



О.В. Мельник¹, О.П. Корнійчук¹, П.П. Ковальський², З.Д. Воробець¹

NO-синтазний шлях метаболізму L-аргініну в лімфоцитах крові хворих на реактивний артрит

¹ Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького

² ДЗ «Вузлова лікарня станції Стрий

ДТГО «Львівська залізниця», м. Стрий, Львівська область

Мета роботи — дослідити активність ензимів окисного шляху метаболізму L-аргініну в лімфоцитах периферичної крові хворих на реактивний артрит (ReA) і вивчити кінетичні властивості NO-синтаз.

Матеріали та методи. Дослідження здійснювали на лімфоцитах периферичної крові пацієнтів, хворих на реактивний артрит (n = 11), та практично здорових осіб (n = 16). Пермеабілізацію лімфоцитів проводили сапоніном. У лімфоцитах визначали активність ендотеліальної та індукційної NO-синтази.

Результати та обговорення. Встановлено оптимальні умови функціонування ендотеліальної (eNOS) та індукційної (iNOS) NO-синтаз. Показано, що розвиток ревматичної патології супроводжується дисбалансом у системі синтезу NO в лімфоцитах крові. У пацієнтів з ReA активність eNOS в лімфоцитах знижується в 1,9 разу. На тлі інгібування активності eNOS при ReA спостерігається різке зростання активності індукційної ізоформи NO-синтази. Проведено аналіз кінетичних властивостей NOS лімфоцитів крові пацієнтів з реактивним артритом. Показано, що при ревматичній патології уявна константа спорідненості iNOS до L-аргініну в 3,1 разу нижча, ніж для eNOS лімфоцитів крові осіб групи контролю, а інгібування активності eNOS відбувається за конкурентним типом — за рахунок зниження кількості обертів ензиму.

Висновки. За умов розвитку ревматичної патології в лімфоцитах крові відбувається зниження активності eNOS і компенсаторне зростання активності iNOS. Порушення метаболізму L-аргініну свідчить про дисметаболічні зміни в системі синтезу NO, а саме його гіперпродукцію. Рівень активності NOS та концентрація NO поряд з іншими параметрами можуть свідчити про функціональний стан клітини та бути прогностичними показниками для діагностування й оцінки ефективності фармакотерапії в ревматичній патології.

Ключові слова: реактивний артрит, лімфоцити, NO-синтаза, L-аргінін, оксид азоту.

У патогенезі реактивного артриту (ReA) центральна роль відводиться імунним порушенням, зокрема пов'язаним із функціонуванням T-лімфоцитів, і порушенням метаболічних процесів, які розвиваються внаслідок хламідійної чи іншої інфекції [3, 5, 6, 10, 19]. На сучасному етапі розвитку біології та медицини роль нітрогену (II) оксиду (NO) як універсального клітинного і тканинного метаболіту під час розвитку ревматичних захворювань не викликає сумніву [19].

Обмін L-аргініну може здійснюватися шляхом окисного перетворення (за участю NO-синтази EC 1.14.13.39 (NOS) до NO та L-цитруліну) і неокисного (за участю аргінази EC 3.5.3.1 до сечовини та орнітину) [11]. Співвідношення між цими ензимами забезпечує у клітинах певний фізіологічний пул L-аргініну, а також генерацію активних форм нітрогену, який забезпечує функціональну активність імунокомпетентних клітин [6, 11].

Розрізняють конститутивну ізоформу NOS (cNOS) та індукційну NOS (iNOS) [16—18]. Конститутивні NOS менш потужні ензими, ніж індукційні, їх поділяють на нейрональну (nNOS) та ендотеліальну (eNOS) ізоформи. Більшість типів клітин організму людини мають одну або декілька ізоформ NOS. Ці ізоензими експресуються як продукти різних генів, локалізованих в окремих хромосомах. Відмінності ко- та посттрансляційних модифікацій можуть впливати на внутрішньоклітинну локалізацію та активність ізоформ NOS.

