



УДК 577.152.3

Властивості Na^+ , K^+ -активованої, Mg^{2+} -залежної АТФ-гідролази лімфоцитів крові у хворих на реактивний артрит

О.В. Мельник, О.П. Корнійчук, О.І. Першин, З.Д. Воробець

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, Львів, Україна

Установлено зміни та проаналізовано кінетичні властивості оубайнчутливої Na^+ , K^+ -АТФазної активності сапонін-перфорованих лімфоцитів периферичної крові практично здорових осіб і хворих на реактивний артрит (РеА). У лімфоцитах периферичної крові хворих на РеА первинно-активне транспортування іонів Na^+ , K^+ відбувається повільніше і менш інтенсивно порівняно з практично здоровими донорами, але характеризується приблизно однаковою ємністю з донорами. Константа афінності до АТФ у лімфоцитах периферичної крові хворих на РеА перевищує її значення порівняно з практично здоровими донорами у 2,9 раза. За умов розвитку ревматичної патології в імунотетракомпетентних клітинах інгібування активності Na^+ , K^+ -АТФази відбувається не за рахунок зменшення кількості оборотів ензиму, а шляхом підвищення спорідненості оубайнчутливої Na^+ , K^+ -АТФази до АТФ. Водночас, Mg^{2+} -зв'язувальна ділянка оубайнчутливої Na^+ , K^+ -АТФази лімфоцитів хворих на РеА залишається нативною. Афінність Na^+ , K^+ -АТФази лімфоцитів периферичної крові до іонів K^+ перевищує афінність у хворих на РеА у 2,4 раза. Na^+ , K^+ -АТФаза лімфоцитів периферичної крові хворих на РеА зберігає свої нативні рецепторні властивості: чутливість до інгібування оубайном не змінюється. Припускається, що за умов розвитку ревматичної патології вплив на структуру Na^+ , K^+ -АТФази здійснюється як із зовнішньоклітинної, так і з цитоплазматичної поверхні мембрани.

Ключові слова: Na^+ , K^+ -АТФаза; реактивний артрит; лімфоцити

Properties of Na^+ , K^+ -activated, Mg^{2+} -dependent ATP-hydrolyze of blood lymphocytes in patients with reactive arthritis

O.V. Melnyk, O.P. Komijchuk, O.I. Pershyn, Z.D. Vorobets

Danylo Halytskyi Lviv National Medical University, Lviv, Ukraine

A significant role in the development and course of reactive arthritis (ReA) is played by T-lymphocytes as their development and systemic manifestations are based on immunological mechanisms. Additionally, the pathogenesis of many diseases is linked to changes in the structure and function of ion-transporting systems. Therefore, the aim of the study was to find out the kinetic properties of ATP-hydrolysis reaction involving Na^+ , K^+ -ATPase of peripheral blood lymphocytes of healthy individuals and patients with ReA. We used the current methodological approaches to the study of ATPase activity in saponin-permeabilized cells. We conducted an analysis of the kinetic properties of ouabain-sensitive Na^+ , K^+ -ATPase activity of saponin-perforated peripheral blood lymphocytes of healthy donors and patients with rheumatoid arthritis (ReA). We found out that in peripheral blood lymphocytes of patients with ReA primary active transport of Na^+ , K^+ ions is slower and less intensive, though characterised by the same capacity, as in healthy donors. The affinity constant for ATP in peripheral blood lymphocytes in patients with ReA is greater by 2.9 times than its value in comparison with healthy donors. We established that in conditions of rheumatic pathology in immunocompetent cells, inhibition of Na^+ , K^+ -ATPase activity is not caused by reduction of speed of enzyme work, but by increase of affinity of ouabain-sensitive Na^+ , K^+ -ATPase to ATP. At the same time, the Mg^{2+} -binding center of Na^+ , K^+ -ATPase in patients with ReA is endogenous. We also found that affinity Na^+ , K^+ -ATPase to the ions K^+ in peripheral blood lymphocytes of healthy donors is 2.4 times higher than in patients with ReA. We observed that Na^+ , K^+ -ATPase of peripheral blood lymphocytes of patients with ReA retains its endogenous receptor properties – sensitivity to ouabain does not change. It is assumed that under conditions of rheumatic pathology the impact on the Na^+ , K^+ -ATPase structure occurs both externally and on the cytoplasmic membrane surface. The above experimental data can be used for further clarification of the membrane mechanisms of ion exchange in immunocompetent cells of patients suffering from autoimmune diseases.

