

Р. В. Фафула, Н. Е. Личковська, У. П. Єфремова, З. Д. Воробець
Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького

ЕНЗИМАТИЧНА АКТИВНІСТЬ Ca^{2+} -ТРАНСПОРТУВАЛЬНОЇ, Mg^{2+} -ЗАЛЕЖНОЇ АТФази ЛІМФОЦИТІВ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ У ХВОРИХ НА РЕВМАТОЇДНИЙ АРТРИТ

Виявлено достовірне зниження ензиматичної активності Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФази плазматичної мембрани й ендоплазматичного ретикулума у лімфоцитах периферичної крові хворих на ревматоїдний артрит порівняно з практично здоровими донорами. Показано динаміку змін активності досліджуваних ензимів після проведеного лікування хворих у стаціонарі.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФаза, SERCA, PMCA, ревматоїдний артрит, лімфоцити.

ВСТУП. Протягом останніх років спостерігається підвищена увага вчених до проблеми ревматичних захворювань, які являють собою гетерогенну групу захворювань, що об'єднані тенденцією до хронічного прогресуючого перебігу, негативним впливом на якість життя та високою вірогідністю інвалідизації [7, 9]. Ревматоїдний артрит (РА) займає головне місце серед захворювань суглобів, які призводять до тяжкої інвалідності осіб працездатного віку. Його поширеність у популяції складає 0,6–1,3 %, наростає з віком та частіше зустрічається серед осіб жіночої статі. Згідно із сучасними уявленнями, значна роль у розвитку і перебігу РА належить CD^{3+} -Т-лімфоцитам. Тому актуальними є питання, які стосуються саме імунопатології ревматичних захворювань, механізмів виникнення і розвитку захворювання.

На сучасному етапі розвитку біологічної науки функціональне значення і роль іонів кальцію у процесах життєдіяльності клітин не викликають сумніву. Відомо, що Ca^{2+} є цитоплазматичним сигнальним посередником (внутрішньоклітинним месенджером), який передає інформацію від спеціалізованих структур плазматичної мембрани до внутрішньоклітинних структур і прямо чи опосередковано регулює практично всі клітинні функції. Контроль за динамікою змін концентрації вільного Ca^{2+} у цитоплазмі зумовлений супер-

© Р. В. Фафула, Н. Е. Личковська, У. П. Єфремова, З. Д. Воробець, 2011.

позицією функціонування систем пасивного або енергонезалежного (кальцієві канали) та активного або енергозалежного (кальцієві помпи й обмінники) транспортування цього катіона, що локалізовані у різних субклітинних мембранних структурах [5, 6, 17].

Враховуючи вищенаведене, метою даної роботи було оцінити зміни ензиматичної активності Ca^{2+} -транспортувальної, Mg^{2+} -залежної АТФази на моделі пермеабілізованих сапоніном лімфоцитів периферичної крові у хворих на РА.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Дослідження проводили у хворих, які перебували на стаціонарному лікуванні у ревматичному відділенні Львівської ОКЛ. Групу контролю становили практично (клінічно) здорові донори віком 20–30 років.

Моноядерні лімфоцити периферичної крові людини виділяли з гепаринізованої свіжоотриманої крові хворих і донорів у градієнті концентрації фікол-тріумбасту ($\rho=1,08$ г/см³) [12]. Цілісність і життєздатність лімфоцитів, які в усіх дослідах становили не менше 95 %, оцінювали за забарвленням трипановим синім [16].

Визначення Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазної ензиматичної активності лімфоцитів проводили при 37 °С у середовищі інкубації такого складу (мМ): 150 КСl, 0,05 $CaCl_2$, 5 $MgCl_2$, 5 АТФ, 1 NaN_3 (інгібітор мітохондріальної АТФази), 1 оубаїн (інгібітор Na^+ , K^+ -АТФази), 20 Непер-Трис-буфер (рН=7,4), 0,2 % сапонін. Ензиматичну реакцію

ініціювали шляхом внесення до інкубаційного середовища аліквоти лімфоцитарної суміші. Вміст білка у лімфоцитарній суміші визначали методом Лоурі [18]; кількість білка у пробі не перевищувала 100 мкг/мл. Тривалість інкубації – 10 хв. Реакцію зупиняли, додавши 1 мл охолодженого стоп-розчину такого складу: 1,5 М натрій ацетат, 3,7 % формальдегід, 14 % етанол, 5 % ТХО.

