ca}^{2+}]_i$ асоціюються з численними клітинними процесами і реакціями, такими як активація клітинних кіназ і фосфатаз, регулювання цитоскелетних протеїнів, контроль транскрипції, модуляція поверхневих рецепторів [1]. Підвищення $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в Т-лімфоцитах під час зв'язування Т-клітинного рецептора із чужорідним антигеном запускає транскрипційні процеси, які, насамкінець, ведуть до секреції ефекторних цитокінів і координації імунної відповіді [2]. Зниження рівня $[\text{Ca}^{2+}]_i$ веде до ослаблення активації Т-лімфоцитів і до розвитку різних форм імунodefіциту [3, 4]. Імунологічна реактивність лімфоцитів також пов'язана зі змінами $[\text{Ca}^{2+}]_i$ [5]. За фізіологічних умов підтримання Ca^{2+} -гомеостазу зумовлюється суперпозицією функціонування енергозалежних та енергонезалежних Ca^{2+} -транспортувальних систем, а також Ca^{2+} -зв'язувальних протеїнів.

Відомо, що за деяких патологій, зокрема ревматичної, змінюються біохімічні та імунологічні показники лімфоцитів, а також їх Ca^{2+} -гомеостаз [6, 7]. Ревматичні захворювання є одними з найпоширеніших у світі і є гетерогенною групою мультифакторних

хвороб. У попередніх дослідженнях нами показано дефект гідролазної активності Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-ази лімфоцитів крові хворих на ревматоїдний артрит (РА) [8]. Схожі результати одержано дослідниками раніше [9]. Проте вірогідно невідомо, які механізми зумовлюють порушення функціональної активності Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-ази. З огляду на це, метою роботи є вивчення кінетичних властивостей Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-ази лімфоцитів крові здорових донорів і хворих на РА та анкілозивний спондилоартрит (АСА).

Матеріали і методи

Дослідження проводили на лімфоцитах периферичної крові здорових донорів і хворих на РА та АСА під час госпіталізації хворих в ревматологічне відділення Львівської обласної клінічної лікарні. Усіх хворих було розділено на дві групи: хворі на РА ($n = 40$) та хворі на АСА ($n = 30$). Групу контролю становили практично (клінічно) здорові донори, репрезентативні за віком (20–35 років) і статтю ($n = 30$).

Моноядерні лімфоцити периферичної крові людини виділяли з гепаринізованої свіжоотриманої крові здорових донорів і хворих на РА та АСА в градієнті густини фікол-тріумбразу ($\rho = 1,08 \text{ г/см}^3$) [10]. Цілісність і життєздатність лімфоцитів, яка в усіх дослідах

становила не менше 95%, оцінювали за забарвленням трипановим синім [11].

Для пермеабілізації мембран лімфоцитів і розкриття латентної Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-азної активності лімфоцити інкубували протягом 10 хв за помірного струшування в розчині, який містив сапонін у концентрації 0,1% [12]. Вміст протеїну в лімфоцитарній суміші визначали методом Лоурі [13].

Визначення Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-азної ензиматичної активності сапонін-перфорованих лімфоцитів проводили при 37 °С в середовищі інкубації об'ємом 1 мл такого складу (мМ): 100 КСl, 50 NaCl, 5 MgCl_2 , 5 АТР, 0,05 CaCl_2 , 1 уабаїн (селективний інгібітор Na^+ , K^+ -АТР-ази), 1 NaN_3 (інгібітор мітохондріальної АТР-ази), 20 Непес-Трис-буфер (рН 7,4) [14]. АТР-гідролазну реакцію ініціювали внесенням до інкубаційного середовища аліквоти лімфоцитарної суміші (100 мкл); кількість лімфоцитарного протеїну в пробі не перевищувала 50–75 мкг/мл. Тривалість інкубації – 5 хв. Ензиматичну реакцію зупиняли додаванням 1 мл охолодженого стоп-розчину такого складу: 1,5 М натрій ацетат, 3,7% формальдегід, 14%-й етанол, 5%-на ТХО (рН = 4,3). Суспензію центрифугували (10 хв, 1600 g). В одержаному супернатанті, який не містив протеїну, визначали вміст неорганічного фосфору P_i за методом W. Rathbun, V. Betlach [15].

Питому Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-азну активність розраховували як різницю між активністю АТР-азних систем у Ca^{2+} -вмісному та безкальцієвому середовищах (1 мМ ЕГТА) і виражали у мкмоль P_i /хв на 1 мг протеїну, вивільненого в АТР-гідролазній реакції. З метою розділення сумарної Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-азної активності на компоненти: тапсигаргіннечутливу Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-азу плазматичної мембрани (ПМ) та тапсигаргінчутливу Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-азу мембран ендоплазматичного ретикулума (ЕПР) до стандартного Ca^{2+} - та Mg^{2+} -вмісного середовища інкубації додавали селективний інгібітор Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-ази ЕПР – тапсигаргін (0,1 мкМ). У дослідах контролем на неензиматичний гідроліз АТР було стандартне середовище інкубації, яке не містило досліджуваної проби. Як контроль на кількість ендогенного P_i в лімфоцитарній суміші використовували суспензію лімфоцитів у фізіологічному розчині.