Keywords: Na^+ , K^+ -ATPase; reactive arthritis; lymphocytes

Реактивний артрит (РеА) є одним із найрозповсюджених запальних аутоімунних захворювань суглобів. Високі показники поширення та захворюваності, схильність до прогресування, розвиток непрацездатності серед осіб середнього віку зумовлюють високу медико-соціальну значимість цієї патології (Berezhnyi et al., 2013; Kovalenko, 2011; Spaska, 2011). РеА – системне захворювання, яке розвивається внаслідок урогенітальної (найчастіше хламідійної), кишкової або носоглоткової інфекції (Zeidler et al., 2004; Hamdulau et al., 2006; Kim et al., 2009; Kohnke, 2009; Spaska, 2011; Berezhnyi et al., 2013).

Згідно із сучасними уявленнями, значна роль у розвитку та перебігу артритів належить Т-лімфоцитам. В основі РеА та його системних проявів лежать імунологічні механізми (Colmegna and Espinoza, 2005; Leirisalo-Repo, 2005; Leirisalo-Repo and Sieper, 2006; Lychkovska, 2011). Тому актуальними є питання, які стосуються саме імунопатології ревматичних захворювань, їх механізмів виникнення та розвитку.

Патогенез багатьох захворювань пов'язаний зі змінами структури та функцій біомембран, у формуванні яких значна роль належить мембранозв'язаним білкам, зокрема інтегральним АТФ-залежним транспортувальним системам іонів. Na^+ , K^+ -АТФаза (ЕС 3.6.1.37) – маркерний ензим плазматичної мембрани, який селективно інгібується оубаїном, є Ca^{2+} -незалежною, Na^+ , K^+ -активованою, Mg^{2+} -АТФ-залежною транспортувальною системою, що здійснює активне трансмембранне перенесення іонів Na^+ , K^+ і тим самим підтримує їх електрохімічні градієнти, необхідні для нормального функціонування клітини. Активність Na^+ , K^+ -АТФази відіграє ключову роль у підтриманні внутрішньоклітинного іонного гомеостазу, осмотичного балансу та трансмембранного потенціалу клітин, змінюється під впливом гормонів, факторів росту та стресу.

Нашими попередніми дослідженнями показано (Melnyk et al., 2011), що у хворих на РеА Na^+ , K^+ -АТФазна активність лімфоцитів периферичної крові істотно відрізняється від контрольної групи, а після проведеного лікування хворих у стаціонарі спостерігається наближення активності Na^+ , K^+ -АТФази до її контрольних значень. На сьогодні нез'ясованими залишаються біохімічні механізми порушення функціональної активності Na^+ , K^+ -АТФази у лімфоцитах периферичної крові за умов розвитку аутоімунного процесу. Комплексне вивчення функціонування та ролі Na^+ , K^+ -помпи як системи енергозалежного транспортування іонів Na^+ , K^+ у регуляції функціональної відповіді клітини (з використанням фізіологічних методів дослідження на цілих об'єктах) і ензиматичної активності Na^+ , K^+ -АТФази (з використанням біохімічних методів) на одному об'єкті дасть можливість сформувати цілісне уявлення про участь цих систем у підтриманні іонного гомеостазу клітини. З огляду на це, мета цієї роботи – з'ясувати кінетичні характеристики АТФ-гідролізної реакції за участю Na^+ , K^+ -АТФази сапонін-перфорованих лімфоцитів периферичної крові клінічно здорових осіб і хворих на РеА.

Дослідження проводили на лімфоцитах периферичної крові донорів і хворих, які перебували на стаціонарному лікуванні у ревматологічному відділенні Львівської обласної клінічної лікарні. Усіх хворих поділено на дві дослідні групи: хворі на РеА до ($n = 14$) та після проведеного лікування ($n = 14$). Групу контролю становили практично (клінічно) здорові донори віком 20–30 років ($n = 15$).

Відповідні діагнози встановлювали на базі загально-визначних критеріїв. Використано широкий комплекс загальноклінічних, лабораторних, спеціальних ревматологічних, інструментальних, мікробіологічних, імунологічних досліджень з метою виявлення причини розвитку реактивного артрити (Leirisalo-Repo and Sieper, 2006).

Моноядерні лімфоцити периферичної крові людини виділяли з гепаринізованої свіжоотриманої крові хворих і донорів у градієнті концентрації фікол-тріумбасту (1.08 г/см^3) (Boyum, 1968). Цілісність і життєздатність лімфоцитів, яка в усіх дослідках становила не менше 95%, оцінювали за забарвленням трипановим синім (Michell and Shügi, 1980). Для пермеабілізації мембран лімфоцитів периферичної крові з метою розкриття латентної Na^+ , K^+ -АТФазної активності до суспензії лімфоцитів додавали 0,2% сапонін (Fafula et al., 2012). Ця методика ґрунтується на роботах, виконаних на лімфоцитах раніше. Вміст білка у лімфоцитарній суміші визначали методом Лоурі (Lowry et al., 1951).

