

КІНЕТИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ Na^+ , K^+ -АТФ-АЗИ ЛІМФОЦИТІВ КРОВІ У ХВОРИХ НА РЕВМАТОЇДНИЙ АРТРИТ ТА АНКІЛОЗИВНИЙ СПОНДИЛОАРТРИТ

Р. В. ФАФУЛА, У. П. ЄФРЕМОВА, Н. Е. ЛИЧКОВСЬКА, 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 убаїнчутливої Na^+ , K^+ -АТФ-ази сапонін-перфорованих лімфоцитів периферичної крові донорів та хворих на ревматоїдний артрит (РА) та анкілозивний спондилоартрит (АСА). За оцінкою змін гідролазної активності Na^+ , K^+ -АТФ-ази встановлено, що у лімфоцитах крові хворих на РА і АСА первинноактивне транспортування іонів Na^+ та K^+ відбувається менш інтенсивно у порівнянні з донорами, але має з ними майже однакову ємність. Константа спорідненості Na^+ , K^+ -АТФ-ази до АТФ у лімфоцитах крові хворих на РА і АСА перевищує її значення порівняно з донорами у 3,1 і 2,5 рази відповідно. Показано, що в умовах розвитку ревматичної патології в імунокomпетентних клітинах інгібування активності Na^+ , K^+ -АТФ-ази відбувається не за рахунок зменшення числа обертів ензиму, а за рахунок зниження спорідненості убаїнчутливої Na^+ , K^+ -АТФ-ази до АТФ. Водночас, Mg^{2+} -зв'язувальна ділянка убаїнчутливої Na^+ , K^+ -АТФ-ази лімфоцитів крові хворих на РА і АСА залишається нативною. Відзначено також, що константа спорідненості Na^+ , K^+ -АТФ-ази лімфоцитів крові хворих на РА і АСА до іонів Na^+ у 2,75 рази нижча її величини у донорів. Досліджено, що Na^+ , K^+ -АТФ-аза лімфоцитів крові хворих на РА і АСА зберігає свої нативні рецепторні властивості, а її чутливість до інгібування убаїном не змінюється.

Ключові слова: Na^+ , K^+ -АТФ-аза, лімфоцити, ревматоїдний артрит, анкілозивний спондилоартрит.

Ревматоїдний артрит (РА) є найрозповсюдженішим запальним аутоімунним захворюванням [1]. На сьогодні відсутні будь-які специфічні лабораторні тести, на основі яких можна встановити діагноз РА. Як і у разі інших аутоімунних захворювань діагноз базується на сукупності характерних клінічних симптомів, даних лабораторного обстеження та рентгенологічного дослідження [2].

Анкілозивний спондилоартрит (ідіопатичний анкілозивний спондилоартрит, хвороба Бехтерева) (АСА) – хронічне системне запальне захворювання сполучної тканини з переважним ураженням суглобів і зв'язок хребта, а також периферійних суглобів із схильністю до прогресуючого перебігу. У світі, зокрема в Україні, останніми роками спостерігається зростання показників розповсюдження АСА [3, 4].

Згідно із сучасними уявленнями, значна роль у розвитку і перебігу артритів належить CD3^+ -Т-лімфоцитам. Підвищення активності протеолітичних ензимів і простагландинів у разі активації моноцитів/макрофагів призводить до місцевого запалення та деструкції суглобового хряща і кістки [5]. Однак у межах цієї теорії досі не існує єдиної думки про значення

окремих патогенетичних ланок і прозапальних чинників у механізмах розвитку артритів. Як відомо, в основі РА та його системних проявів лежать імунологічні механізми, що реалізують свою дію на рівні мікроциркуляторного русла у вигляді інтенсивного накопичення імунних комплексів, імуноглобулінів та комплементу [6]. Це призводить до збільшення адгезії формених елементів крові із виділенням медіаторів запалення, які посилюють мікроциркуляторні порушення [7]. Тому актуальними є питання, які стосуються саме імунопатології ревматичних захворювань та механізмів їх виникнення і розвитку.

З огляду на це, метою роботи є дослідження кінетичних характеристик АТФ-гідролазної реакції за участю Na^+ , K^+ -АТФ-ази сапонін-перфорованих лімфоцитів крові донорів та хворих на РА і АСА.

Матеріали і методи

Дослідження проводили на лімфоцитах периферичної крові донорів та хворих на РА та АСА, коли вони поступали у ревматичне відділення Львівської обласної клінічної лікарні. Усіх хворих розділено на дві дослідні групи: хворі на РА ($n = 14$) і хворі на АСА

($n = 14$). Групу контролю становили практично (клінічно) здорові донори, репрезентативні за віком і статтю ($n = 15$).

Виділення лімфоцитів. Моноядерні лімфоцити крові людини виділяли з гепаринізованої крові хворих і донорів у градієнті густини фікол-триумбасту ($\rho = 1,08 \text{ г/см}^3$) [8]. Цілісність і життєздатність лімфоцитів, яка в усіх дослідах становила не менше 95%, оцінювали за забарвленням трипановим синім [9].

Для пермеабілізації мембран лімфоцитів крові та розкриття латентної Na^+ , K^+ -АТР-азної активності до суспензії лімфоцитів додавали сапонін. Ця методика ґрунтується на роботах, виконаних на лімфоцитах раніше [10]. Лімфоцити інкубували протягом 10 хв за помірного струшування в розчині, який містив сапонін у концентрації 0,2%. Вміст протеїну в лімфоцитарній суміші визначали методом Лоурі [11].

Визначення Na^+ , K^+ -АТР-ази. Визначення загальної АТР-азної ензиматичної активності лімфоцитів проводили при 37°C у середовищі інкубації (об'єм – 1 мл) такого складу (мМ): 120 NaCl , 30 KCl , 5 MgCl_2 , 1,5 АТР, 1 ЕГТА, 1 NaN_3 (інгібітор мітохондріальної АТР-ази), 20 Нерес-трис-буфер (рН 7,4), 0,1 мкМ тапсигаргін (селективний інгібітор Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-ази Е(С)ПР) [12]. Наявність Ca^{2+} -хелатора ЕГТА в середовищі інкубації забезпечувало зв'язування в ньому ендogenous Ca^{2+} . Реакцію ініціювали внесенням до інкубаційного середовища аліквоти лімфоцитарної суміші (100 мкл); кількість протеїну у пробі не перевищувала 50–100 мкг/мл, тривалість інкубації – 1–15 хв. Зупиняли реакцію додаванням 1 мл охолодженого стоп-розчину: 1,5 М натрій ацетату, 3,7% формальдегіду, 14% етанолу, 5% ТХО (рН = 4,3). Суспензію центрифугували (10 хв, 1600 г) і в одержаному супернатанті визначали вміст P_i . Кількість продукту реакції визначали за методом [15] і виражали у мкмоль $\text{P}_i/\text{хв}\cdot\text{мг}$ протеїну.