Кінетичний аналіз. Вивчення кінетичних властивостей Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-ази проводили в стандартному середовищі інкубації, модифікованому за складом відповідних

компонентів (концентрація субстрату – АТР та активаторів – Ca^{2+} , Mg^{2+}).

Уявні кінетичні параметри, які характеризують Ca^{2+} , Mg^{2+} -залежну АТР-гідролазну реакцію – уявну константу спорідненості до АТР, уявну константу активації іонами Ca і Mg та максимальну швидкість реакції гідролізу АТР визначали у координатах Лайнуївера–Берка $\{1/V \text{ від } 1/S\}$, де S – задана концентрація реагенту (АТР, Ca^{2+} чи Mg^{2+}), а V – швидкість гідролізу АТР при заданій концентрації реагенту [16].

Кінетичні та статистичні розрахунки проводили в режимі програмного забезпечення MS Office. Результати досліджень обробляли загально-прийнятими методами варіаційної статистики з використанням *t*-критерію Стьюдента. Рівняння прямої лінії, що найкраще апроксимує експериментальні дані, розраховували методом найменших квадратів. Абсолютне значення коефіцієнта кореляції *r* становило 0,9–0,98. Вірогідність розрахованих параметрів прямої перевіряли за F-критерієм Фішера: вірогідною вважали апроксимацію, за якої $P \leq 0,05$.

У дослідах використовували реактиви АТР, Непес, Tris, уабаїн, тапсигаргін, ЕГТА (Sigma, США), Saponin (Quillaja Saponaria Molina prast.; Acros organics, Belgium). Інші використані в дослідах реактиви були вітчизняного виробництва кваліфікації чда та хч.

Комісією з питань біоетики Львівського національного медичного університету порушень морально-етичних норм при виконанні науково-дослідної роботи не виявлено (протокол № 8 від 8 жовтня 2012 р.).

Результати та обговорення

Кінетичний аналіз активності Ca^{2+} , Mg^{2+} -залежного гідролізу АТР лімфоцитами крові від концентрації АТР. Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-аза каталізує перенесення двох іонів кальцію крізь мембрану проти їхнього електрохімічного градієнта, використовуючи енергію гідролізу АТР. З огляду на це, зміни концентрації АТР в інкубаційному середовищі впливають, вірогідно, на швидкість АТР-гідролазної реакції. Важливою характеристикою Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-аз є залежність активності ензиму від концентрації субстрату в середовищі інкубації, яка визначається величиною уявної константи спорідненості (афінності) до субстрату $K_{\text{АТР}}$. Останню розраховували шляхом визначення питомої Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-азної активності в середовищі інкубації, яке містило АТР в діапазоні концентрацій від 0,1 до 5 мМ

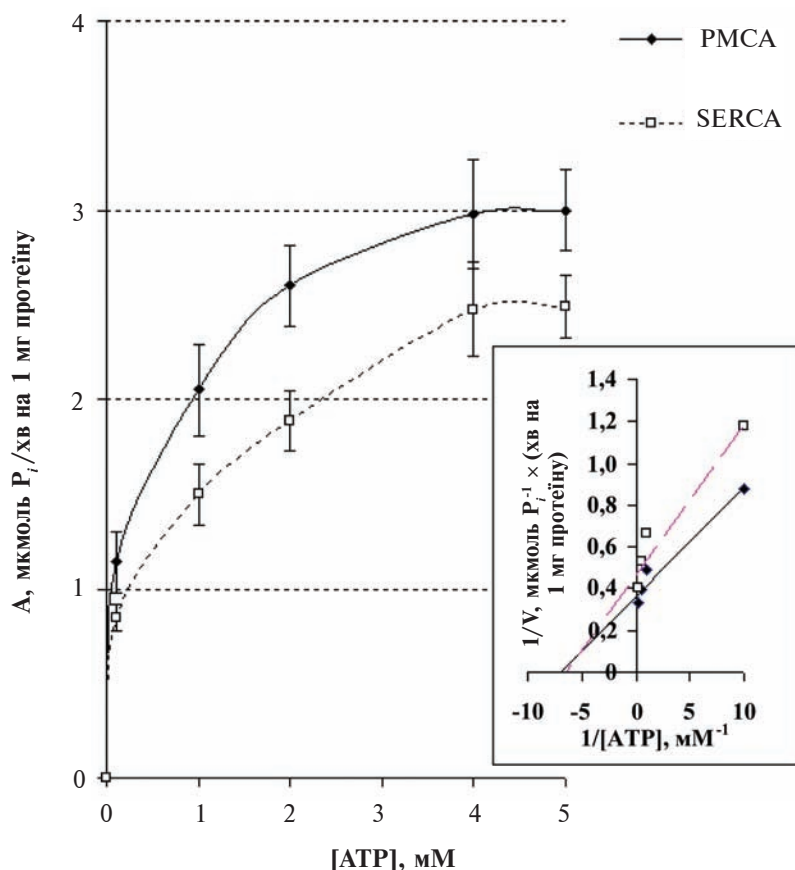


Рис. 1. Концентраційна залежність впливу АТР на активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-ази ПМ (PMCA) і мембран ЕПР (SERCA) лімфоцитів крові здорових донорів та лінеаризація цих концентраційних кривих у координатах Лайнуївера–Берка, ($n = 6-8$; $r > 0,9$; $F < 0,005$)

(за сталої концентрації $\text{Ca}^{2+} - 0,05$ мМ і $\text{Mg}^{2+} - 5$ мМ).

