

**КІНЕТИЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ЕНЗИМАТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ АРГІНАЗИ  
ЛІМФОЦИТІВ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ У ХВОРИХ  
НА РЕВМАТИЧНІ ЗАХВОРЮВАННЯ****Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького (м. Львів)**

Дана робота є фрагментом НДР «Дослідження функціонально-метаболических резервів стреслімітуючих систем організму за екстремальних умов з метою виявлення ефективних способів їх корекції», номер держ.реєстрації 0111U000121.

**Вступ.** На сьогодні проблема ревматичних захворювань (РЗ), які належать до найдавніших патологій людини та системних хвороб сполучної тканини надзвичайно актуальна, оскільки за рівнем свого негативного впливу на сучасне суспільство посідають 2-ге місце після хвороб системи кровообігу [6, 11]. Останніми роками в Україні відзначають збільшення кількості хворих на ревматоїдний артрит (РА) та анкілозивний спондилоартрит (АС). РА – хронічне запальне автоімунне захворювання сполучної тканини з ураженням суглобів і частим системним запальним ураженням внутрішніх органів [3, 9]. АС – хронічне системне запальне захворювання сполучної тканини з переважним ураженням суглобів та осьового скелету. АС є основною формою серонегативних спондилоартритів і посідає перше місце серед автоімунних захворювань у чоловіків [8, 10].

Вивчення змін ензиматичної активності аргінази – одного з ключових ензимів метаболізму NO – дає інформативну оцінку про перебіг патологічних змін в організмі, зокрема, і при РЗ і викликає значний інтерес у дослідників в медико-біологічній практиці. Відомо, що аргіназа модулює імунну відповідь. Показано [14, 16, 21, 23, 24], що гуморальні протизапальні цитокіни IL-4, IL-10, IL-13 і TGF-бета викликають підвищену експресію аргінази. Вважають, що це свідчить про гуморальну відповідь зі сторони імунної системи на антиген.

Встановлено, що співвідношення між NO-синтазним і аргіназним шляхами метаболізму L-аргініну в значній мірі визначає здатність макрофагів стимулювати клітинні (Th1-залежні) або гуморальні (Th2-залежні) імунні реакції [18, 19]. Таким чином, речовини, що змінюють NO-синтаза/аргіназний баланс можуть бути використані для модуляції імунної відповіді та корекції його порушень.

В результаті проведених нами раніше досліджень з вивчення активності аргінази в лімфоцитах периферичної крові (ЛПК) показано [1], що у хворих на РА та АС аргіназна активність істотно відрізняється від такої у групи здорових осіб. Після проведеного курсу лікування значення активності ензиму у хворих дещо наближається до її контрольних значень.

Однак, на сьогодні нез'ясованими залишаються біохімічні механізми порушення функціональної активності аргінази у ЛПК за умов розвитку автоімунного процесу.

**Мета дослідження.** Вивчення ряду кінетичних характеристик аргінази пермеабілізованих сапоніном лімфоцитів периферичної крові донорів і хворих на РА та АС.

**Об'єкт і методи дослідження.** Дослідження проводили на лімфоцитах периферичної крові хворих, які перебували на стаціонарному лікуванні у ревматологічному відділенні Львівської обласної клінічної лікарні. Усіх хворих розділено на дві дослідні групи: хворі на РА (n=18) та хворі на АС (n=15). Групу контролю становили практично (клінічно) здорові донори, віком 20-30 років (n=15).

**Виділення лімфоцитів.** Моноядерні ЛПК людини виділяли з гепаринізованої свіжоотриманої венозної крові хворих і донорів у градієнті густини фікол-тріумбразу ( $\rho = 1,08 \text{ г/см}^3$ ) [13]. Цілісність і життєздатність лімфоцитів, яка в усіх дослідах становила не менше 95%, оцінювали за забарвленням трипановим синім [20].

Для пермеабілізації мембран ЛПК та розкриття активності аргінази до суспензії лімфоцитів додавали сапонін (0 – 0,3%). Дана методика ґрунтується на роботах, виконаних на лімфоцитах раніше [5]. Вміст білка у лімфоцитарній суміші визначали методом Лоурі [22].