Базальну Mg^{2+} -АТР-азну активність лімфоцитів визначали в аналогічному середовищі інкубації, але у присутності 1 мМ убаїну – селективного інгібітора Na^+ , K^+ -АТР-ази [14, 15]. Убаїнчутливу Na^+ , K^+ -АТР-азну активність обчислювали за різницею між величиною загальної АТР-азної і базальної Mg^{2+} активності.

У дослідах на неензиматичний гідроліз АТР як контроль використовували стандартне середовище інкубації, яке не містило досліджуваної проби. Кількість ендogenous-

го P_i у лімфоцитарній суміші вимірювали проти контролю, яким слугувала суспензія лімфоцитів у фізіологічному розчині.

Кінетичний аналіз. Дослідження кінетичних властивостей Na^+ , K^+ -активованої, Mg^{2+} -залежної АТР-гідролазної реакції проводили у стандартному середовищі інкубації, що було модифіковане за фізико-хімічними характеристиками чи складом відповідних компонентів (час інкубації, кількість протеїну лімфоцитарної суміші у пробі, концентрації АТР, Na^+ (K^+), Mg^{2+} , убаїну). Усі експерименти з вивчення властивостей Na^+ , K^+ -АТР-азної реакції проводили в режимі початкової швидкості V_0 (лінійність накопичення P_i у часі).

Залежність активності Na^+ , K^+ -АТР-ази від вмісту протеїну в лімфоцитарній суміші вивчали в діапазоні концентрацій від 25 до 200 мкг протеїну/мл.

Уявні кінетичні параметри, які характеризують реакцію вивільнення P_i під час Na^+ , K^+ -активованого, Mg^{2+} -залежного гідролізу АТР – максимальну миттєву швидкість реакції V_0 , максимальну (платову) кількість утворення продукту реакції P_{max} та характеристичний час реакції (період напівнасичення) τ визначали як описано у статті [16]. Уявні кінетичні параметри, які характеризують Na^+ , K^+ -активовану, Mg^{2+} -залежну АТР-гідролазну реакцію – константу активації Mg^{2+} , K^+ ($K_{\text{Mg}^{2+}}$, K_{K^+}), константу Міхаеліса ($K_{\text{мАТР}}$) та початкову максимальну швидкість реакції гідролізу АТР за Mg^{2+} , K^+ ($V_{\text{Mg}^{2+}}$, V_{K^+}) і за АТР ($V_{\text{АТР}}$) визначали за методом Лайнуівера-Берка [17, 18]. Залежність швидкості гідролізу від досліджуваних реагентів реакції (АТР та Mg^{2+} , Na^+ (K^+)), будували у координатах: $\{1/V \text{ від } 1/S\}$, де S – задана концентрація реагенту (АТР, Mg^{2+} чи Na^+ (K^+)), а V – швидкість ензиматичного гідролізу АТР при заданій концентрації АТР, Mg^{2+} чи Na^+ (K^+) відповідно.

Для визначення ефективності впливу убаїну на Na^+ , K^+ -АТР-азну активність (уявної константи інгібування ($I_{0,5}$) та коефіцієнта Хілла (n_H)) лінеаризовані криві концентраційних залежностей будували у координатах Хілла $\{\lg[(A_0 - A)/A]; \lg[I]\}$ відповідно до емпіричного рівняння Хілла:

$$\lg[(A_0 - A)/A] = -n_H \lg I_{0,5} + n_H \lg I, \quad [I]$$

де A_0 та A – питома активність ензиму за відсутності та у присутності в середовищі інкубації убаїну в концентрації I .

Кінетичні та статистичні розрахунки проводили в режимі програмного забезпечення MS

Office. Результати досліджень обробляли методами варіаційної статистики з використанням *t*-критерія Стюдента. Рівняння прямої лінії, що найкраще апроксимує експериментальні дані, розраховували методом найменших квадратів. Абсолютне значення коефіцієнта кореляції *r* становило 0,90–0,99. Достовірність розрахованих параметрів прямої перевіряли за *F*-критерієм Фішера: достовірною вважали апроксимацію за якої *P* ≤ 0,05.

У досліджах використовували реактиви АТР, Hepes, Tris, убаїн, тапсигаргін, ЕГТА (Sigma, США), Saponin (Quillaja Saponaria Molina pract.; Acros organics, Belgium). Усі інші реактиви були вітчизняного виробництва кваліфікації чда та хч.

Результати та обговорення

Кінетичний аналіз реакції вивільнення P_i під час Na^+ , K^+ -активованого, Mg^{2+} -залежного гідролізу АТР лімфоцитами крові. З метою вивчення особливостей та механізму роботи Na^+ , K^+ -АТР-ази визначали максимальну миттєву швидкість реакції (V_0), максимальну (платову) кількість утворення продукту реакції (P_{max}) та характеристичний час реакції (τ). Для встановлення цих кінетичних параметрів Mg^{2+} -залежного гідролізу АТР, який каталізується Na^+ , K^+ -АТР-азою лімфоцитів, досліджували динаміку накопичення продукту АТР-гідролізної реакції. Для цього суспензію лімфоцитів інкубували у стандартному середовищі інкубації протягом різних проміжків часу від 1-ї до 15-ти хв.

Як видно (рис. 1), кінетичні криві Na^+ , K^+ -активованого, Mg^{2+} -залежного гідролізу АТР сапонін-перфорованими лімфоцитами, мають тенденцію до насичення. Кількість вивільненого P_i убаїнчутливою Na^+ , K^+ -АТР-азою лімфоцитів хворих на РА та АСА дещо нижча у порівнянні з донорами.

Аналіз одержаних результатів показав, що кінетика Na^+ , K^+ -активованого, Mg^{2+} -залежного гідролізу АТР, каталізованого сапонін-перфорованими лімфоцитами, узгоджується із закономірностями реакції нульового порядку в діапазоні від 0 до 5 хв (у цьому інтервалі часу графік залежності P_i від періоду інкубації є практично лінійним). Тому у подальших експериментах тривалість інкубації лімфоцитів і відповідно реакції гідролізу АТР становила 5 хв.

Шляхом лінеаризації даних у координатах P/t від P обчислено основні кінетичні характеристики реакції Na^+ , K^+ -активованого,

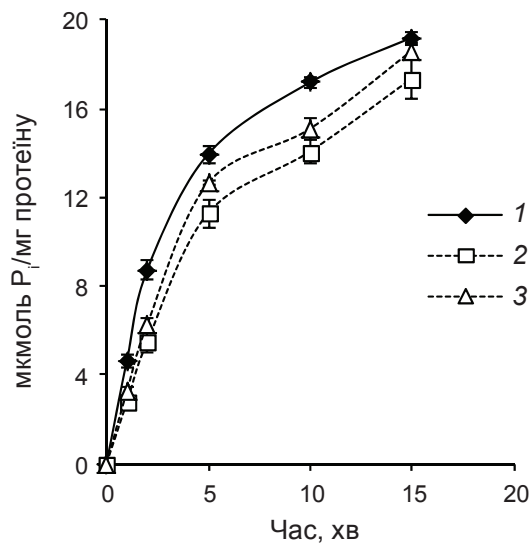


Рис. 1. Динаміка вивільнення P_i у процесі Na^+ , K^+ -активованого, Mg^{2+} -залежного гідролізу АТР сапонін-перфорованими лімфоцитами крові донорів (1) і хворих на РА (2) та АСА (3), ($M \pm m$, $n = 4-6$)

Mg^{2+} -залежного гідролізу АТР сапонін-перфорованими лімфоцитами (табл. 1, рис. 2).