З'ясовано, що підвищення концентрації АТР в середовищі інкубації в діапазоні концентрацій від 0,1 до 4,0 мМ веде до поступового збільшення ензиматичної активності Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-ази ПМ і мембран ЕПР з виходом на плато (рис. 1). Оптимальна концентрація субстрату для функціонування обох ензимів становить 4 мМ.

Вивчення концентраційної залежності впливу АТР на Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-азну активність свідчить, що в діапазоні досліджуваних концентрацій АТР активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-ази ПМ хворих на РА та АСА знижена порівняно з такою у здорових донорів (рис. 2).

Для з'ясування можливого механізму зміни ензиматичної активності цих АТР-гідролазних систем лімфоцитів криві концентраційної залежності лінеаризовано в координатах Лайнуївера–Берка (рис. 1; рис. 2). Як видно з рис. 1, криві залежності $\{1/V; 1/[ATP]\}$ відрізняються тангенсом нахи-

лу, але перетинають вісь абсцис в одній точці, що свідчить про однакову спорідненість Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-ази ПМ і мембран ЕПР до субстрату.

Криві залежності $\{1/V; 1/[ATP]\}$ на рис. 2 відрізняються тангенсом нахилу і перетинають вісь абсцис та вісь ординат в різних точках. Така залежність відповідає змішаному типу інгібування Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-ази ПМ лімфоцитів крові в умовах розвитку РА. Подібна концентраційна залежність і характер лінеаризації характерні також для Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-ази мембран ЕПР (графік не наведено). Шляхом лінеаризації одержаних даних у координатах Лайнуївера–Берка визначено основні кінетичні параметри Ca^{2+} -активованого, Mg^{2+} -залежного гідролізу АТР лімфоцитами крові здорових донорів і хворих із ревматичними розладами (табл. 1).

Як випливає з табл. 1, значення V_{\max} для Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-ази ПМ дещо перевищує це значення для Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-ази мембран ЕПР. Водночас, значення K_{ATP} вірогідно не відрізняються між собою, що свідчить

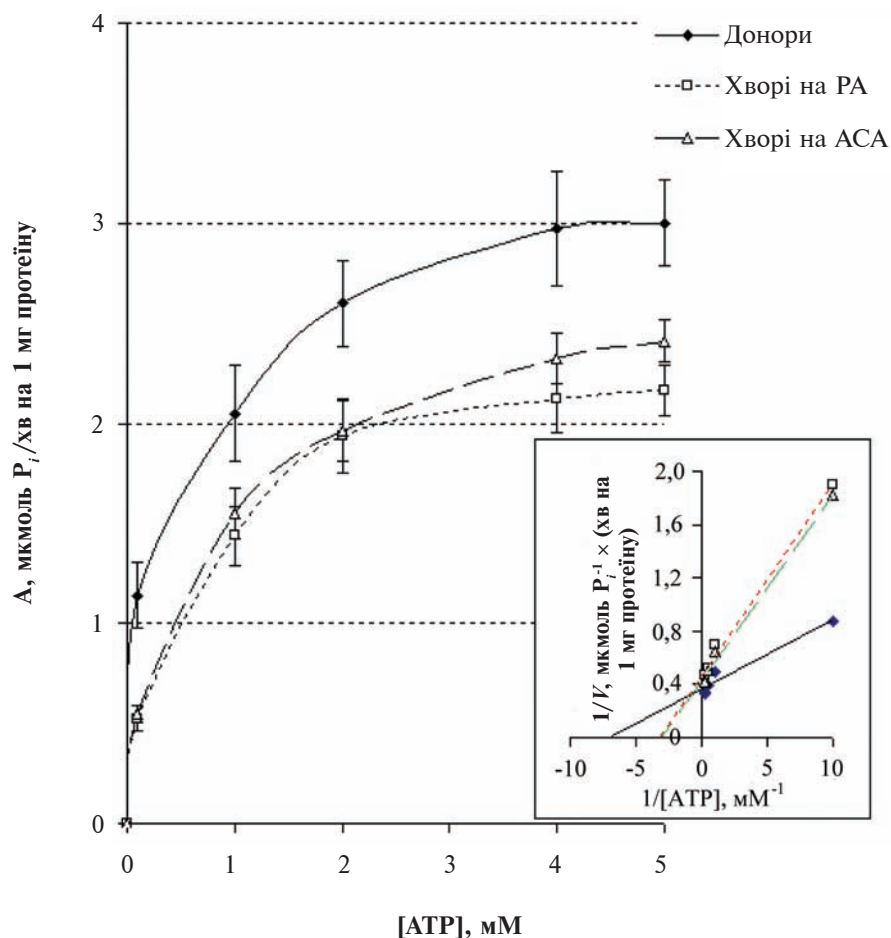


Рис. 2. Концентраційна залежність впливу АТР на активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-ази ПМ лімфоцитів крові здорових донорів і хворих на РА та АСА і лінеаризація цих концентраційних кривих у координатах Лайнуївера–Берка, ($n = 6-8$; $r > 0,9$; $F < 0,005$)