Визначення загальної АТФазної ензиматичної активності лімфоцитів проводили при 37°C у середовищі інкубації (об'ємом 1 мл) такого складу (мМ): 30 $NaCl$, 120 KCl , 5 $MgCl_2$, 1.5 АТФ, 1 ЕГТА, 1 NaN_3 (інгібітор мітохондріальної АТФази) (Fafula et al., 2012), 20 $Hepes-Tris$ -буфер (рН 7,4), 0,1 мкМ тапсигаргін (селективний інгібітор Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФази ЕПР) (Fafula et al., 2012). Ензиматичну реакцію ініціювали внесенням до інкубаційного середовища аліквоти лімфоцитарної суміші – 100 мкл (кількість білка у пробі не перевищувала 50–100 мкг/мл). Тривалість інкубації – 1–15 хв. Ензиматичну реакцію зупиняли додаванням 1 мл охолодженого стоп-розчину такого складу: 1,5 М натрій ацетат, 3,7% формальдегід, 14% станол, 5% ТХО ($pI = 4.3$). Базальну Mg^{2+} -АТФазну активність лімфоцитів тестували в аналогічному середовищі інкубації, але за присутності 1 мМ оубаїну – селективного інгібітора Na^+ , K^+ -АТФази (Tan et al., 2006). Оубаїнчутливу Na^+ , K^+ -АТФазну активність обчислювали за різницею між величиною загальної АТФазної та базальної Mg^{2+} активності.

У дослідках контролем на несензиматичний гідроліз АТФ було стандартне середовище інкубації, яке не містило досліджуваної проби. Як контроль на кількість ендогенного неорганічного фосфору (P_i) в лімфоцитарній суміші використовували суспензію лімфоцитів у фізіологічному розчині. Кількість продукту реакції P_i визначали методом W. Rathbun та V. Bellach (Rathbun and Bellach, 1969) і виражали у мкмоль P_i /хв·мг протеїну.

Дослідження кінетичних властивостей ензиматичної реакції Na^+ , K^+ -активованої, Mg^{2+} -залежної АТФ-гідролізної реакції проводили у стандартному середовищі інкубації, модифікованому за фізико-

хімічними характеристиками чи складом відповідних компонентів (час інкубації, концентрації АТФ, Na^+ , K^+ , оубаїну). Всі експерименти з вивчення властивостей Na^+ , K^+ -АТФази ферментативної реакції проводили в режимі початкової швидкості V_0 (лінійність накопичення продукту P_i у часі).

Уявні кінетичні параметри, які характеризують реакцію вивільнення неорганічного фосфору під час Na^+ , K^+ -активованого, Mg^{2+} -залежного гідролізу АТФ – максимальну миттєву швидкість реакції V_0 , максимальну (платову) кількість утворення продукту реакції P_{max} та характеристичний час реакції (період напівнасичення) визначали як описано у статті (Keleti, 1990). Уявні кінетичні параметри, які характеризують Na^+ , K^+ -активовану, Mg^{2+} -залежну АТФ-гідралазу реакцію – константу активації іонами, константу Міхаеліса (K_m АТФ) та початкову максимальну швидкість реакції гідролізу АТФ визначали методом Лайнуївера – Берка (Keleti, 1990). Отримані концентраційні залежності швидкості ензиматичної реакції від досліджуваних реагентів реакції гідролізу будували в координатах: $\{1/V \text{ від } 1/S\}$, де S – задана концентрація реагенту, а V – швидкість ензиматичного гідролізу АТФ при заданій концентрації.

При визначенні ефективності впливу оубаїну на Na^+ , K^+ -АТФазу 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:

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

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

Кінетичні та статистичні розрахунки проводили у програмному забезпеченні MS Office. Результати досліджень обробляли загальноприйнятими методами варіаційної статистики з використанням t -критерію Стюдента. Рівняння прямої лінії, що найкраще апроксимує експериментальні дані, розраховували із використанням методу найменших квадратів. Абсолютне значення коефіцієнта кореляції становило 0,90–0,99. Достовірність розрахованих параметрів прямої перевіряли за F -критерієм Фішера: достовірною вважали апроксимацію, за якої $P \leq 0,05$.

У досліджах використовували реактиви АТФ, Нерес, Tris, оубаїн, тапсигаргін, ЕГТА (Sigma, США). Інші використані у досліджах реактиви були вітчизняного виробництва кваліфікації ЧДА та ХЧ.