Найбільш адекватна модель для вивчення патологічних змін в організмі та регуляторних механізмів — лімфоцити периферичної крові, які розташовуються переважно в одній фазі клітинного циклу (G_0), у звичайних умовах не діляться, легко піддаються культивуванню та об'єктивно відображають генетичний гомеостаз організму. Відомо, що внутрішньоклітинний метаболізм лімфоцитів ґрунтується на фізіологічно й біохімічно закріпленій здатності цих клітин швидко реагувати на будь-які зміни гомеостазу в організмі, а модуляція активності ензимів у лімфоцитах настає

Стаття надійшла до редакції 14 березня 2014 р.

Ковальський Петро Петрович
82460, Львівська область, Стрийський район, с. Стрілків
E-mail: pk_petro@ukr.net

значно раніше, ніж змінюються їх морфологічні та біохімічні показники [8, 18]. Це дає змогу використовувати лімфоцити як «метаболічне дзеркало організму».

Мета роботи — дослідити активність ензимів окисного шляху метаболізму L-аргініну в лімфоцитах периферичної крові хворих на реактивний артрит і вивчити кінетичні властивості NO-синтаз.

Наукове дослідження становить собою фрагмент науково-дослідної роботи кафедри медичної біології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького: «Дослідження функціонально-метаболічних резервів стреслімітуючих систем організму за екстремальних умов з метою виявлення ефективних способів їх корекції», номер державної реєстрації 0111U000121.

Матеріали та методи

Дослідження проводили на лімфоцитах периферичної крові пацієнтів, хворих на РеА ($n = 11$), які перебували на стаціонарному лікуванні в ревматологічному відділенні Львівської обласної клінічної лікарні. Групу контролю становили практично (клінічно) здорові особи віком 20—30 років ($n = 16$). Усі пацієнти та особи групи контролю давали інформовану згоду на участь у дослідженні.

Моноядерні лімфоцити периферичної крові виділяли з гепаринізованої свіжоотриманої крові пацієнтів з РеА та осіб групи контролю у градієнті густини фікол-тріумбасту ($\rho = 1,08 \text{ г/см}^3$) [13]. Цілісність і життєздатність лімфоцитів крові, яка в усіх дослідах становила не менше 95 %, оцінювали за забарвленням трипановим синім.

Активність NOS визначали на пермеабілізованих сапоніном лімфоцитах крові. Для пермеабілізації мембран лімфоцитів і розкриття ензиматичних активностей лімфоцити інкубували протягом 10 хв при помірному струшуванні в розчині, який містив сапонін у концентрації 0,1 %. Такий методологічний підхід до визначення активностей як мембранозв'язаних, так і цитозольних ензимів лімфоцитів крові був апробований дослідниками нашої лабораторії раніше й підтверджений ультраструктурним дослідженням [12]. Вміст протеїну в лімфоцитарній суміші визначали методом Лоурі [14].

Активність NOS у пермеабілізованих лімфоцитах визначали в реакційній суміші: 80 мМ трис-НСІ буфер (рН 7,4), 5 мМ CaCl_2 , 0,15 мМ L-Arg, 0,12 мМ NADPH. Кількість білка у пробі не перевищувала 50—75 мкг. Реакцію ініціювали внесенням аліквоти лімфоцитів крові в реакційну суміш. Різниця між величинами окиснення NADPH з L-Arg та з інгібітором L-NAME відображає величину окиснення NADPH, тобто активність сумар-

ної NOS. Дослідні проби спектрофотометрували проти контрольних при 340 нм, потім інкубували 20 хв при 37° С, зупиняли реакцію внесенням 0,05 мл 1,5 М HClO_4 і реєстрували зниження екстинції [9]. Активність NOS виражали у нмолях NADPH, що окислювався протягом 1 хв на 1 мг протеїну лімфоцитів.

Активність Ca^{2+} -незалежної ізоформи NOS, яка згідно з даними літератури відповідає індукційній ізоформі NOS (iNOS), визначали аналогічно, додаючи в інкубаційне середовище хелатор Ca^{2+} ЕГТА (4 мМ) замість CaCl_2 . Активність Ca^{2+} -залежної ізоформи NOS, що згідно з даними літератури відповідає конститутивній ізоформі NOS (cNOS), розраховували як різницю між загальною активністю NOS і активністю Ca^{2+} -незалежної ізоформи NOS.