**Визначення активності аргінази.** Визначення ензиматичної активності аргінази ЛПК проводили за утворенням сечовини, вміст якої визначали за допомогою діагностичного набору відповідно до інструкції фірми-виробника (Simko, Україна). Ензиматичну реакцію ініціювали внесенням аліквоти (150 мкл) пермеабілізованих сапоніном лімфоцитів в інкубаційне середовище наступного складу (мМ): 20 Тріс HCl, 100 L-аргінін, 2 MnCl<sub>2</sub> (pH = 9,5), об'ємом 300 мкл; кількість білка у пробі – 50 – 100 мкг/мл. Інкубацію здійснювали 30 хв, при температурі 37° С на шейкері. Реакцію зупиняли внесенням в інкубаційне середовище 40 мкл 50%-ї трихлороцтової кислоти. У контрольні зразки замість лімфоцитарної суміші вносили відповідну аліквоту фізрозчину. Крім дослідних і контрольних проб готували також пробу, яка містить стандартний розчин сечовини (16,65 мМ).

Активність аргінази визначали спектрофотометрично при 520 нм, реєструючи процес утворення

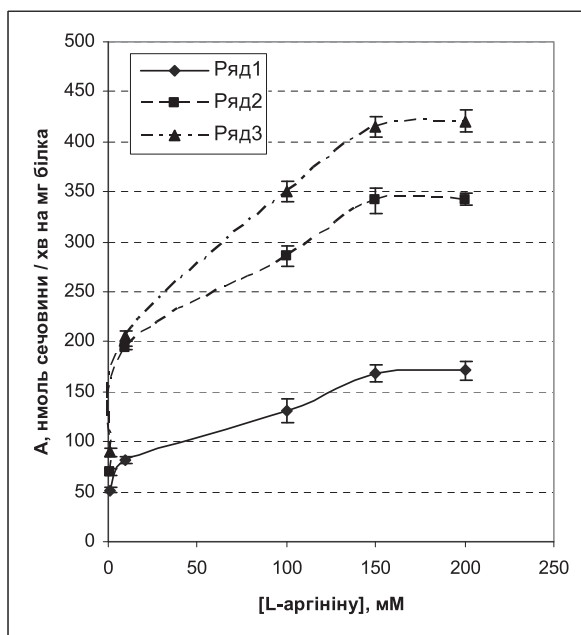
сечовини. Кількість продукту реакції, що утворився в процесі ензиматичної реакції, визначали згідно з інструкцією і виражали у нмоль сечовини/хв×мг загального протеїну у пробі [12].

**Кінетичний аналіз.** Дослідження кінетичних властивостей ензиматичної реакції аргінази проводили в стандартному середовищі інкубації, що було модифіковане за складом відповідних компонентів (концентрації субстрату (L-аргінін), активатора ( $Mn^{2+}$ ), детергенту (сапонін)). Уявні кінетичні параметри, властиві для аргіназної реакції – константу активації йонами  $Mn^{2+}$  ( $K_{mMn^{2+}}$ ), константу Міхаеліса-Ментен ( $K_{mL-arg}$ ) та початкову максимальну швидкість реакції, визначену за L-аргініном та  $Mn^{2+}$  ( $V_{max}$ ) визначали в координатах Лайнуївера-Берка [4].