Результати та їх обговорення

Із метою вивчення особливостей та механізму роботи Na^+ , K^+ -АТФази визначали максимальну миттєву швидкість реакції (V_0), максимальну (платову) кількість утворення продукту реакції (P_{max}) та характеристичний час реакції (τ) (Keleti, 1990; Fafula et al., 2012). Для встановлення цих кінетичних параметрів Mg^{2+} -залежного гідролізу АТФ, який каталізується Na^+ , K^+ -АТФазою лімфоцитів, досліджували динаміку накопичення продукту АТФ-гідралазної реакції. Для

цього суспензію лімфоцитів інкубували у стандартному середовищі інкубації протягом різних проміжків часу (1–15 хв). Дані експериментів показали, що кінетику Na^+ , K^+ -активованого Mg^{2+} -залежного гідролізу АТФ сапонін-перфорованими лімфоцитами віддзеркалюють криві, які мають тенденцію до насичення (рис. 1). Аналіз отриманих результатів дозволяє дійти висновку, що кінетика Na^+ , K^+ -активованого, Mg^{2+} -залежного гідролізу АТФ, каталізованого сапонін-перфорованими лімфоцитами, узгоджується із закономірностями реакції нульового порядку в діапазоні 0–5 хв: у цьому інтервалі часу графік залежності P_i від періоду інкубації є практично лінійним.

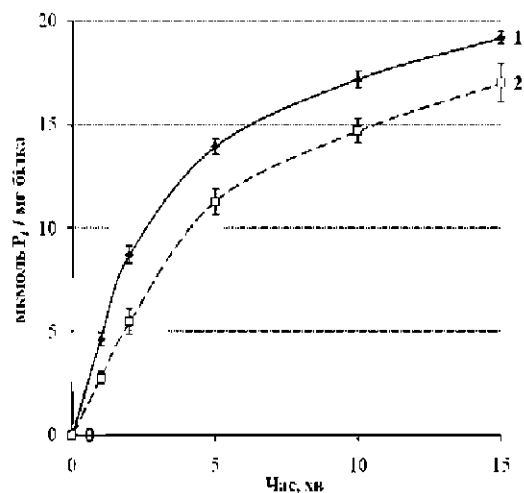


Рис. 1. Динаміка вивільнення неорганічного фосфору (P_i) у процесі Na^+ , K^+ -активованого, Mg^{2+} -залежного гідролізу АТФ сапонін-перфорованими лімфоцитами периферичної крові донорів (1), хворих на РсА до лікування (2) ($M \pm m$, $n = 4-6$)

Як випливає з рисунка 1, в усьому діапазоні часу кількість вивільненого неорганічного фосфору P_i оубаїнчутливою Na^+ , K^+ -АТФазою лімфоцитів хворих на РсА дещо нижча порівняно з величною у донорів. Шляхом лінеаризації отриманих даних у координатах P_i від P обчислено основні кінетичні характеристики реакції Na^+ , K^+ -активованого, Mg^{2+} -залежного гідролізу АТФ сапонін-перфорованими лімфоцитами (табл. 1).

Таблиця 1

Кінетичні параметри Na^+ , K^+ -активованого, Mg^{2+} -залежного гідролізу АТФ сапонін-перфорованими лімфоцитами периферичної крові донорів і хворих на РсА до проведеного лікування ($M \pm m$, $n = 4-6$)

Кінетичні параметри	Донори	РсА
V_0 , мкмоль P_i / хв · мг протеїну	$6,08 \pm 0,45$	$3,22 \pm 0,26^*$
P_{max} , мкмоль P_i / мг протеїну	$25,0 \pm 1,0$	$28,1 \pm 0,1$
τ , хв.	$4,18 \pm 0,51$	$9,40 \pm 0,65^*$

Примітки: V_0 – максимальна миттєва швидкість реакції, P_{max} – максимальна (платова) кількість продукту реакції, τ – характеристичний час реакції (період напівнасичення); зміни вірогідні стосовно величин у лімфоцитах в осіб групи контролю та хворих на РсА, * – $P < 0,05$.

Значення кінетичних параметрів Na^+ , K^+ -активованого, Mg^{2+} -залежного гідролізу АТФ сапонін-перфо-

рованими лімфоцитами донорів і хворих на ревматичне захворювання істотно відрізняються. За відсутності вірогідної різниці величини P_{max} гідролізу АТФ сапонін-перфорованими лімфоцитами, виділеними у донорів і хворих на РеА, нами показано, що значення V_0 у хворих на ревматичні захворювання істотно відрізняються від контрольної групи. На основі цих даних можна припустити, що у лімфоцитах периферичної крові хворих на РеА транспортування іонів Na^+ та K^+ відбувається повільніше і менш активно, але характеризується практично однаковою ємністю.