Кінетичні властивості NOS вивчали в стандартному середовищі інкубації, що було модифіковане за часом інкубації (0—30 хв) та концентрацією субстрату (0,1 до 30 мкМ). Уявні кінетичні параметри, які характеризують NO-синтазну реакцію, — максимальну миттєву швидкість реакції V_0 , максимальну (платову) кількість утворення продукту реакції P_{max} та характеристичний час реакції τ визначали, як описано у статті С.А. Костеріна та Н.Ф. Бурчинської [7]. Уявні кінетичні параметри, які характеризують NO-синтазну реакцію, — уявну константу спорідненості (афінності) до L-аргініну $K_{L\text{-Arg}}$ та максимальну швидкість реакції V_{max} , визначену L-аргініном, розраховували в координатах Лайнуївера-Берка [4].

Кінетичні та статистичні розрахунки здійснювали в режимі програмного забезпечення MS Office. Для оцінки достовірності різниці між статистичними характеристиками двох експериментальних сукупностей даних визначали коефіцієнт Стюдента, а вірогідними вважали зміни при рівні значущості $p < 0,05$. Рівняння прямої лінії, що найкраще апроксимує експериментальні дані, розраховували із використанням методу найменших квадратів. Абсолютне значення коефіцієнта кореляції r становило 0,85—0,95. Достовірність розрахованих параметрів прямої перевіряли за F-критерієм Фішера: достовірною вважали апроксимацію, за якої $p \leq 0,05$.

Результати та обговорення

Згідно з даними літератури, у лімфоцитах крові ідентифіковано всі ізоформи NOS [18]. У результаті проведених досліджень встановлено, що активність eNOS лімфоцитів крові практично здорових осіб становить $(74,6 \pm 6,38)$ нмоль NADPH(H^+)/хв • мкг протеїну (табл. 1).

Аналіз літературних даних свідчить про значну варіабельність абсолютних значень ензиматичної

активності NOS лімфоцитів крові, що зумовлено різноманітними методологічними підходами до вивчення активності ензиму.

Відомо, що eNOS продукує низькі концентрації NO, у той час як iNOS синтезує високі концентрації NO (> 300 нМ) [17]. iNOS є кальцій-незалежною ізоформою NOS і, на відміну від eNOS, не експресується постійно (конститутивно). Встановлено, що активність iNOS лімфоцитів крові здорових осіб ідентифікується незначною мірою та становить ($1,32 \pm 0,18$) нмоль NADPH(H⁺)/хв на мг протеїну.

У лімфоцитах крові пацієнтів з РеА активність eNOS знижується в 1,9 разу і становить ($39,6 \pm 2,6$) нмоль NADPH(H⁺)/хв на мг протеїну. На тлі інгібування eNOS у лімфоцитах крові пацієнтів з РеА спостерігається різке зростання активності iNOS до рівня ($152,3 \pm 14,4$) нмоль NADPH(H⁺)/хв на мг протеїну. Зростання активності iNOS лімфоцитів свідчить про зміни функціональної активності імункомпетентних клітин і порушення метаболічних процесів.

Раніше вважали, що NOS-залежний синтез фізіологічно необхідного NO («базальний NO») здійснюється за участю eNOS і nNOS, а NOS-залежний синтез додаткових кількостей NO в клітині за розвитку різних патологічних станів реалізується за участю iNOS. Тому активація iNOS виступає складовою ланкою численних адаптаційно-захистних реакцій клітини й організму. Проте підтверджено участь iNOS у фізіологічному («базальному») синтезі NO, а також участь eNOS і nNOS під час гіперсинтезу NO за інфекційних, алергічних та автоімунних захворювань. Тому говорять про «базальну» NO-синтазну активність iNOS у регуляції фізіологічних функцій, зокрема в регуляції судинного тонуусу.

Отримані нами результати вказують на порушення NO-синтазної системи лімфоцитів крові, які ведуть до дисбалансу регуляторних систем лімфоцитів, зокрема регуляторної функції NO. Зростання активності iNOS, очевидно, викликає компенсаторне зниження активності eNOS та свідчить про гіперпродукцію NO в лімфоцитах крові за умов розвитку ревматичної патології. NO, що утворюється в надмірній кількості при патологічних станах організму, має виражену цитотоксичну дію внаслідок утворення пероксинітриту — продукту взаємодії NO та супероксиданіон-радикала, здатного до деструкції практично всіх компонентів клітини.