Таблиця 1. Кінетичні параметри Ca^{2+} -активованого, Mg^{2+} -залежного гідролізу АТР лімфоцитами крові здорових донорів і хворих на РА та АСА від концентрації АТР ($M \pm m$, $n = 6-8$)

| Кінетичні параметри | Здорові донори | Хворі на | |
|---|-----------------|---------------------|---------------------|
| | | РА | АСА |
| PMCA | | | |
| V_{\max} , мкмоль P_i / хв на 1 мг протеїну | $2,79 \pm 0,22$ | $2,15 \pm 0,17$ * | $2,32 \pm 0,13$ |
| $K_{\text{АТР}}$, мМ | $0,15 \pm 0,02$ | $0,31 \pm 0,03$ *** | $0,32 \pm 0,01$ *** |
| SERCA | | | |
| V_{\max} , мкмоль P_i / хв на 1 мг протеїну | $2,16 \pm 0,21$ | $1,69 \pm 0,15$ | $1,78 \pm 0,12$ |
| $K_{\text{АТР}}$, мМ | $0,13 \pm 0,08$ | $0,29 \pm 0,03$ *** | $0,29 \pm 0,03$ *** |

V_{\max} – максимальна активність ензиму визначена за АТР; $K_{\text{АТР}}$ – уявна константа спорідненості до АТР. Зміни вірогідні стосовно величин, одержаних на лімфоцитах в осіб групи контролю: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

про однакову спорідненість обох ензиматичних систем до субстрату. Схожі результати одержано дослідниками на секреторних клітинах [17]. Величини $K_{\text{АТР}}$ знаходяться в субмілімолярному діапазоні концентрацій, що відповідає фізіологічній концентрації Mg-АТР у цитоплазмі клітин.

V_{max} гідролізу АТР Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-азою лімфоцитів крові здорових донорів і хворих на РА та АСА, визначена за АТР, дещо відрізняються в нормі та за патології. Водночас $K_{\text{АТР}}$ Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-ази в лімфоцитах крові хворих на РА та АСА вдвічі перевищує її значення порівняно із лімфоцитами практично здорових донорів.

Отже, під час інтерпретації одержаних кінетичних параметрів, визначених за АТР, показано, що в умовах розвитку ревматичної патології в імунікомпетентних клітинах інгібування активності досліджуваних ензиматичних систем відбувається за змішаним типом — як за рахунок зменшення числа обертів ензиму, так і за рахунок зниження спорідненості Ca^{2+} -АТР-аз до субстрату.

Лімфоцити потребують постійного і адекватного енергозабезпечення, основним джерелом якого є АТР. Встановлено, що недостатній базальний рівень аденозину та/і патогеніндуковані порушення пуринового гомеостазу в лімфоцитах відіграють важливу роль у прогресуванні запальної відповіді. Це сприяє подальшому персистуванню інфікуючого агента в лімфоцитах та розвитку артриту. Показано, що в лімфоцитах пацієнтів з РА має місце зниження рівня ди- та тринуклеотидфосфатів і зростання рівня АМР [18, 19]. Можливо, такі зміни у перерозподілі макроергів у лімфоцитах ведуть до змін спорідненості АТР-гідролізних систем до АТР. Водночас відомо, що під час запалення або дії цитотоксичних факторів у позаклітинному оточенні можуть створюватися високі локальні концентрації АТР [20, 21]. Такі зміни концентрацій АТР у позаклітинному просторі ймовірно також опосередковано впливають на зміни спорідненості Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-ази до АТР.

Кінетичний аналіз активності Ca^{2+} , Mg^{2+} -залежного гідролізу АТР лімфоцитами крові від концентрації Ca^{2+} . Оскільки Ca^{2+} є субстратом перенесення і запускають Са-транспортувальну реакцію, очевидно, що зміни концентрації Ca^{2+} в інкубаційному середовищі впливають на швидкість АТР-гідролізної реакції. Важливою характеристикою Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-аз, яка визначає залежність активності ензиму від концентрації Ca^{2+} в середовищі інкубації

є величина уявної константи активації Ca^{2+} ($K_{\text{Ca}^{2+}}$). Її розраховували шляхом визначення питомої Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-азної активності в середовищі інкубації, яке містило Ca^{2+} в діапазоні концентрацій від 0,001 до 0,1 мМ (за сталої концентрації АТР — 4 мМ і Mg^{2+} — 5 мМ).

Підвищення концентрації Ca^{2+} в середовищі інкубації в діапазоні концентрацій від 0,001 до 0,1 мМ веде до поступового підвищення ензиматичної активності Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-ази ПМ і мембран ЕПР з виходом на плато при концентрації Ca^{2+} 0,05 мМ (рис. 3).

Схожа концентраційна залежність впливу Ca^{2+} на активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-ази ПМ і мембран ЕПР характерна для лімфоцитів крові хворих на РА та АСА. Шляхом лінеаризації одержаних даних у координатах Лайнуївера—Берка визначено основні кінетичні параметри Ca^{2+} -активованого, Mg^{2+} -залежного гідролізу АТР лімфоцитами крові здорових донорів і хворих на РА та АСА (табл. 2).