Згідно з результатами каталітичного титрування суспензії лімфоцитів розчином АТФ у діапазоні концентрацій 0,1–2,0 мМ (за сталої концентрації Mg^{2+} , 5 мМ) відбувається монотонне збільшення ензиматичної активності оубаїнчутливої Na^+ , K^+ -АТФази з виходом на плато (рис. 2). Можна бачити, що в усьому діапазоні досліджуваних концентрацій АТФ активність Na^+ , K^+ -АТФази хворих на ревматичне захворювання знижена порівняно із даною величиною у донорів.

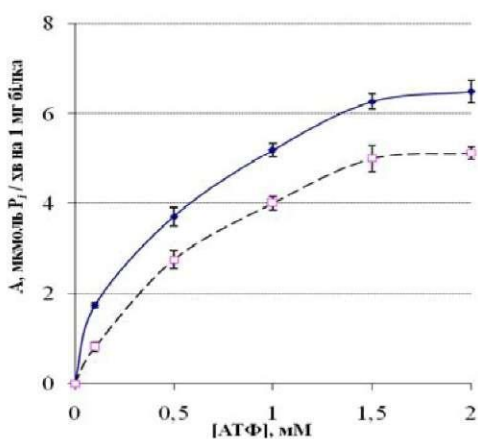


Рис. 2. Залежність впливу АТФ на активність оубаїнчутливої Na^+ , K^+ -АТФази сапонін-перфорованих лімфоцитів периферичної крові донорів (1) і хворих на РеА до лікування (2) ($M \pm m$, $n = 4-6$)

Для з'ясування можливого механізму зміни ензиматичної активності Na^+ , K^+ -АТФази в імуноткомпетентних клітинах хворих на РеА, шляхом лінеаризації отриманих даних у координатах Лайнуївера – Берка, проведено визначення основних кінетичних параметрів Na^+ , K^+ -активованого Mg^{2+} -залежного гідролізу АТФ сапонін-перфорованими лімфоцитами периферичної крові донорів і хворих (табл. 2).

Таблиця 2

Кінетичні параметри, які характеризують Na^+ , K^+ -активованій Mg^{2+} -залежний гідроліз АТФ сапонін-перфорованими лімфоцитами периферичної крові донорів і хворих на РеА від концентрації АТФ ($M \pm m$, $n = 4-8$)

Кінетичні параметри	Донори	РеА
V_{max} мкмоль P/хв · мг протеїну	$6,30 \pm 0,14$	$7,76 \pm 0,58$
K_{ATP} , мМ	$0,27 \pm 0,01$	$0,79 \pm 0,05$ *

Примітки: V_{max} – початкова максимальна активність ензиму, K_{ATP} – константа Міхаеліса за АТФ; * – зміни вірогідні стосовно величин у лімфоцитах осіб групи контролю ($P < 0,05$).

Величини K_{ATP} знаходяться в діапазоні концентрацій 10^{-3} М, що відповідає фізіологічній концентрації $MgATP$ у цитоплазмі. Розрахунок кінетичних параметрів оубаїнчутливої Na^+ , K^+ -АТФазної активності свідчить, що максимальна швидкість гідролізу АТФ сапонін-перфорованими лімфоцитами периферичної крові донорів і хворих на РеА, визначена за АТФ, практично не відрізняється у нормі та при патології. Водночас константа афінності до АТФ у лімфоцитах периферичної крові хворих на РеА значно зростає (у 2,9 раза порівняно з практично здоровими донорами).

При інтерпретації отриманих даних з урахуванням кінетичних параметрів, визначених за АТФ, ми дійшли висновку, що за умов розвитку ревматичної патології в імуноткомпетентних клітинах інгібування активності досліджуваної ензиматичної системи відбувається не за рахунок зменшення числа оборотів ензиму, а за рахунок підвищення спорідненості оубаїнчутливої Na^+ , K^+ -АТФази до АТФ. Оскільки центр гідролізу АТФ локалізований на цитоплазматичній поверхні мембрани, ми припускаємо, що однією з можливих причин конкурентного інгібування ензиму може бути вплив на ензим з боку інших патологічних змін і процесів у лімфоцитах, які мають місце при ревматичній патології. Під час запалення або дії цитотоксичних факторів у позаклітинному оточенні можуть створюватися високі локальні концентрації АТФ (Bodin and Burlstock, 2001). Можливо, такі зміни концентрацій АТФ і ведуть до зростання спорідненості оубаїнчутливої Na^+ , K^+ -АТФази до АТФ.