Так, за відсутності вірогідної різниці величини P_{max} гідролізу АТР сапонін-перфорованими лімфоцитами, виділеними у донорів та хворих на РА і АСА, нами показано, що значення V_0 у хворих на РА та АСА істотно відрізняється від контрольної групи. На основі цих даних ми припускаємо, що у лімфоцитах крові хворих на РА і АСА транспортування Na^+ та K^+ крізь мембрану відбувається повільніше і менш активно, але характеризується практично однаковою ємністю.

Залежність початкової швидкості Na^+ , K^+ -активованого, Mg^{2+} -залежного гідролізу АТР лімфоцитами крові від вмісту протеїну в лімфоцитарній суміші. З'ясовано, що поступове підвищення концентрації лімфоцитарного протеїну в середовищі інкубації спричинює зростання V_0 Na^+ , K^+ -АТР-азної реакції, яка є максимальною при 0,15 мг/мл і надалі вірогідно не змінюється (рис. 3).

Залежність утворення P_i від вмісту протеїну в інкубаційному середовищі має однаковий характер як для донорів, так і для хворих на РА та АСА. Проте початкова швидкість реакції Na^+ , K^+ -активованого, Mg^{2+} -залежного гідролізу АТР у хворих на РА та АСА вірогідно відрізняється від V_0 у здорових донорів.

Кінетичний аналіз активності Na^+ , K^+ -активованого, Mg^{2+} -залежного гідролізу АТР

Таблиця 1. Кінетичні параметри Na^+ , K^+ -активованого, Mg^{2+} -залежного гідролізу АТР сапонін-перфорованими лімфоцитами крові донорів і хворих на РА та АСА ($M \pm m$, $n = 4-6$)

Кінетичні параметри	Донори	Хворі на	
		РА	АСА
V_0 , мкмоль P_i /хв·мг протеїну	$6,08 \pm 0,45$	$3,24 \pm 0,29$ **	$3,88 \pm 0,29$ **
P_{\max} , мкмоль P_i /мг протеїну	$25,00 \pm 1,00$	$29,13 \pm 0,91$	$28,27 \pm 2,43$
τ , хв	$4,18 \pm 0,51$	$9,10 \pm 0,53$ **	$7,37 \pm 1,18$ *

V_0 – максимальна миттєва швидкість реакції, P_{\max} – максимальна (платова) кількість продукту реакції, τ – характеристичний час реакції (період напівнасичення). Зміни вірогідні порівняно з контрольною групою; * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$

лімфоцитами крові від концентрації АТР. Згідно з результатами каталітичного титрування суспензії лімфоцитів АТР у діапазоні концентрацій від 0,1 до 2,0 мМ (за сталої концентрації Mg^{2+} 5 мМ), відбувається монотонне збільшення активності убаїнчутливої Na^+ , K^+ -АТР-ази з виходом на плато (рис. 4). Видно, що в усьому діапазоні досліджуваних концентрацій АТР активність Na^+ , K^+ -АТР-ази хворих на РА та АСА знижена у порівнянні з групою донорів.

Для з'ясування можливого механізму зміни активності Na^+ , K^+ -АТР-ази в імунокомпетентних клітинах хворих на РА і АСА проведено визначення основних кінетичних параметрів Na^+ , K^+ -активованого, Mg^{2+} -залежного гідролізу (рис. 5). Так, криві залежностей $\{1/V; 1/[АТР]\}$ відрізняються тан-

генсом нахилу і перетинають вісь ординат в одній точці. Ця залежність відповідає конкурентному типу інгібування ензиму. Шляхом лінеаризації одержаних даних у координатах Лайнуівера–Берка визначено основні кінетичні параметри Na^+ , K^+ -активованого, Mg^{2+} -залежного гідролізу АТР-сапонін-перфорованими лімфоцитами крові донорів і хворих на РА та АСА (табл. 2).

Величини $K_{АТР}$ знаходяться в субмілімолярному діапазоні концентрацій, що відповідає фізіологічній концентрації Mg-ATP у цитоплазмі. Розрахунок кінетичних параметрів убаїнчутливої Na^+ , K^+ -АТР-азної активності свідчить, що V_{\max} гідролізу АТР сапонін-перфорованими лімфоцитами крові донорів і хворих на РА та АСА практично не відрізняється. Водночас, констан-

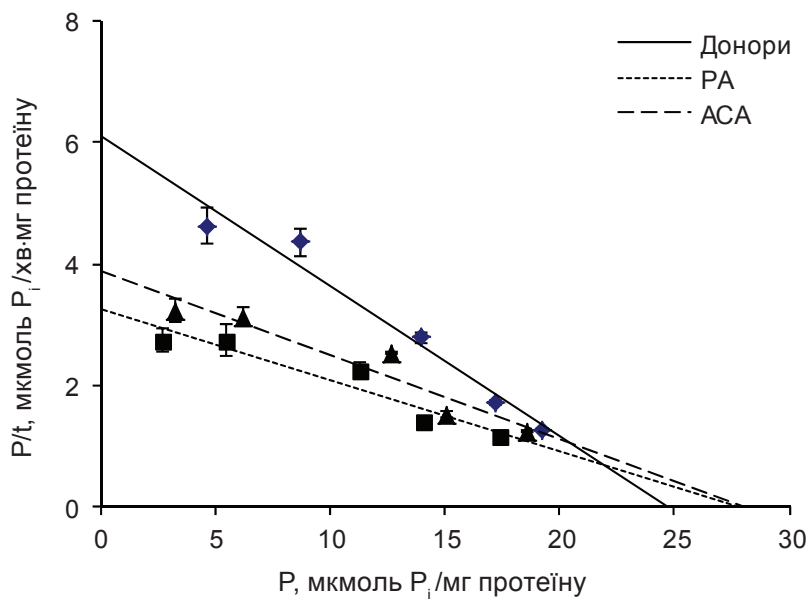


Рис. 2. Лінеаризація кривих накопичення P_i у процесі Na^+ , K^+ -активованого, Mg^{2+} -залежного гідролізу АТР сапонінперфорованими лімфоцитами крові донорів і хворих на РА та АСА у координатах $P/t; P$ ($n = 4-6$; $r > 0,9$; $F < 0,02$)