Як видно з даних, наведених у табл. 2, значення $K_{\text{Ca}^{2+}}$ для обох Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-аз вірогідно не відрізняються між собою, що свідчить про однакову спорідненість цих ензиматичних систем до субстрату транспортування. Значення V_{max} для Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-ази ПМ на небагато вище, ніж для Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-ази мембран ЕПР, що вказує на те, що транспортування кальцію Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-азою ПМ характеризується дещо вищою буферною ємністю.

V_{max} гідролізу АТР лімфоцитами крові хворих на РА та АСА, визначена за Ca^{2+} дещо перевищує цю величину у здорових донорів, проте ці зміни є недостовірними. Водночас $K_{\text{Ca}^{2+}}$ для Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-ази ПМ лімфоцитів крові хворих на РА та АСА відповідно у 3,2 і 4,2 раза вища порівняно з практично здоровими донорами. Для Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-ази мембран ЕПР лімфоцитів хворих на РА та АСА величина $K_{\text{Ca}^{2+}}$ в 1,75 раза вища, ніж для здорових донорів. Зростання величини $K_{\text{Ca}^{2+}}$ в умовах ревматичної патології свідчить про зниження спорідненості Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-ази до іонів кальцію.

Отже, за інтерпретації одержаних кінетичних параметрів, визначених за Ca^{2+} , з'ясовано, що в умовах розвитку ревматичної патології в імунікомпетентних клітинах інгібування активності досліджуваних ензиматичних систем відбувається також за рахунок зниження спорідненості Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-аз до субстрату транспортування. Причому зниження спорідненості Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-ази ПМ до

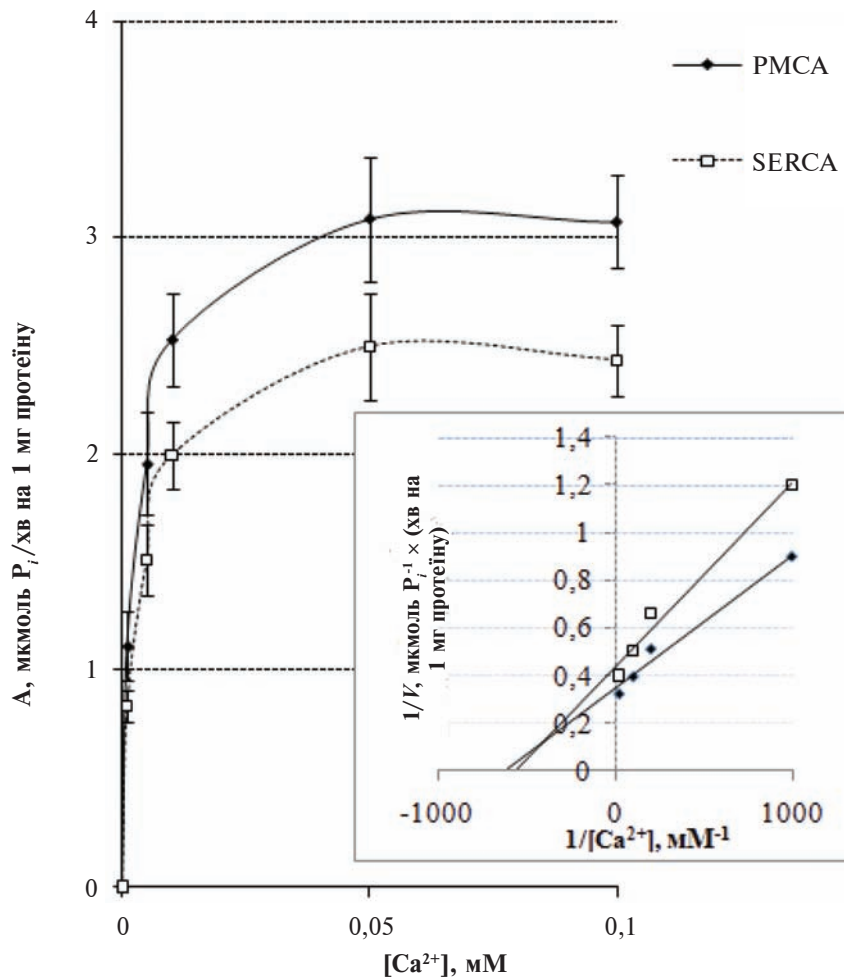


Рис. 3. Концентраційна залежність впливу Ca^{2+} на активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-ази ПМ (PMCA) і мембран ЕПР (SERCA) лімфоцитів крові здорових донорів та лінеаризація цих концентраційних кривих у координатах Лайнуївера–Берка, ($n = 6-8$; $r > 0,95$; $F < 0,002$)

Ca^{2+} є вираженішим, ніж для Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-ази мембран ЕПР лімфоцитів.