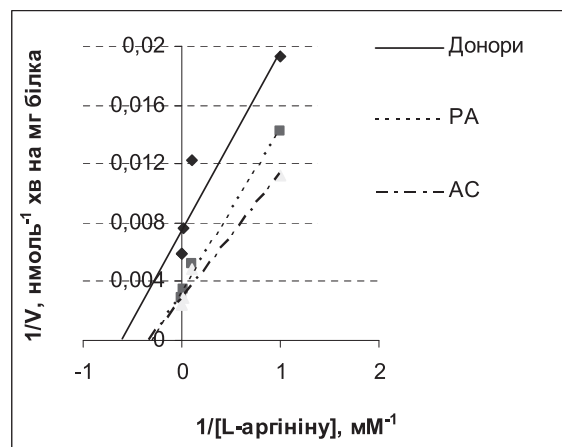
Кінетичні та статистичні розрахунки проводили в режимі програмного забезпечення MS Office. Результати досліджень обробляли загальноприйнятими методами варіаційної статистики з використанням t-критерію Ст'юдента. Абсолютне значення коефіцієнта кореляції становило 0,90 - 0,99. Достовірність розрахованих параметрів прямої перевіряли за F-критерієм Фішера; достовірною вважали апроксимацію за якої  $P \leq 0,05$ .

**Результати досліджень та їх обговорення.**

**Кінетичний аналіз активності аргінази лімфоцитів периферичної крові від концентрації L-аргініну.** Субстрат для ензиматичної реакції аргінази вносили в середовище інкубації в діапазоні концентрацій від 1 до 200 мМ (за сталої концентрації  $Mn^{2+}$  2 мМ). При цьому спостерігається лінійне зростання ензиматичної активності аргінази з наступним виходом на плато (рис. 1). Як впливає з рис. 1, у всьому діапазоні досліджуваних концентрацій L-аргініну



**Рис. 1.** Концентраційна залежність впливу L-аргініну на активність аргінази сапонін-пермеабілізованих ЛПК донорів (ряд 1) і хворих на РА (ряд 2) та АС (ряд 3),  $M \pm m$ ,  $n = 4-6$ .



**Рис. 2.** Лінеаризація концентраційних кривих, наведених на рис. 1, у координатах Лайнуївера – Берка, де V – аргіназна активність сапонін-пермеабілізованих ЛПК донорів і хворих на РА та АС, ( $n = 4-6$ ;  $r > 0,95$ ;  $F < 0,005$ ).

активність аргінази хворих на РЗ підвищена у порівнянні з величиною у донорів.

Криві залежностей ( $1/V$ ;  $1/[L-аргініну]$ ) відрізняються тангенсом нахилу (рис. 2). Криві ( $1/V$ ;  $1/[S]$ ) в нормі та при патології перетинають осі X та Y в різних точках. Дана залежність відповідає змішаному типу інгібування ензиму. Шляхом лінеаризації отриманих даних у координатах Лайнуївера - Берка визначено основні кінетичні параметри гідролізу L-аргініну

**Таблиця 1**

**Кінетичні параметри, які характеризують гідроліз L-аргініну сапонін-пермеабілізованими ЛПК донорів та хворих на РА та АС від концентрації L-аргініну ( $M \pm m$ ,  $n = 4-8$ )**

Кінетичні параметри	Донори	Хворі на	
		РА	АС
$V_{max}$ , нмоль / хв на мг білка	$134,33 \pm 9,2$	$306,2 \pm 25$ ***	$357,14 \pm 31,5$ ***
$K_{L-arg}$ , мМ	$1,65 \pm 0,2$	$3,03 \pm 0,2$ ***	$3,4 \pm 0,15$ ***

**Примітка:** Зміни вірогідні стосовно величин у лімфоцитах в осіб групи контролю \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$ .

сапонін-пермеабілізованими ЛПК донорів і хворих на РА та АС (табл. 1).

Розрахунок кінетичних параметрів активності аргінази свідчить про те, що максимальна швидкість гідролізу L-аргініну сапонін-пермеабілізованими ЛПК у хворих на РА та АС, визначена за L-аргініном, у 2,5 раза вища стосовно донорів. Водночас константа спорідненості до L-аргініну у ЛПК хворих на РА та АС також зростає в 1,8 і 2,1 раза відповідно у порівнянні з практично здоровими донорами.

Отже, при інтерпретації отриманих даних з урахуванням кінетичних параметрів, визначених за L-аргініном, можна дійти висновку, що за умов розвитку ревматичної патології в імунокомпетентних клітинах зростання активності досліджуваної ензиматичної системи відбувається за рахунок збільшення числа обертів ензиму (величина  $V_{max}$  зростає). Дослідниками показано подібні результати спорідненості аргінази до субстрату [15, 17, 25].