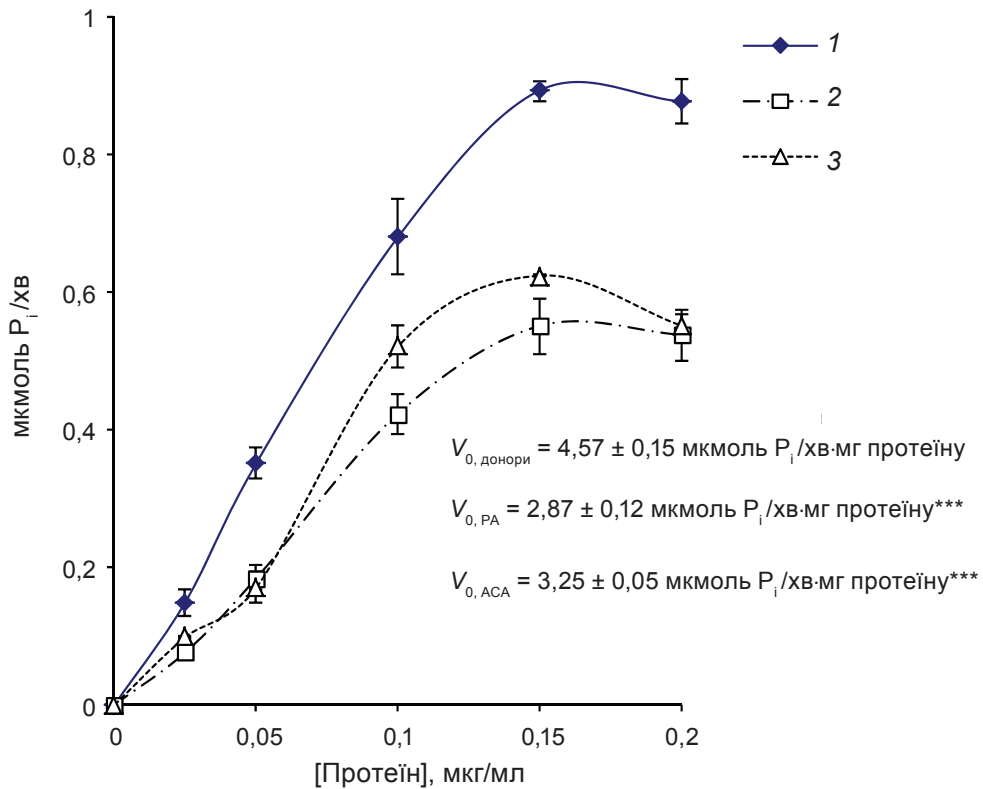


Рис. 3. Залежність початкової швидкості реакції Na^+ , K^+ -активованого, Mg^{2+} -залежного гідролізу АТР сапонінперфорованими лімфоцитами крові донорів (1) і хворих на РА (2) та АСА (3) від вмісту протеїну ($M \pm t$, $n = 4-6$). Зміни вірогідні порівняно з контрольною групою, *** $P < 0,001$

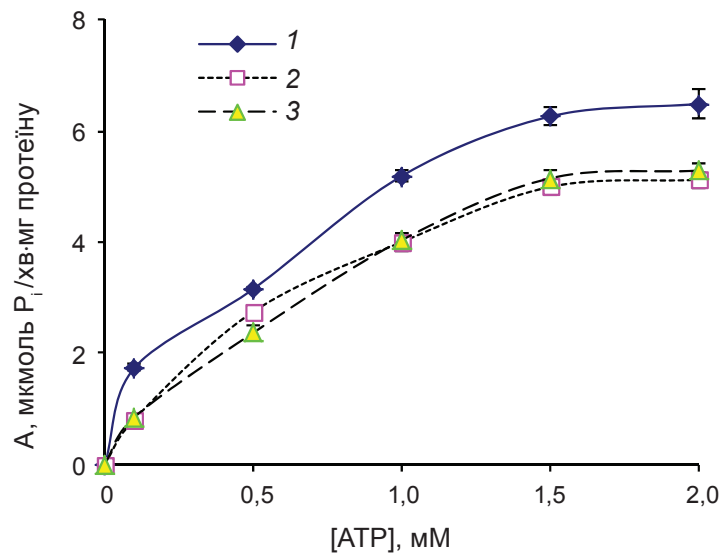


Рис. 4. Вплив різних концентрацій АТР на активність убаїнчутливої Na^+ , K^+ -АТР-ази сапонінперфорованих лімфоцитів крові донорів (1) і хворих на РА (2) та АСА (3), ($M \pm t$, $n = 4-6$)

та спорідненості Na^+ , K^+ -АТР-ази до АТР у лімфоцитах крові хворих на РА та АСА вища у 3,1 і 2,5 рази відповідно у порівнянні із донорами.

Отже, за інтерпретації одержаних даних (з урахуванням кінетичних параметрів), ми дійшли висновку, що під час розвитку ревматичної патології в імунокомпетентних

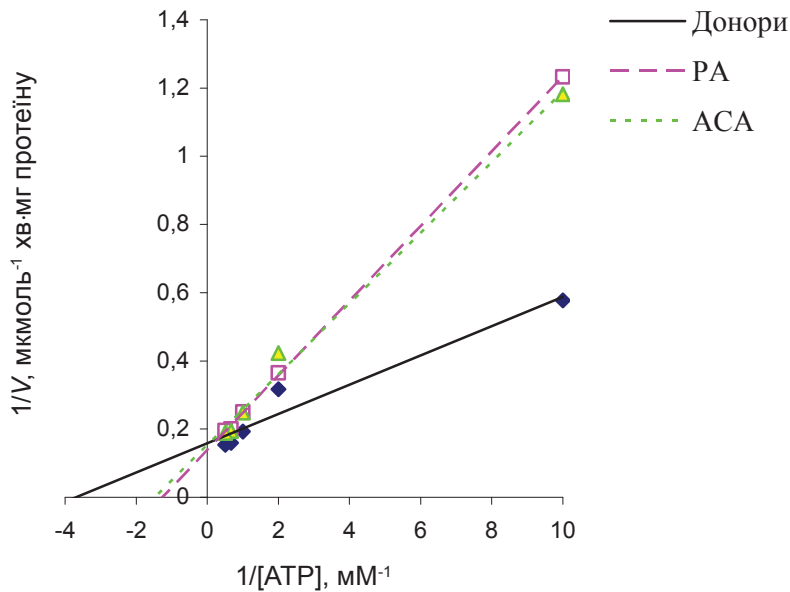


Рис. 5. Лінеаризація концентраційних кривих, наведених на рис. 4, у координатах Лайнуівера–Берка, де V – убаїнчутлива Na^+ , K^+ -АТР-азна активність сапонінперфорованих лімфоцитів крові донорів і хворих на РА та АСА, ($n = 4-6$; $r > 0,95$; $F < 0,005$)

клітинах інгібування активності Na^+ , K^+ -АТР-ази відбувається не за рахунок зменшення числа обертів ензиму, а внаслідок зниження спорідненості убаїнчутливої Na^+ , K^+ -АТР-ази до АТР. Дослідниками показано що уявна спорідненість екто-АТР-ази лімфоцитів периферичної крові до АТР у хворих на хронічну лімфатичну лейкемію значно нижча, ніж спорідненість до АТР у нормі [19]. Водночас, трансформовані Т-лімфоцити виявляють вищу спорідненість до субстрату порівняно з нетрансформованими [20]. Оскільки центр гідролізу АТР локалізований на цитоплазматичній поверхні мембрани, то ми припускаємо, що однією з можливих причин конкурентного інгібування може бути вплив на Na^+ , K^+ -АТР-азу з боку інших патологічних змін і процесів у лімфоцитах при ревматичній патології. Під час запалення або

дії цитотоксичних факторів у позаклітинному оточенні можуть створюватися високі локальні концентрації АТР [21, 22]. Можливо, такі зміни концентрації АТР і ведуть до зміни спорідненості убаїнчутливої Na^+ , K^+ -АТР-ази лімфоцитів крові до субстрату. З іншого боку відомо, що стимуляція лімфоцитів антигенами запускає каскад енергетично-залежних процесів, які ведуть до перерозподілу макроергів у клітині, з чим також можуть бути пов'язані зміни спорідненості субстрату до убаїнчутливої Na^+ , K^+ -АТР-ази лімфоцитів периферичної крові.