З огляду на те, що клітинна продукція NO в імункомпетентних клітинах повністю залежить від наявності L-аргініну [16], різке зростання активності iNOS та аргінази в лімфоцитах крові

Таблиця 1
Активність NO-синтаз у лімфоцитах периферичної крові у групі практично здорових осіб та у хворих на реактивний артрит (M ± m)

Активність ензиму	Група практично здорових осіб (n = 16)	Хворі на РеА (n = 11)
eNOS, нмоль NADPH(H ⁺)/хв*мг протеїну	74,6 ± 6,38	39,6 ± 2,6*
iNOS, нмоль NADPH(H ⁺)/хв*мг протеїну	1,32 ± 0,18	152,3 ± 14,4*

Примітка.* — p < 0,05 порівняно з групою практично здорових осіб.

пацієнтів з РеА, імовірно, пов'язане зі збільшенням концентрації субстрату цих ензимів.

L-аргінін — єдиний субстрат для синтезу NO всіма формами NOS. Доступність внутрішньоклітинного L-аргініну слугує обмежувальним фактором NO-синтезу і потенційним механізмом контролю регуляторної функції NO, оскільки більшість типів клітин не здатні синтезувати L-аргінін і потребують його екзогенного надходження. L-аргінін виступає ключовою молекулою в низці інших метаболічних, а також регуляторних і сигнальних шляхів, які зазнають серйозних змін за ревматичної патології [6].

Таблиця 2
Кінетичні параметри NOS-реакції лімфоцитів крові у групі практично здорових осіб та у хворих на реактивний артрит (M ± m)

Кінетичні параметри NOS-реакції лімфоцитів крові	Група практично здорових осіб (n = 16)	Хворі на РеА (n = 11)
eNOS		
V ₀ , нмоль NADPH(H ⁺)/хв*мг протеїну	98,0 ± 7,2	48,6 ± 4,5 *
P _{max} , нмоль NADPH(H ⁺)/мг протеїну	3512 ± 306	1414,3 ± 116,4 *
τ, хв	36,4 ± 4,9	46,9 ± 3,8 *
iNOS		
V ₀ , нмоль NADPH(H ⁺)/хв*мг протеїну	—	319,6 ± 29,0
P _{max} , нмоль NADPH(H ⁺)/мг протеїну	—	2406,4 ± 107,8
τ, хв	—	9,5 ± 0,7

Примітка.* — p < 0,05 порівняно з групою практично здорових осіб.

Таблиця 3
Кінетичні параметри NOS лімфоцитів крові у групі практично здорових осіб та у хворих на реактивний артрит, визначені за L-аргініном ($M \pm m$)

Кінетичні параметри	Група практично здорових осіб (n = 16)	Хворі на РеА (n = 11)
eNOS		
V_{max} , нмоль NADPH(H ⁺)/хв·мг протеїну	235,6 ± 44,0	150,1 ± 11,8 *
K_{L-Arg} , мкМ	14,6 ± 2,7	25,2 ± 3,0
iNOS		
V_{max} , нмоль NADPH(H ⁺)/хв·мг протеїну	—	274,5 ± 16,3
K_{L-Arg} , мкМ	—	4,7 ± 0,2

Примітка. * — $p < 0,05$ порівняно з групою практично здорових осіб.

Водночас показано, що позаклітинний аргінін також відіграє важливу роль у регуляції синтезу NO [2].

Концентрація внутрішньоклітинного L-аргініну становить 1–2 мМ і залежить від активності його надходження з їжею, його синтезу (ресинтезу) в організмі, його активного транспортування в клітини крізь плазматичну мембрану та активності аргінін-деградуючих ензимів. Катаболізм протеїнів та/або ресинтез L-аргініну із цитруліну в L-цитруліновому циклі можуть тією чи тією мірою компенсувати дефіцит L-аргініну для підтримання його сталого рівня. Незважаючи на те, що внутрішньоклітинна концентрація L-аргініну в декілька разів перевищує величини K_{L-Arg} для NOS, активність ензиму значно залежить від надходження аргініну із зовнішньоклітинного середовища (так званий «аргініновий парадокс») та від «бідоступності» L-аргініну для NOS у клітині [15].

Підвищена активність iNOS при патологічних станах може викликати таке зниження доступності аргініну, яке ставить під загрозу T-лімфоцитарну функцію та продукцію NO, що веде до збільшеної сприйнятливості до інфекції [16].