Питому активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФаз лімфоцитів оцінювали як різницю між активністю АТФазних систем у Ca^{2+} -вмісному та безкальцієвому середовищах і виражали в мкмоль P_i у перерахунку за 1 хв на 1 мг білка, вивільненого в процесі АТФ-гідролазної реакції. Кількість P_i , що виділився в процесі ензиматичної реакції, визначали за методом W. Rathbun, V. Betlach [19]. При цьому розрахунки проводили з урахуванням поправки на вміст ендogenous P_i в лімфоцитарній суміші й P_i , вивільненого у процесі неензиматичного гідролізу АТФ. З метою розділення сумарної Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазної активності на складові – тапсигаргіннечутливу Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазу ПМ (PMCA) та тапсигаргінчутливу Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазу мембрани ЕПР (SERCA) – до стандартного Ca^{2+} - та Mg^{2+} -вмісного середовища інкубації додавали інгібітор Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФази ендоплазматичного ретикулула – тапсигаргін (0,1 мМ) [2].

Варіаційно-статистичне опрацювання отриманих результатів проводили з використанням t-критерію Стюдента за допомогою комп'ютерної програми "Microsoft Excel 2003".

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. У плазматичній мембрані лімфоцитів ідентифіковано Na^+ , K^+ -АТФазу, Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазу [4, 8, 14] ензиматичні системи. У наших попередніх дослідженнях [10] показано достовірне зниження оубайнчутливої Na^+ , K^+ -АТФазної активності на 69,72 % в лімфоцитах периферичної крові хворих на ревматичні захворювання порівняно з практично здоровими донорами.

У результаті проведених досліджень встановлено, що Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазна активність ПМ і ЕПР лімфоцитів периферичної крові у практично здорових осіб становила, відповідно, $(3,06 \pm 0,42)$ і $(2,34 \pm 0,2)$ мкмоль P_i /хв·мг білка ($n=15$). У хворих на РА ($n=14$) Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазна активність ПМ і ЕПР лімфоцитів периферичної крові істотно відрізнялась від такої в контрольній групі й складала $(1,72 \pm 0,08)$ і $(1,53 \pm 0,1)$ мкмоль P_i /хв·мг білка відповідно (рис. 1). Застосовуючи методи математичної статистики, можна стверджувати, що мало місце достовірне зменшення Ca^{2+} , Mg^{2+} -

АТФазної активності лімфоцитів периферичної крові у хворих на РА. Зокрема, відмічено зниження активності PMCA в 1,8 раза, а SERCA – в 1,5 раза.

Зниження Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазної активності ПМ і ЕПР лімфоцитів периферичної крові свідчить про зростання $[\text{Ca}^{2+}]_i$ у цитозолі лімфоцитів. Порушення ензиматичної активності Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФази лімфоцитів відображають зміни їх функціональної активності, які можуть бути зумовлені певними впливами на мембранозв'язаний ензим зі сторони інших патологічних змін і процесів у цих клітинах, а також може опосередковуватись через інші регуляторні механізми клітини (наприклад NO).

Виявлено підвищення рівня АТФазної активності лімфоцитів у хворих на онкологічні захворювання [13]. Показано [1], що у хворих на первинну артеріальну гіпертензію запуск роботи Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФази плазматичних мембран лімфоцитів здійснюється при більшому значенні концентрації Ca^{2+} в цитоплазмі порівняно зі здоровими донорами. При цьому максимальна швидкість роботи ферменту не змінюється. Показано [15], що мають місце інгібування ензиматичної активності Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФази ПМ та зростання $[\text{Ca}^{2+}]_i$ у лімфоцитах крові щурів з модельованим артритом. Виявлено значне зростання базового рівня $[\text{Ca}^{2+}]_i$ та зниження активності Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФази ПМ лімфоцитів у хворих на цукровий діабет 2-го типу [11].

Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазну активність лімфоцитів периферичної крові у хворих на РА визначали повторно після проведення лікування у стаціонарі. Спостерігалось зростання ензиматичної активності Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФази лімфоцитів периферичної крові в пацієнтів з РА (рис. 2). Так, значення Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазної активності ПМ і ЕПР лімфоцитів периферичної крові у

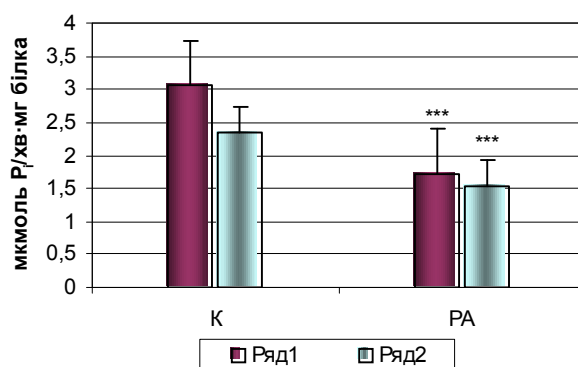


Рис. 1. Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазна активність ПМ (Ряд 1) і ЕПР (Ряд 2) лімфоцитів периферичної крові у хворих на РА, мкмоль P_i /хв·мг білка ($M \pm m$, $n=14$).