Кінетичний аналіз зміни активності Na^+ , K^+ -активованого, Mg^{2+} -залежного гідролізу АТР лімфоцитами крові від концентрації іонів Mg^{2+} . Відомо, що крім АТР для функціонування Na^+ , K^+ -АТР-ази необхідним є магній, який діє як кофактор. Іони Mg^{2+} утворюють хелатний ком-

Таблиця 2. Кінетичні параметри, які характеризують Na^+ , K^+ -активований, Mg^{2+} -залежний гідроліз АТР сапонінперфорованими лімфоцитами крові донорів і хворих на РА та АСА від концентрації АТР ($M \pm m$, $n = 4-8$)

Кінетичні параметри	Донори	Хворі на	
		РА	АСА
V_{\max} , мкмоль P_i /хв·мг протеїну	$6,30 \pm 0,14$	$7,46 \pm 0,79$	$6,51 \pm 0,28$
$K_{\text{АТР}}$, мМ	$0,27 \pm 0,01$	$0,84 \pm 0,15$ ***	$0,68 \pm 0,04$ **

V_{\max} – початкова максимальна активність ензиму, $K_{\text{АТР}}$ – константа Міхаеліса за АТР. Зміни вірогідні відносно групи контролю ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$

плекс Mg-АТР, який є субстратом ензиматичної реакції. Mg²⁺ взаємодіє з фосфатними групами АТР, поляризує їх і, таким чином, полегшує нуклеофільну атаку на термінальний γ-фосфат. Також Mg²⁺ зв'язується з регуляторним центром Na⁺, K⁺-АТР-ази [23].

Досліди з вивчення впливу Mg²⁺ на Na⁺, K⁺-АТР-азну активність сапонінперфорованих лімфоцитів крові проводили в діапазоні концентрацій MgCl₂ від 0 до 7 мМ (за сталої концентрації АТР 1,5 мМ). Як видно (рис. 6), крива, яка показує залежність активності убаїнчутливої Na⁺, K⁺-АТР-ази лімфоцитів крові від вмісту Mg²⁺ в інкубаційному середовищі, має виражений куполоподібний вигляд. Графіки залежності Na⁺, K⁺-АТР-азної активності сапонінперфорованих лімфоцитів крові хворих на РА та АСА мають схожий вигляд. Результати досліджень, наведені на рис. 6, свідчать, що максимальне значення активності убаїнчутливої Na⁺, K⁺-АТР-ази спостерігається при 5 мМ MgCl₂.

Графіки залежності убаїнчутливої Na⁺, K⁺-АТР-азної активності лімфоцитів крові донорів і хворих на РА та АСА від концентрації Mg²⁺ у висхідній частині кривих лінеаризовано у координатах Лайнуївера–Берка (рис. 7).

Як видно (рис. 7), криві залежностей $\{1/V; 1/[Mg^{2+}]\}$ практично не відрізняються тангенсом нахилу і перетинають вісь ординат і вісь абсцис в одній точці. Розрахунок кінетичних характеристик убаїнчутливої Na⁺, K⁺-АТР-азної активності лімфоцитів крові свідчить, що початкова максимальна швидкість гідролізу АТР та уявна константа активації Mg²⁺ у хворих на РА та АСА істотно не відрізняються від донорів (табл. 3).

Отже, при ревматичній патології Mg²⁺-зв'язувальна ділянка убаїнчутливої Na⁺, K⁺-АТР-ази лімфоцитів залишається нативною.

Кінетичний аналіз активності Na⁺, K⁺-активованого, Mg²⁺-залежного гідролізу АТР лімфоцитами крові від співвідношення концентрації іонів Na⁺ і K⁺. При вивченні впливу різних концентрацій Na⁺ та K⁺ на питому ензиматичну активність убаїнчутливої Na⁺, K⁺-АТР-ази частину NaCl в інкубаційному середовищі замінювали на KCl (сумарна концентрація іонів Na⁺ + K⁺ = 150 мМ). Графік залежності Na⁺, K⁺-АТР-ази лімфоцитів крові донорів та хворих на РА і АСА має типовий куполоподібний вигляд (рис. 8). Оптимальним для функціонування ензиму в інкубаційному середовищі є співвідношення іонів 125 Na⁺ : 25 K⁺. У разі відсутності одного з іонів у середовищі інкубації Na⁺, K⁺-АТР-аза не тестується.

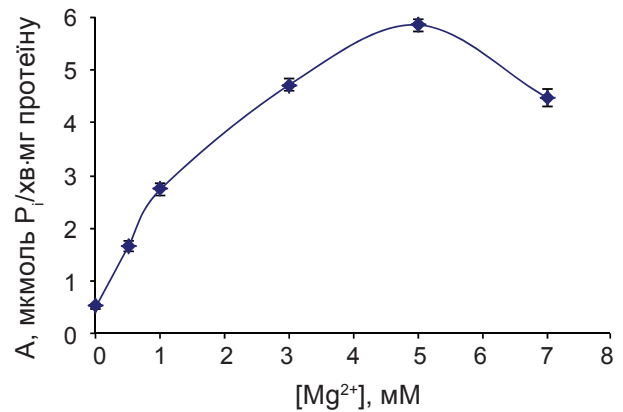


Рис. 6. Вплив різних концентрацій Mg²⁺ на активність убаїнчутливої Na⁺, K⁺-АТР-ази сапонінперфорованих лімфоцитів крові донорів (M ± m, n = 4)

Графіки залежності убаїнчутливої Na⁺, K⁺-АТР-азної активності лімфоцитів крові донорів та хворих на РА і АСА від співвідношення Na⁺ і K⁺ у висхідній частині кривої натрієвої компоненти лінеаризовано у координатах Лайнуївера–Берка (графік не наведений).

Розрахунок кінетичних параметрів убаїнчутливої Na⁺, K⁺-АТР-азної активності свідчить, що початкова максимальна швидкість гідролізу АТР сапонінперфорованими лімфоцитами крові донорів та хворих на РА та АСА, визначена за Na⁺ і уявна константа активації іонами Na⁺ у лімфоцитах крові хворих на РА та АСА вірогідно відрізняються у порівнянні з донорами (табл. 4). Це відповідає змішаному типу інгібування ензиму.