Таким чином, зростання активності iNOS лімфоцитів крові пацієнтів з РеА свідчить про загальну потребу клітин в L-аргініні. Патологічне зростання швидкості iNO-синтазної реакції на тлі зниження швидкості eNO-синтазної реакції може свідчити про збільшення бідоступності ендogenous пула L-аргініну.

Зміни активності NOS ензиматичної системи лише вказують на спрямованість дисметаболических

порушень у системі NO-гомеостазу. Проте біохімічні механізми, що ведуть до змін функціональної активності досліджуваних ензиматичних систем, залишаються не з'ясованими. Тому наступний етап нашого дослідження був присвячений вивченню кінетичних властивостей eNOS та iNOS ізоформ лімфоцитів крові.

З метою вивчення особливостей і механізму роботи NOS 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 NOS досліджували динаміку зменшення NADPH(H⁺), що свідчить про синтез NO. Для цього суспензію лімфоцитів інкубували в стандартному середовищі інкубації протягом різних проміжків часу (0–30 хв).

Результати досліджень показали, що кінетичні криві утворення NO у процесі NO-синтазної реакції лімфоцитів крові мають тенденцію до насичення (рис. 1). Видно, що кінетика утворення NO за участю eNOS узгоджується із закономірностями реакції нульового порядку в діапазоні 0–10 хв: у цьому інтервалі часу графік залежності утворення NO від періоду інкубації практично лінійний. Тому в подальших експериментах тривалість інкубації лімфоцитів і, відповідно, NO-синтазної реакції становила 10 хв. Як видно з рис. 1, динаміка й кількість утворення NO за участю eNOS лімфоцитів крові пацієнтів з РеА суттєво нижчі, ніж в осіб групи контролю. Водночас у всьому діапазоні фактора часу утворення NO за участю iNOS лімфоцитів крові хворих на РеА значно перевищує ці величини для eNOS.

Шляхом лінеаризації отриманих даних у координатах P/t від P обчислено основні кінетичні характеристики NOS-реакції лімфоцитів крові

Значення кінетичних параметрів для eNOS та iNOS, а також для eNOS лімфоцитів крові у групі практично здорових осіб і хворих на РеА істотно відрізняються між собою. Як видно із даних табл. 2, синтез NO за участю iNOS відбувається значно інтенсивніше, ніж за участю eNOS. А синтез NO за участю eNOS при онкопатології відбувається повільніше й менш активно, ніж у нормі.

Отримані кінетичні параметри підтверджують дані, що в лімфоцитах крові хворих на РеА гіперсинтез NO відбувається за участю iNOS, а «базальний» синтез NO в нормальних фізіологічних умовах відбувається за участю eNOS.

Зміни концентрації L-аргініну в інкубаційному середовищі, вірогідно, впливають на швидкість NO-синтазної реакції. У цьому плані важливою характеристикою NOS виступає залежність активності ензиму від концентрації субстрату в середо-

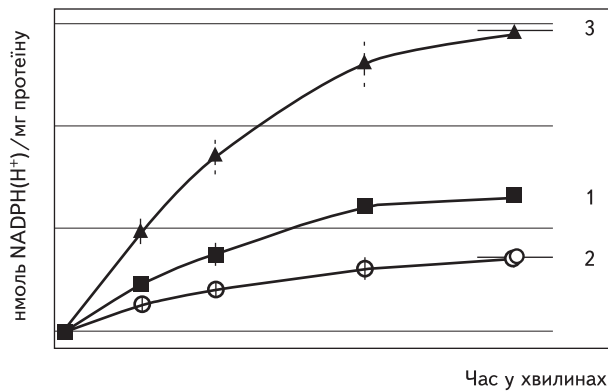


Рис. 1. Динаміка споживання NADPH(H⁺) у процесі NO-синтазної реакції лімфоцитів крові осіб групи контролю (1 — eNOS) та пацієнтів з реактивним артритом (2 — eNOS, 3 — iNOS)