Примітка. *** – $p < 0,005$ стосовно величин у лімфоцитах осіб групи контролю К ($M \pm m$, $n=15$).

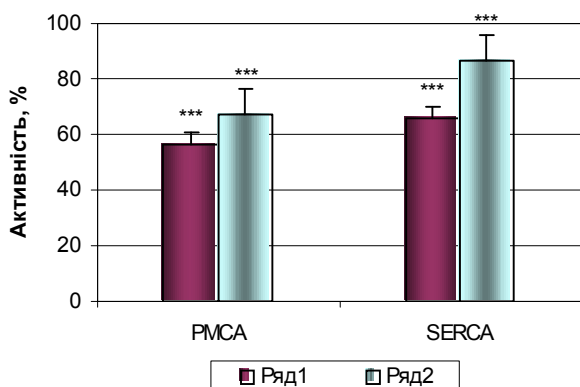


Рис. 2. PMCA і SERCA лімфоцитів периферичної крові у хворих на РА на момент госпіталізації в стаціонар (Ряд 1) і після проведеного лікування у стаціонарі (Ряд 2), %.

Примітка. За 100 % взято значення PMCA і SERCA в осіб групи контролю; *** – $p < 0,005$ стосовно величин у лімфоцитах осіб групи контролю.

хворих на РА після проведеного стаціонарного лікування становили $(2,04 \pm 0,13)$ і $(2,02 \pm 0,18)$ мкмоль P_i /хв-мг білка відповідно. Таким чином, можна зробити припущення, що зростання Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазної активності ПМ і ЕПР лімфоцитів і наближення її до контрольних значень свідчать про незначне відновлення у функціонуванні імунокомпетентних клітин після проведеного лікування хворих у стаціонарі.

Отримані експериментальні дані узгоджуються з результатами, отриманими дослідниками раніше [3]. Виявлено зниження активності Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФази ПМ і ЕПР лімфоцитів периферичної крові у хворих з еректильною дисфункцією різного генезу. Після проведеного комплексного лікування хворих з еректильною дисфункцією спостерігались зростання всіх АТФазних активностей і наближення їх до контрольних значень.

ВИСНОВКИ. 1. Виявлено достовірне зниження Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазної активності лімфоцитів периферичної крові у хворих на РА порівняно з практично здоровими донорами, що свідчить про зростання концентрації іонізованого кальцію в цитозолі.

2. Зниження ензиматичної активності PMCA у хворих на РА має більш виражений характер, ніж у випадку SERCA.

3. Показано динаміку змін ензиматичної активності Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФази лімфоцитів після проведеного лікування у стаціонарі. Спостерігаються зростання активності досліджуваного ензиму і наближення значень його питомої активності до контрольних, що може свідчити про незначне відновлення функціональної активності імунокомпетентних клітин до нормального фізіологічного стану.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Беликова Н. А. Активність Ca^{2+} -АТФ-азы плазматических мембран лимфоцитов больных первичной артериальной гипертензией : дис. ... канд. биол. наук : 03.00.02 / Беликова Н. А. – М., 2003. – 147 с.
- Вац Ю. О. Кінетичні характеристики Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФази клітин підщелепної залози щурів / Ю. О. Вац, М. Ю. Клевець, Н. В. Федірко // Укр. біохім. журн. – 2004. – **76**, № 6. – С. 44–54.
- Воробець Д. З. Активність іон-транспортувальних систем лімфоцитів периферичної крові у чоловіків з еректильною дисфункцією та можливість її корекції / Д. З. Воробець // Експерим. та клін. фізіол. і біохім. – 2011. – № 1. – С. 36–42.
- Кімакович О. В. Дія квамателу та пірензепіну на активність транспортних АТФаз лімфоцитів периферичної крові / О. В. Кімакович, Н. О. Підковка, З. Д. Воробець // Практична медицина. – 2004. – **10**, № 2. – С. 86–89.
- Костерін С. О. Системи активного транспорту йонів Ca^{2+} в гладеньких м'язах / С. О. Костерін // IV з'їзд Українського біофізичного товариства : тези доп. – Донецьк : ДонНУ, 2006. – С. 24–25.
- Костюк П. Г. Біофізика кальцієвої сигналізації / П. Г. Костюк // IV з'їзд Українського біофізичного товариства : тези доп. – Донецьк : ДонНУ, 2006. – С. 25–26.
- Нейко Є. М. Ревматоїдний артрит: сучасний погляд на проблему / Є. М. Нейко, Р. І. Яцишин, О. В. Штефюк // Укр. ревматол. журн. – 2009. – **36**, № 2. – С. 35–39.
- Підковка Н. О. Дослідження деяких властивостей АТФаз у лімфоцитах крові людини / Н. О. Підковка, З. Д. Воробець, А. Б. Зіменковський // Експерим. та клін. фізіол. і біохім. – 2002. – **7**, № 1. – С. 38–41.
- Ревматичні хвороби в Україні: сучасний стан проблеми і надання медичної допомоги та шляхи покращення / В. М. Коваленко, В. М. Корнацький, Н. М. Шуба, О. П. Борткевич. – К., 2002. – 42 с.
- A study of Na, K -ATPase and arginase activity in peripheral blood lymphocytes in patients with rheumatic diseases / N. Lychkovska, R. Fafula, U. Efremova, Z. Vorobers // Annales universitatis Mariae Curie-Sklodowska Lublin-Polonia. – 2011. – **24**, № 1. – P. 171–177.