При вивченні впливу різних концентрацій іонів Na^+ , K^+ (мМ/мМ) на питому ензиматичну активність оубаїнчутливої Na^+ , K^+ -АТФази частину KCl в інкубаційному середовищі ізотонічно замінювали на $NaCl$ (сумарна концентрація $Na^+ + K^+ = 150$ мМ). Графік залежності Na^+ , K^+ -АТФази лімфоцитів периферичної крові донорів і хворих на РеА та АСА має типовий куполоподібний вигляд (рис. 3). Оптимальним для функціонування ензиму є співвідношення іонів $125 K^+ : 25 Na^+$. У разі відсутності одного з іонів в інкубаційному середовищі Na^+ , K^+ -АТФаза не тестується.

Графіки залежності оубаїнчутливої Na^+ , K^+ -АТФазної активності лімфоцитів периферичної крові донорів і хворих на РеА від співвідношення іонів Na^+ і K^+ (за ізотонічних умов $Na^+ + K^+ = 150$ мМ) у висхідній частині калієвої компоненти кривих лінеаризовано у координатах Лайнуївера – Берка.

Розрахунок кінетичних параметрів оубаїнчутливої Na^+ , K^+ -АТФазної активності свідчить, що початкова максимальна швидкість гідролізу АТФ сапонін-перфорованими лімфоцитами периферичної крові донорів і хворих на РеА, визначена за K^+ , і уявна константа активації іонами K^+ у лімфоцитах периферичної крові хворих на РеА вірогідно відрізняються порівняно з практично здоровими донорами. Це відповідає змішаному типу інгібування ензиму.

Інтерпретуючи отримані дані з урахуванням кінетичних параметрів, визначених за K^+ , ми дійшли висновку, що за умов розвитку ревматичної патології в імуноткомпетентних клітинах інгібування активності досліджуваної ензиматичної системи відбувається внаслідок зменшення числа оборотів ензиму. 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 їх експресії у мембрані) або зменшенням кількості обертів ензиму. Зниження величини уявної константи активації K_K^+ за умов ревматичної патології вказує на збільшення спорідненості Na^+ , K^+ -АТФази до іонів калію. Подібні результати отримані дослідниками для H^+/K^+ -АТФази парієтальних клітин при розвитку експериментальної виразки шлунка (Strocka et al., 2010). Враховуючи те, що центр спорідненості до іонів K^+ локалізований на зовнішньоклітинній поверхні мембрани, ми припускаємо, що зміни афінності до іонів K^+ (і відповідно інгібування ензиматичної активності Na^+ , K^+ -АТФази) спричинені також позаклітинними впливами на структуру мембрани.

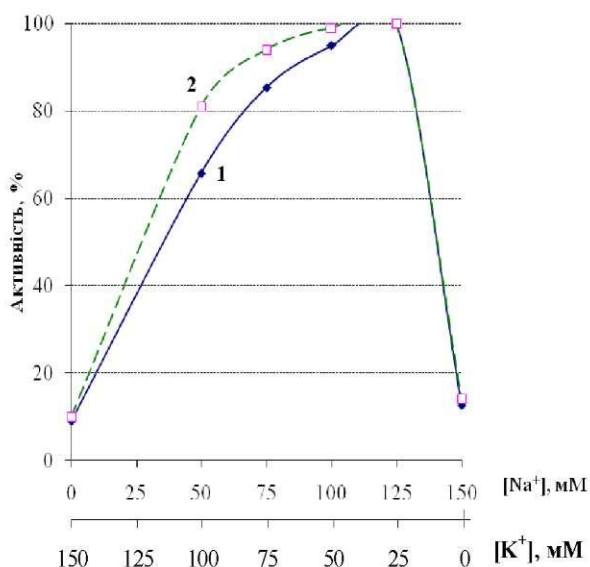


Рис. 3. Вплив зміни співвідношення іонів Na^+ і K^+ (за ізотонічних умов $Na^+ + K^+ = 150$ мМ) на активність оубаїнчутливої Na^+ , K^+ -АТФази сапонін-перфорованих лімфоцитів периферичної крові донорів (1) і хворих на РеА (2) ($M \pm m, n = 4$; за 100% прийнято ензиматичну активність за оптимального співвідношення іонів Na^+ і K^+)