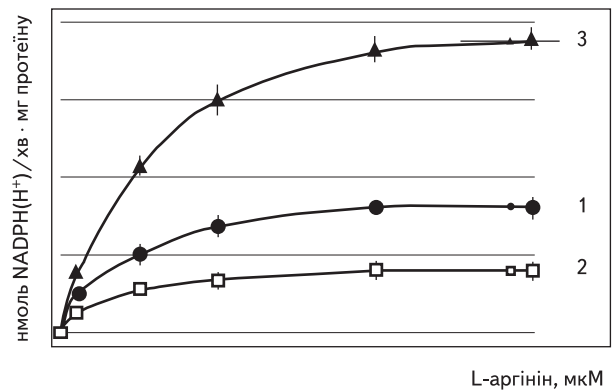


Рис. 2. Концентраційна залежність впливу L-аргініну на NO-синтазну активність лімфоцитів крові осіб групи контролю (1 — eNOS) та пацієнтів з реактивним артритом (2 — eNOS, 3 — iNOS)

вищі інкубації, яка визначається величиною уявної константи спорідненості (афінності) до субстрату K_{L-Arg} . Останню розраховували шляхом визначення питомої NOS-активності в середовищі інкубації, яке містило L-аргінін у діапазоні концентрацій від 0,1 до 30 мкМ (за сталої концентрації $CaCl_2$ — 10 мМ та NADPH — 0,12 мМ).

З'ясовано, що підвищення концентрації L-аргініну в середовищі інкубації в діапазоні концентрацій від 0,1 до 30 мкМ веде до поступового зростання швидкості NO-синтазної реакції за участю обох ізоформ NOS з виходом на плато (рис. 2).

Максимальна активність eNOS лімфоцитів крові практично здорових осіб та iNOS лімфоцитів крові хворих на РеА тестується за наявності 20 мкМ L-аргініну в інкубаційному середовищі. Активність eNOS лімфоцитів крові пацієнок з РеА виходить на плато за значно нижчих концентрацій субстрату.

Шляхом лінеаризації отриманих концентраційних залежностей у координатах Лайнуївера-Берка визначено основні кінетичні параметри NOS лімфоцитів крові (табл. 3).

Як впливає з даних табл. 3, значення V_{max} для eNOS лімфоцитів крові осіб групи контролю в 1,6 разу перевищує цю величину для eNOS лімфоцитів крові пацієнтів з РеА. Водночас значення K_{L-Arg} для обох досліджуваних груп достовірно не відрізняються між собою, що свідчить про те, що за наявності онкопатології спорідненість eNOS до L-аргініну не змінюється.

Водночас V_{max} для iNOS, активованої за ревматичної патології, істотно не відрізняється від цієї величини для eNOS лімфоцитів крові осіб групи

контролю. Проте iNOS лімфоцитів крові пацієнтів з РеА характеризується значно вищою спорідненістю до L-аргініну: величина K_{L-Arg} для iNOS нижча в 3,1 разу, ніж для eNOS лімфоцитів крові осіб групи контролю.

Отже, при інтерпретації отриманих кінетичних параметрів, визначених за L-аргініном, показано, що за ревматичної патології уявна константа спорідненості iNOS до L-аргініну в 3,1 разу нижча, ніж для eNOS лімфоцитів крові осіб групи контролю, а інгібування активності eNOS відбувається за конкурентним типом — за рахунок зниження числа обертів ензиму.

Висновки

1. Результати наших досліджень показали, що за умов розвитку реактивного артрити в лімфоцитах крові відбувається зниження активності eNOS і компенсаторне зростання активності iNOS. Отже, за умов розвитку ревматичної патології порушується метаболізм L-аргініну, що свідчить про дисметаболічні зміни в системі синтезу NO, а саме його гіперпродукцію.

2. Рівень активності NOS та концентрація NO поряд з іншими параметрами може свідчити про функціональний стан клітини та бути прогностичними показниками для діагностування та оцінки ефективності фармакотерапії в ревматичній патології.

Перспективи подальших досліджень. Подальші дослідження будуть скеровані на детальне вивчення кінетичних властивостей аргінази, яка відповідає за неокисний шлях метаболізму L-аргініну та ролі Ca^{2+} -транспортувальних систем у розвитку реактивного артрити.