11. Balasubramanyam M. Evidence for mechanistic alterations of Ca^{2+} homeostasis in Type 2 diabetes mellitus / M. Balasubramanyam, R. A. Balaji, B. Subashini // *Int. J. Exp. Diabetes Res.* – 2001. – **1**, № 4. – P. 275–287.

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

13. Ellegaard J. ATPase activity of lymphocytes from normal individuals and patients with cancer / J. Ellegaard, N. Dimitrov // *Cancer J. Clinic.* – 2006. – **30**, № 4. – P. 881–884.

14. Lichtmant A. H. Calcium transport and calcium-ATPase activity in human lymphocyte plasma membrane vesicles / A. H. Lichtmant, G. B. Segelg, M. A. Lichtman // *J. Biol. Chem.* – 1981. – **256**. – P. 6148–6154.

15. Low frequency and low intensity pulsed electromagnetic field exerts its antiinflammatory effect

through restoration of plasma membrane calcium ATPase activity / R. Selvam, K. Ganesan, Narayana R. Raju [et al.] // *Life Sci.* – 2007. – **80**, № 26. – P. 2403–2410.

16. Mishell B. B. Selected Methods in Cellular Immunology / B. B. Mishell, S. M. Shiigi // San Francisco; W. H. Freeman and Company. – 1980. – 486 p.

17. Modulation of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ Signaling Dynamics and Metabolism by Perinuclear Mitochondria in Mouse Parotid Acinar Cells / J. I. Bruce, D. R. Giovannucci, G. Blinder [et al.] // *Biol. Chem.* – 2004. – **279**. – P. 12909–12917.

18. Protein measurement with the Folin phenol-reagent / Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1951. – **193**. – P. 265–275.

19. Rathbun W. Estimation of enzymically produced orthophosphate in the presence of cysteine and adenosine triphosphate / W. Rathbun, V. Betlach // *Anal. Biochem.* – 1969. – **28**. – P. 436–447.

Р. В. Фафула, Н. Э. Личковская, У. П. Ефремова, З. Д. Воробець
ЛЬВОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ ДАНИЛА ГАЛИЦКОГО

ЭНЗИМАТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ Ca^{2+} -ТРАНСПОРТИРУЮЩЕЙ, Mg^{2+} -ЗАВИСИМОЙ АТФазы ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ

Резюме

Обнаружено достоверное снижение энзиматической активности Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазы плазматической мембраны и эндоплазматического ретикулума в лимфоцитах периферической крови больных ревматоидным артритом по сравнению с практически здоровыми донорами. Показана динамика изменений активности исследуемых энзимов после проведенного лечения больных в стационаре.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФаза, SERCA, PMCA, ревматоидный артрит, лимфоциты.

R. V. Fafula, N. E. Lychkovska, U. P. Yefremova, Z. D. Vorobets
DANYLO HALYTSKYI LVIV NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY

ALTERATIONS OF Ca^{2+} -STIMULATED, Mg^{2+} -DEPENDENT ATPase ENZYME ACTIVITY IN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES IN PATIENTS WITH A RHEUMATOID ARTHRITIS

Summary

It was shown the significant decrease of Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase enzyme activity of lymphocyte plasma and endoplasmic reticulum membranes in patients with rheumatic arthritis in comparison to the practically healthy donors. The dynamics of studied enzyme activities is observed after patients' treatment.

KEY WORDS: Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase, SERCA, PMCA, rheumatoid arthritis, lymphocytes.

Отримано 07.10.11

Адреса для листування: З. Д. Воробець, вул. Донцова, 7, кв. 7а, Львів, Україна.