Кінетичний аналіз активності аргінази лімфоцитів периферичної крові від концентрації йонів  $Mn^{2+}$ . Відомо, що крім L-аргініну, для функціонування аргінази необхідним є марганець, що є активною складовою ферменту і діє як кофактор. Досліди з вивчення впливу  $Mn^{2+}$  на аргіназну активність сапонін-пермеабілізованих ЛПК проводили в діапазоні концентрацій  $MnCl_2$  від 0 до 3 мМ (за сталої концентрації L-аргініну 100 мМ) (рис. 3).

Як видно з рис. 3, крива, яка віддзеркалює залежність активності аргінази ЛПК від вмісту йонів  $Mn^{2+}$  в інкубаційному середовищі має типовий куполоподібний вигляд. Графіки залежності аргіназної активності сапонін-пермеабілізованих ЛПК хворих на РА та АС мають схожий вигляд. Результати досліджень, наведені на рис. 3, свідчать про те, що максимальне значення активності аргінази спостерігається при 2 мМ  $MnCl_2$  в інкубаційному середовищі. Іншими дослідниками показано, що преінкубація ензиму йонами  $Mn^{2+}$  призводила до значного збільшення аргіназної активності [15].

Графіки залежності аргіназної активності ЛПК донорів та хворих на РА і АС від концентрації  $Mn^{2+}$  у висхідній частині кривих лінеаризовано у координатах Лайнуївера-Берка (рис. 4).

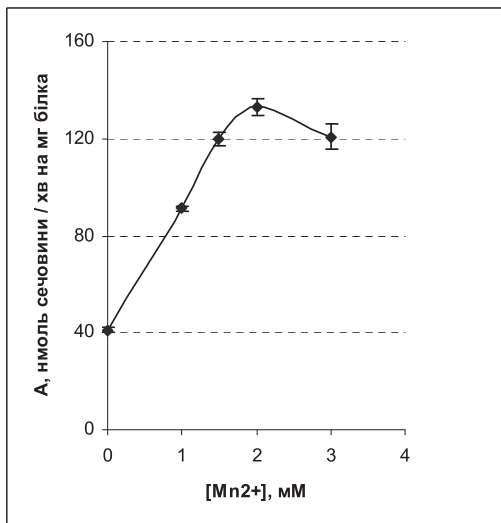


Рис. 3. Концентраційна залежність впливу йонів  $Mn^{2+}$  на активність аргінази сапонін-пермеабілізованих ЛПК практично здорових донорів,  $M \pm m$  n = 4.

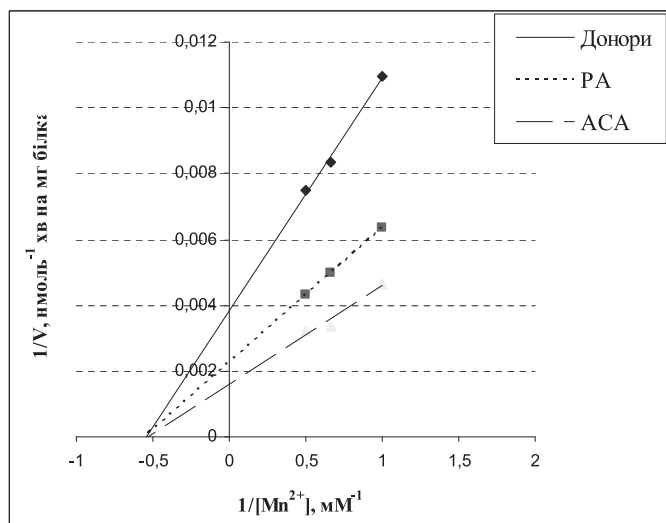


Рис. 4. Лінеаризація концентраційних кривих, наведених на рис. 3, у координатах Лайнуївера – Берка, де V – аргіназна активність сапонін-пермеабілізованих ЛПК донорів і хворих на РА та АС, (n = 4-6; r > 0,95; F < 0,001).