Література

1. Бережний В.В., Марушко Т.В., Марушко Ю.В. Клінічна ревматологія дитячого віку. — К., 2011. — 266 с.
2. Ванін А.Ф. Оксид азота в біомедицинських дослідженнях // Біофізика. — 2001. — Т. 46, № 4. — С. 631—641.
3. Джус М.Б. Клініко-імунологічні особливості перебігу реактивного артриту // Укр. ревматол. журн. — 2004. — Т. 17, № 3. — С. 44—48.
4. Келети Т. Основы ферментативной кинетики. — М.: Мир, 1990. — 350 с.
5. Корнійчук О.П., Мельник О.В., Личковська Н.Е. Реактивні артрита та інфекційні чинники // Клін. та експерим. патологія. — 2012. — Т. 11, № 1. — С. 181—185.
6. Корнійчук О.П., Мельник О.В., Личковська Н.Е., Воробець З.Д. Особливості обміну L-аргініну в лімфоцитах периферичної крові у хворих на реактивний артрит // Практична медицина. — 2013. — Т. 19, № 1. — С. 119—125.
7. Костерин С.А., Бурчинская Н.Ф. Метод определения кинетических характеристик Ca^{2+} -транспортирующих систем субклеточных структур гладких мышц // Укр. біохім. журн. — 1987. — Т. 59, № 2. — С. 66—69.
8. Луговський С.П. Зміни активності ферментного спектра лімфоцитів периферичної крові при свинцевій інтоксикації (цитохімічне дослідження) // Лабор. діагностика. — 2002. — № 2. — С. 29—32.
9. Сибірна Н.О., Маєвська О.М., Барська М.Л. Дослідження окремих біохімічних показників за умов оксидативного стресу. — Львів: Видав. центр ім. Івана Франка, 2006. — 60 с.
10. Спаська Г.О. Реактивний артрит: сучасний погляд на проблему // Укр. мед. часопис. — 2011. — Т. 11—12, № 6. — С. 55—59.
11. Степанов Ю.М., Кононов І.Н., Журбина А.І. Аргинин в медичній практиці // Журн. АМН України. — 2004. — № 10. — С. 340—352.
12. Фафула Р.В., Єфремова У.П., Личковська Н.Е. та ін. Методологічний підхід до вивчення ензиматичного спектра лімфоцитів при патологічних станах з використанням детергенту сапоніну (ультраструктурне дослідження) // Вісник проблем біології та медицини. — 2012. — Вип. 4, т. 1 (96). — С. 163—166.
13. Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood // Scand. J. Clin. Lab. Invest. — 1968. — Vol. 21 (Suppl. 97). — P. 77—79.
14. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
15. Morris S.M.J. Enzymes of arginine metabolism // J. Nutr. — 2004. — Vol. 134, N 10. — P. 2743—2747.
16. Popovic P.J., Zeh H.J., Ochoa J.B. Arginine and immunity // J. Nutr. — 2007. — Vol. 137. — P. 1681S—1686S.
17. Ridnour L.A., Thomas D.D., Donzelli S. et al. The biphasic nature of nitric oxide responses in tumor biology // Antioxidants & Redox Signaling. — 2006. — Vol. 8, N 7—8. — P. 1329—1337.
18. Saluja R., Jyoti A., Chatterjee M. et al. Molecular and biochemical characterization of nitric oxide synthase isoforms and their intracellular distribution in human peripheral blood mononuclear cells // Biochim. Biophys. Acta. — 2011. — Vol. 1813, N 10. — P. 1700—1707.
19. Verbuen A., de Clerck L.S., Bridts C.H. et al. Influence of blood and synovial fluid immune complexes of patients with rheumatoid arthritis on production of nitric oxide and growth and viability of chondrocytes // J. Rheumatol. — 2000. — N 1. — P. 35—40.

О.В. Мельник¹, Е.П. Корнійчук¹, П.П. Ковальський², З.Д. Воробець¹

NO-синтазний путь метаболізму L-аргініну в лімфоцитах крові больних реактивним артритом

¹ Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького

² ГУ «Узлова лікарня станції Стрий ГТОО «Львівська залізнична дорога», г. Стрий, Львівська область

Цель работы — исследовать активность ферментов окислительного пути метаболізму L-аргініну в лімфоцитах периферической крові больних реактивним артритом и изучить кинетические свойства NO-синтазы.