Відомо, що ефективне виведення Ca^{2+} з цитоплазми лімфоцитів за участю Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-ази починається за збільшення концентрації Ca^{2+} вище критичного рівня. Показано [22], що значення цього критичного рівня Ca^{2+} в лімфоцитах крові хворих на первинну артеріальну гіпертензію є вищим у 2 рази, ніж у здорових осіб. Можливо, що механізми, які лежать в основі цих змін при ревматичній і артеріальній патологіях є спільними.

Кінетичний аналіз активності Ca^{2+} , Mg^{2+} -залежного гідролізу АТР лімфоцитами крові від концентрації Mg^{2+} . Крім АТР, для функціонування Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-ази необхідними є іони магнію, які утворюють хелатний комплекс $\text{Mg}\cdot\text{АТР}$. Важливою характеристикою Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-аз, яка визначає

залежність активності ензиму від концентрації Mg^{2+} в середовищі інкубації є величина уявної константи активації Mg^{2+} $K_{\text{Mg}^{2+}}$. Її розраховували шляхом визначення питомої Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-азної активності в середовищі інкубації, яке містило Mg^{2+} в діапазоні концентрацій від 0 до 7 мМ (за сталої концентрації АТР – 4 мМ та Ca^{2+} – 0,05 мМ).

На рис. 4 наведено залежність активності Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-ази лімфоцитів крові здорових донорів від вмісту іонів Mg^{2+} в інкубаційному середовищі.

Певний рівень Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-азної активності тестується за відсутності в інкубаційному середовищі MgCl_2 . Це пов'язано з тим, що Ca^{2+} може з високою ефективністю заміщати Mg^{2+} у «базальній» АТР-гідролазній реакції [23]. Максимальне значення активності Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-ази спостерігається за концентрації 5 мМ MgCl_2 . Графіки залежності

Таблиця 2. Кінетичні параметри Ca^{2+} -активованого, Mg^{2+} -залежного гідролізу АТР лімфоцитами крові здорових донорів та хворих на РА та АСА від концентрації Ca^{2+} ($M \pm m$, $n = 6-8$)

| Кінетичні параметри | Здорові донори | Хворі на | |
|---|-----------------|-----------------------|-----------------------|
| | | РА | АСА |
| | | PMCA | |
| V_{\max} , мкмоль P_i /хв на 1 мг протеїну | $2,88 \pm 0,13$ | $3,56 \pm 0,40$ | $3,50 \pm 0,32$ |
| $K_{\text{Ca}^{2+}}$, мкМ | $1,73 \pm 0,38$ | $5,77 \pm 0,90^{***}$ | $7,42 \pm 1,47^{***}$ |
| | | SERCA | |
| V_{\max} , мкмоль P_i /хв на 1 мг протеїну | $2,30 \pm 0,23$ | $2,58 \pm 0,19$ | $2,71 \pm 0,10$ |
| $K_{\text{Ca}^{2+}}$, мкМ | $1,78 \pm 0,17$ | $3,10 \pm 0,44^{***}$ | $3,13 \pm 0,51^{***}$ |

V_{\max} – максимальна активність ензиму, визначена за Ca^{2+} ; $K_{\text{Ca}^{2+}}$ – уявна константа активації Ca^{2+} . Зміни вірогідні стосовно величин у лімфоцитах в осіб групи контролю * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$