Na^+ , K^+ -активована Mg^{2+} -залежна АТФаза, яка поєднує транспортно-гідролітичну та рецепторну функції, специфічно взаємодіючи з екзогенними інгібіторами – серцевими глікозидами або їх ендогенними аналогами (Karlija et al., 2006; Valente et al., 2003). Кардіоактивний стероїд оубаїн належить до високоселективного інгібітора Na^+ , K^+ -АТФази. Оубаїн зв'язується з ензимом із зовнішнього боку цитоплазматичної мембрани. Вважають, що оубаїн блокує ензим у конформації $P-E_2$, гальмуючи у такий спосіб перехід ензиму в інший конформаційний стан $P-E_1$. Оубаїн в інтервалі концентрацій $10^{-6} - 10^{-3}$ М дозозалежно пригнічує оубаїнчутливу Na^+ , K^+ -АТФазу активність лімфоцитів периферичної крові донорів і хворих на ревматичні захворювання (рис. 4). Характер інгібування оубаїном для ензиму у нормі та при патології однаковий. Для з'ясування параметрів інгібування Na^+ , K^+ -

АТФази оубаїном проведено лінеаризацію концентраційних кривих у координатах Хілла. Параметри інгібування відповідали високочутливому до оубаїну фенотипу Na^+ , K^+ -АТФази, який визначається подібністю структури рецепторної ділянки і є характерним для всіх ізоензимів Na^+ , K^+ -АТФази у людини (Karlija et al., 2006).

Таблиця 3

Кінетичні параметри, які характеризують Na^+ , K^+ -активованій, Mg^{2+} -залежний гідроліз АТФ сапонін-перфорованими лімфоцитами периферичної крові донорів і хворих на РеА від зміни співвідношення іонів Na^+ і K^+ (за ізотонічних умов $Na^+ + K^+ = 150$ мМ, $M \pm m, n = 4-8$)

Кінетичні параметри	Донори	РеА
V_{max} , мкмоль P_i / хв · мг протеїну	$7,74 \pm 0,29$	$5,62 \pm 0,26^*$
K_K^+ , мМ	$66,8 \pm 3,4$	$27,6 \pm 2,28^*$

Примітки: V_{max} – початкова максимальна активність ензиму, K_K^+ – уявна константа активації іонами K^+ ; * – зміни вірогідні стосовно величин у лімфоцитах осіб групи контролю ($P < 0,05$).

Значення уявної константи інгібування оубаїном і коефіцієнт Хілла в лімфоцитах периферичної крові донорів і хворих на РеА вірогідно не відрізняються. Отже, Na^+ , K^+ -АТФаза лімфоцитів периферичної крові хворих на РеА зберігає свої нативні рецепторні властивості – чутливість до інгібування оубаїном не змінюється. Збереження нативних рецепторних властивостей Na^+ , K^+ -АТФази до оубаїну показано у клітинах карциноми товстої кишки людини (Karlija et al., 2007). Іншими дослідниками показано, що має місце зміна кінетики зв'язування оубаїну з Na^+ , K^+ -АТФазою лімфоцитів у хворих на мігрень, і це може бути корисним інструментом у діагностиці мігрені (Scarfone et al., 2007).

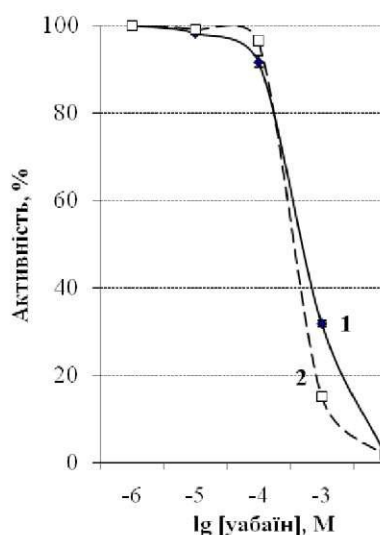


Рис. 4. Інгібування оубаїном Na^+ , K^+ -АТФазної активності сапонін-перфорованих лімфоцитів периферичної крові донорів (1) та хворих на РеА (2) ($M \pm m, n = 6$)

За 100% прийнято ензиматичну активність Na^+ , K^+ -АТФази за відсутності в інкубаційному середовищі оубаїну.

Висновки

У лімфоцитах периферичної крові хворих на РСА первинно-активне транспортування іонів Na^+ , K^+ відбувається повільніше і менш інтенсивно порівняно зі здоровими донорами, але характеризується практично однаковою ємністю з донорами. За умов розвитку ревматичної патології константа афінності Na^+ , K^+ -АТФази до АТФ у лімфоцитах периферичної крові хворих на РСА зростає порівняно з практично здоровими донорами. Водночас, Mg^{2+} -зв'язувальна ділянка оубаїн-чутливої Na^+ , K^+ -АТФази лімфоцитів хворих на РСА залишається нативною. Відмічається також зниження афінності Na^+ , K^+ -АТФази лімфоцитів периферичної крові до іонів K^+ і збереження рецепторних властивостей до оубаїну у хворих на РСА. Наведені експериментальні дані можуть бути використані для подальшого з'ясування мембранних механізмів іонного обміну в імункомпетентних клітинах при аутоімунних захворюваннях.