Материалы и методы. Исследования проводили на лімфоцитах периферической крові пациентов, больних реактивним артритом (n = 11), и практически здоровых людей (n = 16). Пермеабілізацію лімфоцитов проводили сапоніном. В лімфоцитах определяли активность эндотелиальной и индуцибельной NO-синтазы.

Результаты и обсуждение. Установлены оптимальные условия функционирования эндотелиальной (eNOS) и индуцибельной (iNOS) NO-синтазы. Показано, что развитие ревматической патологии сопровождается дисбалансом в системе синтеза NO в лімфоцитах крові, который заключается в активации индуцибельной изоформы NO-синтазы и значительном ингибировании ее конститутивной изоформы. Проведен анализ кинетических свойств NOS лимфоцитов крові пациентов с реактивним артритом. Показано, что при ревматической патологии константа сродства iNOS к L-аргініну в 3,1 раза ниже, чем для eNOS лимфоцитов крові особой группы контроля, а ингибирование активности eNOS происходит за конкурентным типом — за счет снижения численности оборотов фермента.

Выводы. При развитии ревматической патологии в лімфоцитах крові происходит снижение активности eNOS и компенсаторное повышение активности iNOS. Нарушение метаболізму L-аргініну свидетельствует об дисметаболических изменениях в системе синтеза NO, а именно, его гиперпродукции. Уровень активности NOS и концентрация NO, наряду с другими параметрами, могут свидетельствовать о функциональном состоянии клетки и служить прогностическими показателями для диагностирования и оценки эффективности фармакотерапии при ревматической патологии.

Ключевые слова: реактивний артрит, лімфоциты, NO-синтаза, L-аргінін, оксид азота.

O.V. Melnyk¹, O.P. Kornijchuk¹, P.P. Kovalskyi², Z.D. Vorobets¹

NO-synthase pathway of L-arginine metabolism in peripheral blood lymphocytes of patients with reactive arthritis

¹ Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Ukraine

² Railway Junction Hospital of the Stryi station knot of the «Lviv Railway», Stryi, Lviv region, Ukraine

Objective. To investigate oxidation enzymes activity in the process of L-arginine metabolism in peripheral blood lymphocytes of patients with reactive arthritis and to study the kinetic properties of NO-synthase.

Materials and methods. The research was based on peripheral blood lymphocytes of patients with reactive arthritis (n = 11) and practically healthy persons (n = 16). Lymphocytes were permeabilised by means of saponine. Endothelial and inducible NO-synthase activities were defined.

Results and discussion. The optimal conditions for the functioning of endothelial (eNOS) and inducible (iNOS) NO-synthase have been established. It was shown that the development of rheumatic pathology is accompanied by an imbalance in the system NO synthesis in lymphocytes. The eNOS activity in lymphocytes of patients with ReA is reduced in 1.9 times. A sharp increase in activity of inducible isoform of NO-synthase was observed against the background of inhibition of eNOS at ReA. The kinetic properties of NOS blood lymphocytes of patients with reactive arthritis were analyzed. It was established that the value of the kinetic parameters for eNOS and iNOS in lymphocytes of patients and healthy donors significantly differed. Synthesis of NO with iNOS is much more intensive than with eNOS. Changes in the concentration of L-arginine in the incubation medium affect the rate of NO-synthase reaction. Increasing the concentration of L-arginine in the incubation medium leads to a gradual increase in speed NO-synthase reaction both isoforms of NOS with access to the plateau. It was established that the V_{max} for eNOS lymphocytes individuals of the control group was 1.6 times higher than this value at ReA. However, the value K_{L-Arg} for both studied groups did not significantly differ. It has been shown that in rheumatic pathology apparent affinity constant of iNOS for L-arginine is 3.1 times lower than for eNOS blood lymphocytes of the control group persons, and the eNOS inhibition of competitive type occurs — by reducing the number of revolutions of the enzyme.

Conclusions. Development of the rheumatic pathology results in the eNOS activity decrease and compensatory iNOS activity increase in blood lymphocytes. L-arginine metabolism defects means dismetabolism changes in NO-synthesis system, i.e. its overproduction. The level of NOS activity and NO concentration with other parameters indicate functional state of the cell as well as give prognostic indexes for diagnosis and evaluation pharmacotherapy efficiency in the rheumatic pathology.

Key words: reactive arthritis, lymphocytes, NO-synthase, L-arginine, nitric oxide.