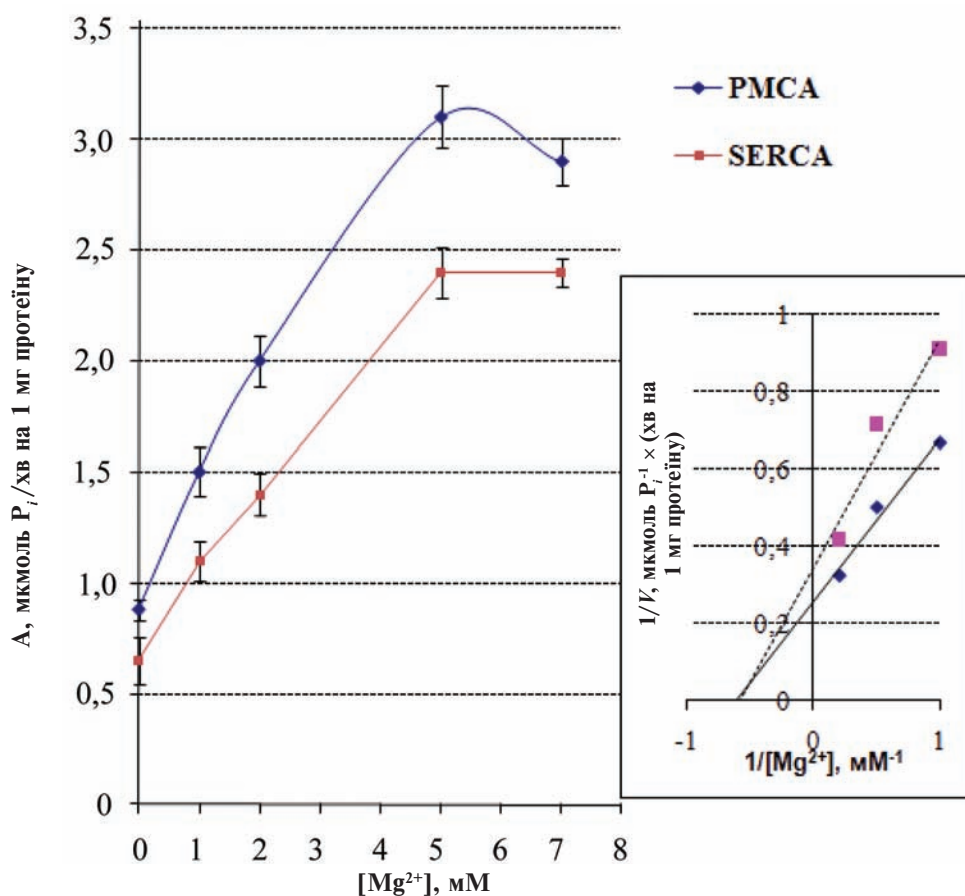


Рис. 4. Концентраційна залежність впливу Mg^{2+} на сумарну АТР-азну активність лімфоцитів крові здорових донорів у присутності тапсигаргіну та лінеаризація концентраційних кривих у координатах Лайнуївера–Берка, ($n = 6-8$; $r > 0,9$; $F < 0,005$)

Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-азної активності лімфоцитів крові хворих на РА та АСА від концентрації Mg^{2+} мають схожий вигляд.

Одержані дані щодо залежності Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-азної активності лімфоцитів крові здорових донорів і хворих на РА та АСА від

Таблиця 3. Кінетичні параметри Ca^{2+} -активованого, Mg^{2+} -залежного гідролізу АТР лімфоцитами крові здорових донорів і хворих на РА та АСА за різних концентрацій Mg^{2+} ($M \pm m$, $n = 6-8$)

| Кінетичні параметри | Здорові донори | Хворі на | |
|---|-----------------|-----------------|-----------------|
| | | РА | АСА |
| | | PMCA | |
| V_{\max} , мкмоль P_i / хв на 1 мг протеїну | $3,72 \pm 0,10$ | $3,75 \pm 0,20$ | $3,70 \pm 0,36$ |
| $K_{\text{Mg}^{2+}}$, мМ | $1,52 \pm 0,12$ | $1,43 \pm 0,12$ | $1,35 \pm 0,18$ |
| | | SERCA | |
| V_{\max} , мкмоль P_i / хв на 1 мг протеїну | $2,92 \pm 0,22$ | $2,76 \pm 0,17$ | $2,9 \pm 0,2$ |
| $K_{\text{Mg}^{2+}}$, мМ | $1,7 \pm 0,3$ | $1,43 \pm 0,15$ | $1,55 \pm 0,22$ |

V_{\max} – максимальна активність ензиму, визначена за Mg^{2+} ; $K_{\text{Mg}^{2+}}$ – уявна константа активації іонами Mg^{2+} . Зміни величин показників у лімфоцитах не є статистично вірогідними відносно таких в осіб групи контролю.

концентрації Mg^{2+} у висхідній частині кривих лінеаризовано в координатах Лайнуївера–Берка (рис. 4). Розрахунок кінетичних характеристик Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-ази лімфоцитів крові здорових донорів свідчить, що $K_{\text{Mg}^{2+}}$ для обох Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-аз вірогідно не відрізняються, що можна пояснити однаковою спорідненістю цих ензиматичних систем до Mg^{2+} (табл. 3). Значення V_{\max} для Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-ази ПМ дещо вище, ніж для Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-ази мембран ЕПР, що підтверджує наше припущення щодо транспортування іонів кальцію Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-азою ПМ лімфоцитів здорових донорів. Воно характеризується дещо вищою буферною ємністю, ніж така для Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-ази мембран ЕПР. $K_{\text{Mg}^{2+}}$ і V_{\max} АТР-гідролаз лімфоцитів хворих на РА та АСА істотно не відрізняються від цих величин у практично здорових донорів. Це свідчить про те, що при ревматичній патології Mg^{2+} -зв'язувальна ділянка Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-ази лімфоцитів залишається нативною.

Одержані нами експериментальні дані вказують на можливі механізми Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-азної дисфункції, які полягають у зниженні спорідненості ензиму до АТР і Ca^{2+} та зменшенні числа обертів ензиму, і можуть бути використані для подальшого з'ясування мембранних та молекулярних механізмів підтримання Ca^{2+} -гомеостазу в імункомпетентних клітинах при автоімунних захворюваннях.

ХАРАКТЕРИСТИКА Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-аз ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ РЕВМАТИЧЕСКОЙ ПАТОЛОГИЕЙ

*Р. В. Фафула, У. П. Ефремова,
З. Д. Воробец*

Львовский национальный медицинский университет имени Данила Галицкого, Украина;
e-mail: roman_fafula@ukr.net,
vorobets@meduniv.lviv.ua

Проведен анализ кинетических свойств Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-азы сапонин-перфорированных лимфоцитов периферической крови здоровых доноров и больных ревматоидным артритом и анкилозирующим спондилоартритом. Исходя из изменений гидролазной активности Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-азы установлено, что средство Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-азы плазматической мембраны и мембран ЭПР к АТР достоверно не различаются между собой. Показано, что в условиях развития ревматической патологии в иммунокомпетентных клетках ингибирование активности исследуемых энзиматических систем происходит по смешанному типу – как за счет уменьшения числа оборотов энзима, так и за счет снижения средства Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-азы к АТР. Доказано, что в лимфоцитах лиц с ревматической патологией Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-аза характеризуется достоверно более низким средством к субстрату транспорта, чем у здоровых доноров.