Отже, на підставі одержаних даних ми дійшли висновку, що при ревматичній патології в імунікомпетентних клітинах інгібується активність ензиму внаслідок зменшення числа його обертів. Можна припустити, що зниження величини V_{max} може бути пов'язане зі зменшенням Na⁺/K⁺ електрохімічного градієнта цитоплазматичної мембрани лімфоцитів, зниженням кількості транспортувальних одиниць (зменшення їхньої експресії у мембрані), або зменшенням числа обертів ензиму. Зниження величини уявної константи активації K_{Na+} у разі ревматичної патології вказує на зростання спорідненості Na⁺, K⁺-АТР-ази до іонів Na. Іншими дослідниками встановлено [24], що має місце порушення спорідненості H⁺/K⁺-АТР-ази парієтальних клітин до K⁺ під час розвитку експериментальної виразки шлунка.

Інгібіторний аналіз впливу убаїну на активність Na⁺, K⁺-активованого, Mg²⁺-

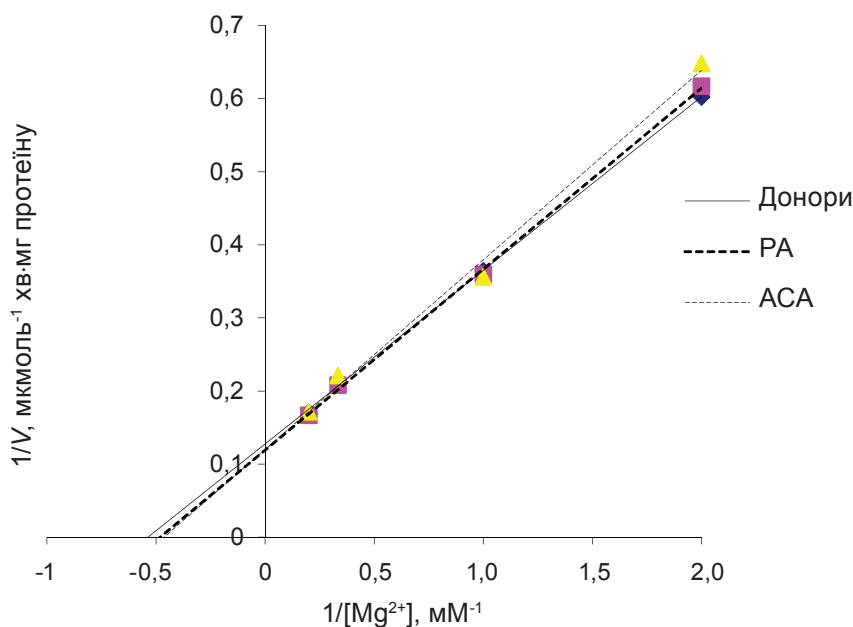


Рис. 7. Лінеаризація концентраційних кривих, наведених на рис. 6, у координатах Лайнуівера – Берка, де V – убаїнчутлива Na^+ , K^+ -АТФ-азна активність сапонінперфорованих лімфоцитів крові донорів і хворих на РА та АСА, ($n = 4-6$; $r > 0,95$; $F < 0,001$)

залежного гідролізу АТФ лімфоцитами крові. Na^+ , K^+ -активована, Mg^{2+} -залежна АТФ-аза, яка поєднує транспортно-гідролітичну і рецепторну функцію, також специфічно взаємодіє з екзогенними інгібіторами – серцевими глікозидами або їх ендogenousними аналогами [25, 26]. Кардіоактивний стероїд убаїн є високоселективним інгібітором Na^+ , K^+ -АТФ-ази. Убаїн зв'язується з ферментом із зовнішнього боку цитоплазматичної мембрани. Вважають, що убаїн блокує фермент у конформації Р-Е₂, запобігаючи подальшому перебігу каталітичного циклу. Убаїн в інтервалі концентрацій від 10^{-6} до 10^{-3} М дозозалежно пригнічує убаїнчутливу Na^+ , K^+ -АТФ-азну активність лімфоцитів крові донорів та хворих на РА (рис. 9).

Встановлено, що характер інгібування убаїном для ферменту у нормі та при патології є однаковим (рис. 9). Для з'ясування параметрів інгібування Na^+ , K^+ -АТФ-ази убаїном проведено лінеаризацію концентраційних кривих у координатах Хілла (графік не наведений). Значення уявної константи інгібування убаїном та коефіцієнт Хілла у лімфоцитах крові донорів та хворих на РА вірогідно не відрізняються (табл. 5). Проте слід зазначити, що в експериментальних умовах (недостатній час для зв'язування убаїну у нестационарному режимі, антагонізм з K^+ при його високих концентраціях у пробі) коефіцієнт інгібування не відповідає уявній константі інгібування, що визначається при досягненні стаціонарного рівня інгібування ферменту.

Таблиця 3. Кінетичні параметри, які характеризують Na^+ , K^+ -активованій, Mg^{2+} -залежний гідроліз АТФ сапонінперфорованими лімфоцитами крові донорів і хворих на РА та АСА від концентрації Mg^{2+} ($M \pm m$, $n = 4-8$)

Кінетичні параметри	Донори	Хворі на	
		РА	АСА
V_{\max} , мкмоль P_i /хв·мг протеїну	$7,9 \pm 0,3$	$7,94 \pm 0,13$	$7,8 \pm 0,3$
$K_{\text{Mg}^{2+}}$, мМ	$1,9 \pm 0,2$	$1,95 \pm 0,16$	$2,0 \pm 0,1$

V_{\max} – початкова максимальна активність ферменту, $K_{\text{Mg}^{2+}}$ – уявна константа активації Mg^{2+} . Зміни не є статистично вірогідними відносно величин контрольної групи

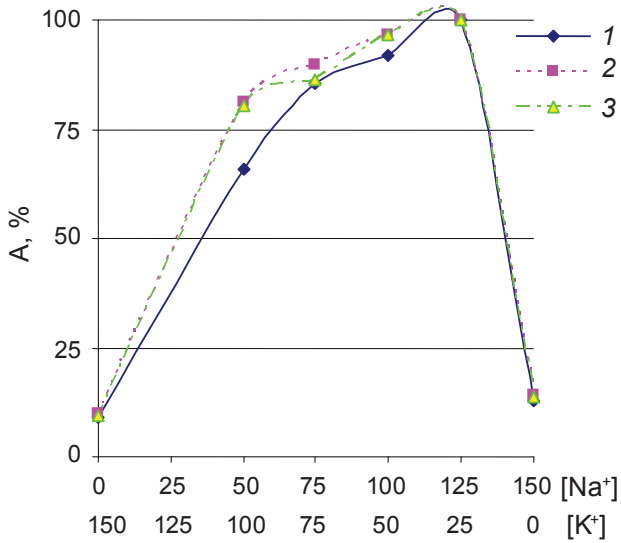


Рис. 8. Вплив співвідношення іонів Na^+ і K^+ (за ізотонічних умов $Na^+ + K^+ = 150$ мМ) на активність убаїнчутливої Na^+ , K^+ -АТФ-ази сапонінперфорованих лімфоцитів крові донорів (1) і хворих на РА (2) та АСА (3), $M \pm m$, $n = 4$. За 100 % прийнято ензиматичну активність при оптимальному співвідношенні Na^+ і K^+

Параметри інгібування характеризують високочутливий до убаїну фенотип Na^+ , K^+ -АТФ-ази в зазначених експериментальних умовах інгібування. Він визначається подібністю структури рецепторної ділянки [27], що є характерним для всіх ізоензимів Na^+ , K^+ -АТФ-ази у людини [28].