Бібліографічні посилання

- Berezhnyi, V.V., Marushko, T.V., Marushko, J.V., 2013. Clinical rheumatology. Kyiv (in Ukrainian).
- Bodin, P., Burnstock, G., 2001. Purinergic signalling: ATPase. *Neurochem. Res.* 26(15), 959–969.
- Boyum, A., 1968. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 21(97), 77–79.
- Colmegna, I., Espinoza, L., 2005. Recent advances in reactive arthritis. *Curr. Rheumatol. Rep.* 7(3), 201–207.
- Fafula, R.V., Efremova, U.P., Lychkovska, N.I., Vorobets, Z.D., 2012. Kinetic properties of Na^+ , K^+ -activated, Mg^{2+} -dependent ATP-hydrolysis of blood lymphocytes in patients with rheumatoid arthritis and ankylosing spondyloarthritis. *Ukr. Biochem. J.* 84(3), 44–54 (in Ukrainian).
- Hamdulau, S.S., Glyme, S.J., Keat, A., 2006. When is arthritis reactive? *Postgrad. Med. J.* 82(969), 446–453.
- Kaplya, A.A., Kudryavceva, A.G., Gorchev, V.F., Osinsky, D.C., Hizhnyak, S.V., 2006. Determination of Na^+ , K^+ -ATPase activity in human colorectal carcinoma. *Ukr. Biochem. J.* 78(2), 142–148 (in Ukrainian).
- Keleti, T., 1990. General of enzymatic kinetics. Mir, Moscow (in Russian).
- Kim, P.S., Klausmeier, T.L., Orr, D.P., 2009. Reactive arthritis. *Therapia* 11(41), 38–44.
- Kohnke, S.J., 2004. Reactive arthritis. A clinical approach. *Orthop. Nurs.* 23(4), 274–280.
- Kovalenko, V.M., 2011. Optimisation of swelling and inflammatory joint syndromes' treatment in patients with rheumatic joint diseases. *Ukr. Rheumat. J.* 44(2), 74–78 (in Ukrainian).
- Leirisalo-Repo, M., 2005. Reactive arthritis. *Scand. J. Rheumatol.* 34(4), 251–259.
- Leirisalo-Repo, M., Sieper, J., 2006. Reactive arthritis: Epidemiology, clinical features, and treatment. Spondylites and the spondyloarthropathies. Philadelphia, Mosby Elsevier, 53–64.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193(1), 265–275.
- Lychkovska, N., Fafula, R., Efremova, U., Vorobets, Z.D., 2011. A study of Na^+ , K^+ -ATPase and arginase activity in peripheral blood lymphocytes in patient with rheumatic diseases. *Annales Universitatis Mariae Curie-Sklowowska* 24(1), 171–177.
- Melnyk, O.V., Lychkovska, N.I., Kornijchuk, O.P., Vorobets, Z.D., 2012. ATP-hydrolase lymphocytes of peripheral blood activities in patient with reactive arthritis. *Bukov. Med. Visnyk* 16(3), 50–53.
- Mishell, B.B., Shiigi, S.M., 1980. Selected methods in cellular immunology. W.H. Freeman & Co, San Francisco.
- Rathbun, W., Betlach, V., 1969. Estimation of enzymically produced orthophosphate in the presence of cysteine and adenosine triphosphate. *Anal. Biochem.* 28, 436–447.
- Spaska, G.O., 2011. Reactive arthritis: Modern look on the problem. *Ukr. Med. Chasopys* 6(86), 82–88 (in Ukrainian).
- Scarrone, S., Podestà, M., Cupello, A., Finocchi, C., Frassoni, F., 2007. Abnormalities of Na^+ , K^+ -ATPase in migraine aura. *Cephalalgia* 27(2), 128–132.
- Tian, J., Cai, T., Yuan, Z., Wang, H., Liu, L., 2006. Binding of Src to Na^+ , K^+ -ATPase form a functional signaling complex. *Mol. Biol. Cell.* 17, 317–326.
- Valente, R.C., Capella, L.S., Monteiro, R.Q., 2003. Mechanism of ouabain toxicity. *Faseb. J.* 17(12), 1700–1702.
- Zeidler, H., Kuipers, J., Kohler, L., 2004. Chlamidia-induced arthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* 16(4), 380–392.

Надійшла до редколегії 15.11.2013