Ключевые слова: Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-аза, лимфоциты, ревматоидный артрит, анкилозирующий спондилоартрит.

CHARACTERISTICS OF Ca²⁺, Mg²⁺-ATPases OF PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES OF PATIENTS WITH RHEUMATIC PATHOLOGY

R. V. Fafula, U. P. Efremova, Z. D. Vorobets

Danylo Halytski Lviv National Medical University, Ukraine;
e-mail: roman_fafula@ukr.net,
vorobets@meduniv.lviv.ua

S u m m a r y

The analysis of the kinetic properties of Ca²⁺, Mg²⁺-ATPase of saponin-perforated peripheral blood lymphocytes of donors and patients with rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis was carried out. When analyzing the alterations in hydrolase activity of Ca²⁺, Mg²⁺-ATPase it was shown that affinity of Ca²⁺, Mg²⁺-ATPase of plasma membrane and membranes of endoplasmic reticulum for ATP do not significantly differ. It was found that the inhibition of examined enzyme systems occurs by mixed type both due to the reduction of maximum reaction rate and to the decrease of Ca²⁺, Mg²⁺-ATPase affinity for ATP in conditions of rheumatic pathology in the immunocompetent cells. It was identified that Ca²⁺, Mg²⁺-ATPase had significantly lower affinity for Ca²⁺ in lymphocytes of persons with rheumatic disorders than in donors.

Key words: Ca²⁺, Mg²⁺-ATPase, lymphocytes, rheumatoid arthritis, ankylosing spondylitis.

1. Revankar C. M., Advani S. H., Naik N. R. // *Mol. Cancer*. – 2006. – **275**. – P. 55–65.
2. Dolmetsch R. E., Lewis R. S., Goodnow C. C. et al. // *Nature*. – 1997. – **386**. – P. 855–858.
3. Feske S., Gwack Y., Prakria M. et al. // *Nature*. – 2006. – **441**. – P. 179–185.
4. Gwack Y., Feske S., Srikanth S. et al. // *Cell Calcium*. – 2007. – **42**. – P. 145–156.
5. Guse A. H. // *Crit. Rev. Immunol.* – 1998. – **18**. – P. 419–448.
6. Коваленко В. М., Гавриленко Т. І., Рижкова Н. О. та ін. // *Укр. ревм. журн.* – 2008. – **4**, № 34. – С. 42–49.
7. Nagy G., Clark J. M., Buzas E. et al. // *Immunol. Lett.* – 2008. – **118**, N 1. – P. 55–58.
8. Фафула Р. В., Личковська Н. Е., Єфремова У. П. та ін. // *Медична хімія*. – 2011. – **13**, № 4(49). – С. 69–72.
9. Selvam R., Ganesan K., Narayana Raju K. V. et al. // *Life Sci.* – 2007. – **80**, N 26. – P. 2403–2410.
10. Boyum A. // *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* – 1968. – **21** (Supp. 97). – P. 77–79.
11. Mishell B. B., Shiigi S. M. *Selected Methods in Cellular Immunology* // San Francisco: W. H. Freeman and Company, 1980. – 486 p.
12. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. et al. // *J. Biol. Chem.* – 1951. – **193**. – P. 265–275.
13. Підковка Н. О., Воробець З. Д., Зіменковський А. Б. // *Експерим. та клін. фізіологія і біохімія*. – 2002. – **7**, № 1. – С. 38–41.
14. Flynn E. R., Bradley K. N., Muir T. C. et al. // *J. Biol. Chemistry*. – 2001. – **276**, N 39. – P. 36411–36418.
15. Rathbun W., Betlach V. // *Anal. Biochem.* – 1969. – **28**. – P. 436–447.
16. Келети Т. / *Основы ферментативной кинетики: Пер. с англ.* – М: Мир, 1990. – 350 с.
17. Вац Ю. О., Клевець М. Ю., Федірко Н. В. // *Укр. біохім. журн.* – 2004. – **76**, № 6. – С. 44–54.
18. Yegutkin G. G., Hytönen J., Samburski S. S. et al. // *J. Immunol.* – 2010. – **184**, N 9. – P. 5112–5120.
19. Marinello E., Carlucci F., Tabucchi A. // *Int. J. Clin. Pharmacol. Res.* – 1994. – **14**, N 2. – P. 57–63.
20. Di Virgillio // *Immunol. Today* – 1995. – **16**. – P. 254–528.
21. Bodin P., Burlstock G. // *Neurochem. Res.* – 2001. – **26**, N 15. – P. 959–969.
22. Беликова Н. А. Активность Ca²⁺-АТФ-азы плазматических мембран лимфоцитов больных первичной артериальной гипертензией. Дис.... канд. биол. наук – Москва, 2003. – 147 с.
23. Данилович Г. В., Костерін С. О. // *Укр. біохім. журн.* – 2001. – **73**, № 6. – С. 30–40.

Отримано 03.08.2012