Отже, Na^+ , K^+ -АТФ-аза лімфоцитів периферичної крові хворих на РА і АСА зберігає свої нативні рецепторні властивості – чутливість до інгібування убаїном не змінюється. Збереження нативних рецепторних властивостей Na^+ , K^+ -АТФ-ази до убаїну показано у клітинах карциноми товстої кишки людини [29]. Водночас, іншими дослідниками встановлено, що у хворих на мігрень має місце

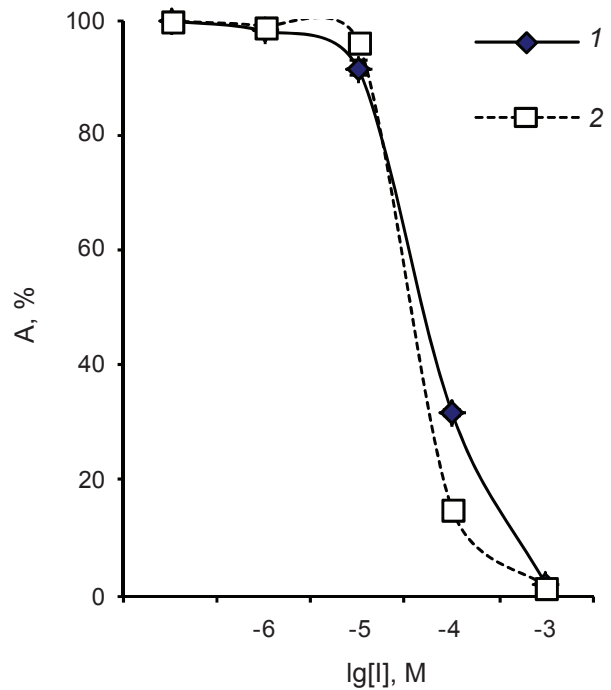


Рис. 9. Інгібування убаїном Na^+ , K^+ -АТФ-азної активності сапонінперфорованих лімфоцитів крові донорів (1) та хворих на РА (2), $M \pm m$, $n = 6$. За 100% прийнято ензиматичну активність Na^+ , K^+ -АТФ-ази за відсутності в інкубаційному середовищі убаїну

зміна кінетики зв'язування убаїну з Na^+ , K^+ -АТФ-азою лімфоцитів і що це може бути корисним інструментом у діагностиці цієї хвороби [30].

Таким чином, нами показано дефект гідролазної активності убаїнчутливої Na^+ , K^+ -АТФ-ази лімфоцитів крові у хворих на РА і АСА, що свідчить про можливі порушення первинноактивного транспортування Na^+ та K^+ . За оцінкою змін гідролазної активності встановлено, що у лімфоцитах периферичної крові хворих на РА і АСА транспортування

Таблиця 4. Кінетичні параметри, які характеризують Na^+ , K^+ -активований, Mg^{2+} -залежний гідроліз АТФ сапонінперфорованими лімфоцитами крові донорів і хворих на РА та АСА від співвідношення Na^+ і K^+ (за ізотонічних умов $Na^+ + K^+ = 150$ мМ), $M \pm m$, $n = 4-8$

Кінетичні параметри	Донори	Хворі на	
		РА	АСА
V_{max} , мкмоль P_i /хв·мг протеїну	$7,74 \pm 0,29$	$5,32 \pm 0,16^{***}$	$5,52 \pm 0,01^{***}$
K_{Na^+} , мМ	$66,68 \pm 3,40$	$23,70 \pm 3,25^{***}$	$24,68 \pm 0,28^{***}$

V_{max} – початкова максимальна активність ензиму, K_{Na^+} – уявна константа активації Na^+ . Зміни вірогідні відносно контрольної групи, *** $P < 0,001$

Таблиця 5. Кінетичні параметри інгібувальної дії убаїну на активність Na^+ , K^+ -АТФ-ази сапонін-перфорованих лімфоцитів крові донорів та хворих на РА ($M \pm m$, $n = 6$)

Кінетичні параметри	Донори	Хворі на РА
$I_{0,5}$, мкМ	$42,7 \pm 0,7$	$35,8 \pm 4,7$
n_H	$1,13 \pm 0,02$	$1,2 \pm 0,1$

Примітка: $I_{0,5}$ – уявна константа інгібування, n_H – коефіцієнт Хілла

Na^+ , K^+ за участю Na^+ , K^+ -АТФ-ази відбувається повільніше у порівнянні із донорами, але має практично однакову ємність з ними. Виявлено, що в умовах розвитку ревматичної патології спорідненість Na^+ , K^+ -АТФ-ази до АТФ у лімфоцитах крові хворих на РА та АСА знижується, водночас, Mg^{2+} -зв'язувальна ділянка убаїнчутливої Na^+ , K^+ -АТФ-ази лімфоцитів хворих на РА і АСА залишається нативною. Відмічається, також, збільшення спорідненості Na^+ , K^+ -АТФ-ази лімфоцитів крові до іонів Na^+ і збереження рецепторних властивостей Na^+ , K^+ -АТФ-ази до убаїну у хворих на РА і АСА.

Результати досліджень можуть бути використані для подальшого з'ясування мембранних механізмів іонного обміну в імункомпетентних клітинах при автоімунних захворюваннях.

КИНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА Na^+ , K^+ -АТФ-АЗЫ ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ У БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ И АНКИЛОЗИРУЮЩИМ СПОНДИЛОАРТРИТОМ

Р. В. Фафула, У. П. Ефремова,
Н. Э. Лычковская, З. Д. Воробець

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

Проведен анализ кинетических свойств убаинчувствительной Na^+ , K^+ -АТФ-азной активности сапонинперфорированных лимфоцитов крови доноров и больных ревматоидным артритом (РА) и анкилозирующим спондилоартритом (АСА). На основании изменения гидролазной активности Na^+ , K^+ -АТФ-ази установлено, что в лимфоцитах крови больных РА и АСА первичноактивный транспорт ионов Na^+ , K^+ происходит менее интенсивно по сравнению с донорами, но характеризуется с ними практически одинаковой емкостью. Константа сродства к АТФ в лимфоцитах крови больных

РА и АСА превышает ее значение по сравнению с донорами в 3,1 и 2,5 раза соответственно. Показано, что в условиях развития ревматической патологии в иммунокомпетентных клетках ингибирование активности убаинчувствительной Na^+ , K^+ -АТФ-азы происходит не за счет уменьшения числа оборотов, а за счет снижения сродства энзима к АТФ. Одновременно Mg^{2+} -связывающий участок убаинчувствительной Na^+ , K^+ -АТФ-азы лимфоцитов больных РА и АСА остается нативным. Отмечается также, что константа сродства Na^+ , K^+ -АТФ-азы лимфоцитов крови больных РА и АСА к ионам Na^+ в 2,75 раза меньше, чем у доноров. Показано, что Na^+ , K^+ -АТФ-аза лимфоцитов крови больных РА и АСА сохраняет свои рецепторные свойства, а чувствительность к ингибированию убаином не меняется.