Як видно з рис. 4, криві залежностей  $\{1/V; 1/[Mn^{2+}]\}$  дещо відрізняються тангенсом нахилу і перетинають в одній точці вісь абсцис. Розрахунок кінетичних характеристик аргіназної активності ЛПК свідчить, що початкова максимальна швидкість гідролізу L-аргініну аргіназної реакції, визначена за  $Mn^{2+}$  у хворих на РА істотно відрізняється від практично здорових донорів, тоді як уявна константа

Таблиця 2

**Кінетичні параметри, які характеризують гідроліз L-аргініну сапонін-пермеабілізованими ЛПК донорів та хворих на РА та АС від концентрації йонів  $Mn^{2+}$  ( $M \pm m$ , n = 4-8)**

Кінетичні параметри	Донори	Хворі на	
		РА	АСА
$V_{max}$ нмоль сечовини/хв на мг білка	261,8 ± 21,1	442,5 ± 17,6***	627,4 ± 39,2***
$K_{Mn^{2+}}$ , мМ	1,86 ± 0,19	1,8 ± 0,15	1,89 ± 0,24

Примітка: Зміни вірогідні стосовно величин у лімфоцитах в осіб групи контролю \* P<0,05, \*\* P<0,01, \*\*\* P<0,001.

активації йонами  $Mn^{2+}$  практично однакова у хворих та донорів (табл. 2). Отже, максимальна швидкість реакції при патології зростає, а  $Mn^{2+}$ -зв'язувальна ділянка аргінази лімфоцитів залишається нативною.

Аналіз залежності аргіназної активності лімфоцитів периферичної крові від концентрації сапоніну. Для розкриття латентної аргіназної активності доцільною є пермеабілізація клітинних мембран. Метою був добір оптимальних умов для визначення

активності даного ензиму у ЛПК з використанням такого пермеабілізуючого агента як сапонін. Сапонін належить до групи речовин амфільної природи, що здатні зв'язуватися з мембранними білками гідрофобними зв'язками, одночасно взаємодіючи полярними групами з водою [2]. Це дає змогу молекулам детергенту розпушувати мембрану, водночас не порушуючи структури і функцій транспортувальних систем [7]. Сапонін використовували в діапазоні концентрацій від 0,02 до 0,3%.

З рис. 5 видно, що у широкому діапазоні концентрацій сапоніну (0,02-0,3%) крива залежності ензиматичної активності від концентрації даного

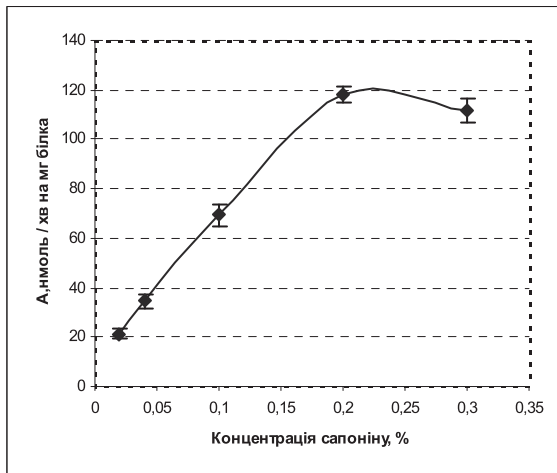


Рис. 5. Залежність аргіназної активності ЛПК донорів від концентрації сапоніну ( $M \pm m$ ,  $n = 4$ ).

детергенту куполоподібна: максимальне значення активності спостерігається за концентрації 0,2-0,3%.

Таким чином, саме цей діапазон концентрацій сапоніну слід вважати найоптимальнішим для практичного використання в експериментах з вивчення кінетичних та каталітичних властивостей ензиматичної реакції аргінази. В разі використання в експериментах нижчих концентрацій (0,02-0,04%) сапоніну не відбувається повного розкриття аргіназної активності. Графіки залежності аргіназної активності сапонін-пермеабілізованих ЛПК хворих на РА та АС мають схожий вигляд.