Ключевые слова: Na^+ , K^+ -АТФ-аза, лимфоциты, ревматоидный артрит, анкилозирующий спондилоартрит.

KINETIC PROPERTIES OF Na^+ , K^+ -ACTIVATED, Mg^{2+} -DEPENDENT ATP-HYDROLYSIS OF BLOOD LYMPHOCYTES IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS AND ANKYLOSING SPONDYLOARTHRITIS

R. V. Fafula, U. P. Efremova,
N. E. Lychkovska, Z. D. Vorobets

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

Summary

The comparative analysis of the kinetic properties of ouabain-sensitive Na^+ , K^+ -ATPase activity of saponin-perforated blood lymphocytes of donors and patients with rheumatoid arthritis (RA) and ankylosing spondyloarthritis (AS) was carried out. When analyzing the alterations in hydrolase activity of the examined enzyme it was shown that in the blood lymphocytes of patients

with RA and AS the primary active transport of Na⁺ and K⁺ ions is less intensive in comparison with practically healthy donors, but it is characterized by almost the same capacity as in donors. The affinity constant of Na⁺, K⁺-ATPase for ATP in the blood lymphocytes in patients with RA and AS is greater 3.1 and 2.5 times, respectively, in comparison with healthy donor. It was found that in conditions of rheumatic pathology in immunocompetent cells the inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase activity is not related to the reduction of maximum reaction rate, but is related to the decrease of Na⁺, K⁺-ATPase affinity to ATP. However, Mg²⁺-binding center of Na⁺, K⁺-ATPase in patients with RA and AS remains native. It was identified that the affinity constant of Na⁺, K⁺-ATPase to Na⁺ ions in the blood lymphocytes of patients with RA and AS is 2.75 times lower than its value in healthy donors. Na⁺, K⁺-ATPase of the blood lymphocytes of patients with RA and AS retains its native receptor properties and sensitivity to ouabain does not change.

Key words: Na⁺, K⁺-ATPase, lymphocytes, rheumatoid arthritis, ankylosing spondyloarthritis.

1. Коваленко В. М., Корнацький В. М. Хвороби системи кровообігу: динаміка та аналіз (аналітично-статистичний посібник. – Київ, МПП “Ліно”, 2008. – 111 с.
2. Коваленко В. М., Борткевич О. П., Білявська Ю. В. // Здоров'я України. – 2010. – № 1. – С. 74–77.
3. Свінцицький А. С. // Здоров'я України. – 2010. – № 5/1. – С. 75–79.
4. Масик О. М., Швед М. І., Козій Н. І. Анкілозивний спондилоартрит (хвороба Бехтерева). – Тернопіль: ТДМУ, 2007. – 308 с.
5. Пішак О. В., Пішак В. П. // Буковин. мед. вісн. – 2002. – 6, № 2. – С. 169–174.
6. Петров А. В., Дударь Л. В., Малий К. Д. // Тер. архив. – 2004. – № 5. – С. 32–35.
7. Воробьев А. И., Васильев С. А., Городецкий В. М. // Тер. архив. – 2002. – № 7. – С. 76–80.
8. *Boyum A.* // *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* – 1968. – 21 (Supp. 97). – P. 77–79.
9. *Mishell B. B., Shiigi S. M.* Selected Methods in Cellular Immunology / San Francisco; W. H. Freeman and Company. – 1980. – 486 p.
10. Кімакович О. В., Підковка Н. О., Воробець З. Д. // Практ. медицина. – 2004. – 10, № 2. – С. 86–89.
11. *Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. et al.* // *J. Biol. Chem.* – 1951. – 193. – P. 265–275.
12. *Flynn E. R. M., Bradley K. N., Muir T. C. et al.* // *J. Biol. Chem.* – 2001. – 276, N 39. – P. 36411–36418.
13. *Rathbun W., Betlach V.* // *Anal. Biochem.* – 1969. – 28. – P. 436–447.
14. *Valente R. C., Capella L. S., Monteiro R. Q. et al.* // *FASEB J.* – 2003. – 17, N 12. – P. 1700–1702.
15. *Wang H., Haas M., Liang M. et al.* // *J. Biol. Chem.* – 2004. – 279, N 17. – P. 17250–17259.
16. Костерин С. А., Бурчинская Н. Ф. // Укр. біохім. журн. – 1987. – 59, № 2. – С. 66–69.
17. Келети Т. / Основы ферментативной кинетики: Пер. с англ. – М: Мир, 1990. – 350 с.
18. Курский М. Д., Костерин С. А. / Биохимическая кинетика: Учеб. пособие для вузов / М. Д. Курский, С. А. Костерин, В. К. Рыбальченко. – К.: Вища шк., 1977. – 264 с.
19. *Gutmann H. R., Chow Y. M., Vessells R. L. et al.* // *Blood.* – 1983. – 62, N 5. – P. 1041–1046.
20. Гребіник С. М., Артеменко О. Ю., Гринюк І. І. та ін. // Укр. біохім. журн. – 2009. – 81, № 2. – С. 27–33.
21. *Di Virgillio* // *Immunol. Today.* – 1995. – N 16. – P. 254–528.
22. *Vodin P., Burlstock G.* // *Neurochem. Res.* – 2001. – 26, N 15. – P. 959–969.
23. *Connolly B. A., Echstein F.* // *J. Biol. Chem.* – 1981. – 256, N 18. – P. 9450–9456.
24. Строцька Є. А., Раєцька Я. Б., Остапченко Л. І. // Вісник КНУ ім. Т. Шевченка. – 2010. – № 24 (211). – С. 83–88.
25. Капля А. А. // Укр. біохім. журн. – 1997. – 69, № 5–6. – С. 12–24.
26. Лопина О. Д. // Биол. мембраны. – 1999. – 16, № 6. – С. 584–603.
27. Капля А. А., Кравцов А. В. // Успехи совр. биологии. – 1999. – 119, № 1. – С. 90–100.
28. *Crambert G., Hasler U., Beggah A. T. et al.* // *J. Biol. Chem.* – 2000. – 275, N 3. – P. 1976–1986.
29. Капля О. А., Кудрявцева А. Г., Горчев В. Ф. та ін. // Укр. біохім. журн. – 2006. – 78, № 2. – С. 142–148.
30. *Scarrone S., Podesta M., Cupello A. et al.* // *Cephalalgia.* – 2007. – 27, N 2. – P. 128–132.

Отримано 17.01.2012