Дослідження залежності активності ферментів від концентрації сапоніну проводились іншими дослідниками, де було показано схожі концентрації сапоніну для розкриття латентної активності як мембранозв'язаних так і цитозольних ферментів [7].

**Висновки.** Отже, нами показано, що у хворих на РА та АС максимальна швидкість розкладу L-аргініну аргіназної реакції, визначена за L-аргініном та константа Міхаеліса-Ментен є істотно вищими у порівнянні з донорами. Водночас максимальна швидкість розкладу L-аргініну аргіназної реакції, визначена за  $Mn^{2+}$  також є вищою, а константа активації йонами  $Mn^{2+}$  практично однакова у хворих та донорів. Визначено оптимальні концентрації сапоніну для розкриття латентної аргіназної активності.

**Перспективи подальших досліджень.** Отримані результати важливі для розуміння патофізіологічних змін в лімфоцитах периферичної крові за умов розвитку ревматичної патології і можуть бути корисними для подальшого вивчення і розуміння закономірностей перебігу розкладу L-аргініну аргіназної реакції в ЛПК.

### Список літератури

- Активність аргінази в лімфоцитах периферичної крові у хворих на ревматоїдний артрит та анкілозивний спондилоартрит / Н.Е. Личковська, Р.В. Фафула, У.П. Єфремова [та ін.] // Світ біології та медицини. – 2011. – № 2. – С. 125-129.
- Болдырев А.А. Введение в биомембранологию / А.А. Болдырев. – М.: Изд.-во МГУ, 1990. – 208 с.
- Боярчук О.Р. Сучасні тенденції розвитку ревматичних захворювань / О.Р. Боярчук, О.С. Маховська // Укр. ревмат. журн. – 2009. – № 4. – С. 16-18.
- Келети Т. Основы ферментативной кинетики: Пер. с англ. Бровко Л.Ю. и др. / Под ред. Курганова Б.И. – М.: Мир, 1990. – 350 с.
- Кімакович О.В. Дія квамателу та пірензепіну на активність транспортних АТФ-аз лімфоцитів периферичної крові / О.В. Кімакович, Н.О. Підковка, З.Д. Воробець // Практична медицина. – 2004. – Т. 10, № 2. – С. 86-89.
- Коваленко В.Н. Ревматические заболевания: современные тенденции фармакотерапии / В.Н. Коваленко // Укр. ревмат. журн. – 2009. – № 3. – С. 5-11.
- Підковка Н.О. Дослідження деяких властивостей АТФаз у лімфоцитах крові людини / Н.О. Підковка, З.Д. Воробець, А.Б. Зіменковський // Експерим. та клін. фізіологія та біохімія. – 2002. – Т. 7, № 1. – С. 38-41.
- Проблема остеопорозу у хворих на анкілозивний спондилоартрит: підходи до профілактики та лікування. За матер. V Нац. конгресу ревматологів Укр., 7-9 жовтня 2009р. / Здоров'я Укр. – 2009. – 44 с.
- Свінцицький А.С. Ревматоїдний артрит: вчора, сьогодні, завтра / А.С. Свінцицький // Здоров'я Укр. – 2007. – №12/1. – С. 81-83.
- Свінцицький А.С. Анкілозивний спондилоартрит: актуальні питання діагностики та лікування / А.С. Свінцицький // Здоров'я Укр. – 2008. – № 5/1. – С. 75-79.
- Шуба Н.М. Неотложные состояния у пациентов с ревматическими болезнями: современные подходы к лечению / Н.М. Шуба // Укр. ревмат. журн. – 2009. – № 3. – С. 41-48.
- Шугалей В.С. Содержание мочевины и активность аргиназы в органах крыс при акклиматизации к холоду / В.С. Шугалей, А.С. Козина // Физиол. журн. СССР. – 1977. – № 8. – С. 1199-1202.
- Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood / A. Boyum // Scand. J. Clin. Lab. Invest. – 1968. – V. 21, N 97. – P. 77-79.

14. Glucocorticoids inhibit lipopolysaccharide-induced up-regulation of arginase in rat alveolar macrophages / S. Klasen, R. Hammermann, M. Fuhrmann [et al.] // *Br. J. Pharmacol.* – 2001. – V. 132, N 6. – P. 1349–1357.
15. Gürsu M.F. Biochemical analysis of arginase and ornithine carbamoyltransferase in human vitreous humor / M.F. Gürsu // *Arch. Med. Res.* – 2001. – V. 32, N 5. – P. 432–435.
16. IL-4 and IL-13 upregulate arginase I expression by cAMP and JAK/STAT6 pathways in vascular smooth muscle cells / L.H. Wei, A.T. Jacobs, S.M. Morris Jr. [et al.] // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2000. – V. 279. – P. C248–C256.
17. Insights into the interaction of human arginase II with substrate and manganese ions by site-directed mutagenesis and kinetic studies. Alteration of substrate specificity by replacement of Asn149 with Asp. / V. Lypez, R. Alarcyn, M.S. Orellana [et al.] // *FEBS J.* – 2005. – V. 272, N 17. – P. 4540–4548.
18. Mills C.D. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm / C.D. Mills, K. Kincaid, J.M. Alt // *J. Immunol.* – 2000. – V. 164, N 12. – P. 6166–6173.
19. Mills C.D. Molecular basis of "suppressor" macrophages. Arginine metabolism via the nitric oxide synthetase pathway / C.D. Mills // *J. Immunol.* – 1991. – V. 146, N 8. – P. 2719–2723.
20. Mishell B.B. Selected Methods in Cellular Immunology / B.B. Mishell, S.M. Shiigi, W.H. Freeman [et al.]. – San Francisco: W.H. Freeman and Company, 1980. – 486 p.
21. Production of nitric oxide during graft rejection is regulated by the Th1/Th2 balance, the arginase activity, and L-arginine metabolism / V. Holan, J. Pindjakova, M. Krulova [et al.] // *Transplantation.* – 2006. – V. 81, N 12. – P. 1708–1715.
22. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1951. – V. 193. – P. 265–275.
23. Regulation of arginase expression by T-helper II cytokines and isoproterenol / A.R. Barksdale, A.C. Bernard, M.E. Maley [et al.] // *Surgery.* – 2004. – V. 135. – P. 527–535.
24. Shirakawa F. In vitro activation and nuclear translocation of NF- $\kappa$ B catalyzed by cyclic AMP-dependent protein kinase and protein kinase C / F. Shirakawa, S.B. Mizel // *Mol. Cell. Biol.* – 1989. – V. 9. – P. 2424–2430.
25. Uric acid decreases NO production and increases arginase activity in cultured pulmonary artery endothelial cells / S. Zharikov, K. Krotova, H. Hu [et al.] // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2008. – V. 295, N 5. – P. 1183–1190.

УДК 616.72-002.77-092:612.112.045.11

#### **КІНЕТИЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ЕНЗИМАТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ АРГІНАЗИ ЛІМФОЦИТІВ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ У ХВОРИХ НА РЕВМАТИЧНІ ЗАХВОРЮВАННЯ**

**Ефремова У.П., Фафула Р.В., Личковська Н.Е., Воробець З.Д.**

**Резюме.** Досліджували кінетичні властивості активності аргінази у сапонін пермеабілізованих лімфоцитах периферичної крові донорів і хворих на ревматоїдний артрит та анкілозивний спондилоартрит. Встановлено, що максимальна швидкість розкладу L-аргініну сапонін-пермеабілізованими лімфоцитами периферичної крові донорів і хворих на ревматичні захворювання, визначена за L-аргініном відрізняється і складає різницю щодо донорів приблизно в 2,5 рази. Уявна константа Міхаеліса-Ментен за L-аргініном в лімфоцитах периферичної крові хворих на ревматоїдний артрит і анкілозивний спондилоартритом також зростає в 1,8 і 2,1 рази, відповідно, в порівнянні з практично здоровими донорами. Показано, що при розвитку ревматичної патології в іммунокомпетентних клітинах зростання активності досліджуваного ензиму відбувається за рахунок збільшення числа обертів ензиму. Одночасно максимальна швидкість розкладу L-аргініну аргіназної реакції, визначена за  $Mn^{2+}$  у хворих на ревматоїдний артрит і анкілозивний спондилоартрит вища щодо донорів в 1,7 і 2,4 рази, відповідно. Константа активації за  $Mn^{2+}$  не змінюється. Встановлено, що діапазон концентрацій сапоніну 0,2-0,3% найбільш оптимальний для розкриття латентної аргіназної активності.

**Ключові слова:** аргіназа, L-аргінін, лімфоцити, ревматоїдний артрит, анкілозивний спондилоартрит.

УДК 616.72-002.77-092:612.112.045.11

#### **КИНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ЭНЗИМАТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ АРГИНАЗЫ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У БОЛЬНЫХ НА РЕВМАТИЧЕСКИЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ**

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

**Резюме.** Исследовали кинетические свойства активности аргиназы у сапонин пермеабиллизированных лимфоцитах периферической крови доноров и больных на ревматический артрит и анкилозивный спондилоартрит. Установлено, что максимальная скорость разложения L-аргинаина сапонин-пермеабиллизированными лимфоцитами периферической крови доноров и больных на ревматические заболевания, определена по L-аргинуину отличается и составляет разницу относительно доноров примерно в 2,5 раза. Мнимая константа Михаэлиса-Ментен по L-аргинуину в лимфоцитах периферической крови больных ревматическим артритом и анкилозивным спондилоартритом также возрастает в 1,8 и 2,1 раза, соответственно, по сравнению с практически здоровыми донорами. Показано, что при развитии ревматической патологии в иммунокомпетентных клетках рост активности исследуемого энзима

происходит за счет увеличения числа оборотов энзима. Одновременно максимальная скорость разложения L-аргинаина аргиназной реакции, определена по  $Mn^{2+}$  у больных на ревматический артрит и анкилозивный спондилоартрит высшая относительно доноров в 1,7 и 2,4 раза соответственно. Константа активации за  $Mn^{2+}$  не изменяется. Установлено, что диапазон концентраций сапонина 0,2-0,3% наиболее оптимальный для раскрытия латентной аргиназной активности.

**Ключевые слова:** аргиназа, L-аргинин, лимфоциты, ревматоидный артрит, *анкилозирующий спондилоартрит*.

UDC 616.72-002.77-092:612.112.045.11

### **Kinetic Peculiarities Of Enzymatic Arginase Activity Of Peripheral Blood Lymphocytes In Patients With Rheumatoid Arthritis And Ankylosing Spondylitis**

**Efremova U., Fafula R., Lychkovska N., Vorobets Z.**

**Summary.** The kinetic properties of arginase of saponin-perforated peripheral blood lymphocytes of donors and patients with rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis were studied. It was found that the maximum speed of L-arginine decay (determined by the L-arginine) in saponin-perforated peripheral blood lymphocytes of patients with rheumatic diseases is 2.5 times higher than in practically healthy donors. Michaelis-Menten constant of arginase (determined by L-arginine) in peripheral blood lymphocytes in patients with rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis is greater in 1.8 and 2.1 times respectively in comparison to healthy donor. It was found that in conditions of rheumatic pathology the increase of arginase activity in immunocompetent cells is related to the increase of maximum reaction rate. The maximum speed of L-arginine decay (determined by the  $Mn^{2+}$ ) in peripheral blood lymphocytes in patients with rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis is greater in 1.7 and 2.4 times respectively in comparison to healthy donor. Then activation constant for  $Mn^{2+}$  was not altered in patient with rheumatic diseases. It was found that optimal saponin concentration for evaluation of latent arginase activity is 0,2-0,3 %.

**Key words:** arginase, L-arginine, lymphocytes, rheumatoid arthritis, ankylosing spondylitis.

Стаття надійшла 7.05.2012 р.

Рецензент – проф. Дубінін С.І.