Študentská vedecká konferencia FMFI UK, Bratislava, 2011, pp. 75–76
ISBN 978-80-89186-87-7, © 2011 M. Morvová

Zmeny v aktivite enzýmu Ca^{2+}-ATPázy pri chronickom ochorení obličiek (CKD)

Marcela Morvová*
Školiteľ: Libuša Šikurová†

Katedra jadrovej fyziky a biofyziky, FMFI UK, Mlynská dolina, 842 48 Bratislava

Abstrakt

Chronické ochorenie obličiek (CKD) je spojené so zvýšenou intracelulárnou koncentráciou voľného cytoplazmatického vápnika ($[Ca^{2+}]_i$). Predpokladá sa, že je za to zodpovedná znížená aktivita enzýmu Ca^{2+}-ATPázy. Na overenie tejto hypotézy sme zmerali aktivitu tohto enzýmu skupine 15 pacientov s CKD a 31 kontrolných dobrovoľníkov. Zistili sme signifikantný pokles aktivity enzýmu Ca^{2+}-ATPázy cytoplazmatickej membrány ľudských erytrocytov u pacientov s chronickým ochorením obličiek v 2. a 3 štádiu v porovnaní s kontrolnou skupinou zdravých dobrovoľníkov.

Kľúčové slová: aktivita Ca^{2+}-ATPázy, chronické ochorenie obličiek

1 Úvod

Chronické ochorenie obličiek (CKD) sa vyznačuje progresívnou stratou obličkových funkcií behom mesiacov, resp. rokov. Je známym faktom, že intracelulárna koncentrácia voľného cytoplazmatického vápnika ($[Ca^{2+}]_i$) je pri tomto ochorení zvýšená [Gafter et al., 1989]. Kým krátkodobé zvýšenie $[Ca^{2+}]_i$ je fyziologickým dejom a nevyhnutným signálom pri regulácii bunkových procesov, dlhodobé zvýšenie môže viesť k nezvratnému poškodeniu bunkových funkcií a štruktúr. Zmeny metabolizmu vápnika na bunkovej úrovni môžu byť spôsobené: zmenou funkčnosti vápnikových kanálov, zmenou ich expresie alebo zníženou aktivitou Ca^{2+}-ATPázy [Lajdová et al., 2009]. Ca^{2+}-ATPáza je transportný proteín, nachádzajúci sa v cytoplazmatickej membráne bunky, zodpovedný za aktívny transport vápnika z bunky.

Viaceré štúdie dokazujú, že najmä pri terminálnych štádiách CKD je znížená aktivita Ca^{2+}-ATPázy jedným z faktorov zodpovedných za zvýšenú $[Ca^{2+}]_i$ [Gafter et al., 1989], [Spieker et al., 1993]. Tiež u detí v 2. – 4. štádiu CKD bola zistená znížená aktivita Ca^{2+}-ATPázy [Polak-Jonkisz et al., 2010].

V našej práci sme sa zamerali na sledovanie zmien v aktivite Ca^{2+}-ATPázy pri dospelých pacientoch v skorších štádiách, konkrétne v 2. – 3. štádiu CKD.

2 Materiál a metódy

2.1 Pacienti

Skupina CKD bola tvorená 15 pacientmi s vekom 62,3±12,2 (mean±SD), pomer mužov k ženám bol 11:3. Kontrolná skupina bola zložená z 31 subjektov, s priemerným vekom 52,7±13,8, pomer mužov k ženám bol 16:15. Pacienti neboli liečení vit. D.

Ako biologický materiál sme využili vzorku ľudskej krvi, ktorá nám bola poskytnutá z Laboratória experimentálnej a klinickej biochémie Slovenskej zdravotníckej univerzity v Bratislave. Krv bola odoberaná do skúmaviek s heparínom, následne bola oddelená plazma, leukocyty aj trombocyty a masa erytrocytov bola využitá na túto prácu.

2.2 Meranie

Pracovné médium využité pri meraní aktivity enzýmu Ca^{2+}-ATPázy pozostávalo zo: 100 mmol/l TRIS (2 – amino – 2 – hydroxymetyl – propán – 1,3 – diol), 80 mmol/l KCl, 3 mmol/l $MgCl_2$, 0,2 mmol/l EDTA (kyselina etyléndiamintetraoctová), 1 mmol/l ouabaín oktahydrát. Hodnota pH 7,4 bola doladená pomocou HCl V jednom z médií sa nachádza a v druhom sa nenachádza 5 mmol/l $CaCl_2$.

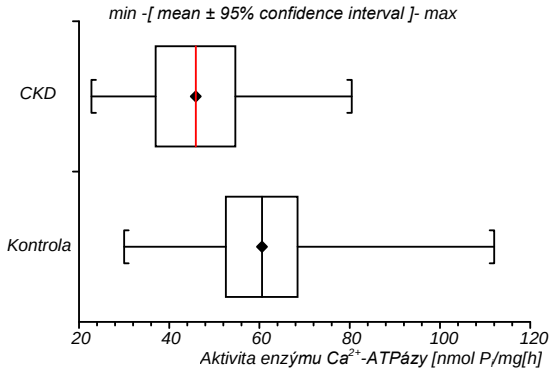
Na izoláciu membrán bola použitá štandardná metóda Hanahana a Ekholmovej [Hanahan, 1974]. K vyizolovaným membránam sme pridali pracovné médium a po dodaní ATP prebiehala reakcia pri 37°C 60 min. Následne sme reakciu zastavili pridaním TCA (kyselina trichloroctová). Kolorimetrickou metódou, s využitím UV-VIS spektrofotometera Schimadzu UV-1700, sme stanovili množstvo anorganického fosfátu (P_i), ktoré vzniklo štiepením ATP pri prechode iónov vápnika.

* morvova@gmail.com
† sikurova@fmph.uniba.sk

Aktivitu Ca^{2+}-ATPázy sme stanovili ako rozdiel v médiu obsahujúcom vápnik a v médiu bez vápnika ako nmol P_i na mg proteínu za hodinu. Bielkoviny sme stanovili Lowryho metódou [Lowry, 1951].

3 Výsledky

Priemerná hodnota aktivity enzýmu Ca^{2+}-ATPázy pre skupinu pacientov s chronickým ochorením obličiek bola (45,86 ± 15,99) nmol P_i/mg/h, pre kontrolnú skupinu bola (60,50 ± 21,65) nmol P_i/mg/h. Výsledky uvádzame ako mean±SD. Pre štatistické porovnanie stredných hodnôt aktivity enzýmu Ca^{2+}-ATPázy medzi skupinami sme overili normálne rozdelenie dát pomocou Shapiro - Wilk W testu. Daný test neodhalil žiadny náznak nenormálneho rozdelenia dát. Tým pádom sme na porovnanie stredných hodnôt aktivity enzýmu Ca^{2+}-ATPázy medzi skupinami mohli použiť Studentov nepárový t – test (P = 0,0248 < 0,05).



Graf 1 Krabicový diagram porovnávajúci strednú hodnotu aktivity Ca^{2+}-ATPázy v kontrolnej skupine a v CKD.
Stredná hodnota s 95 % intervalom spoľahlivosti predstavuje odhad skutočného priemeru danej skupiny (populácie).

4 Záver

Na základe porovnania stredných hodnôt, dochádzame k záveru, že sme zistili signifikantný pokles aktivity enzýmu Ca^{2+}-ATPázy cytoplazmatickej membrány ľudských erytrocytov u pacientov s chronickým ochoreným obličiek v 2. a 3 štádiu oproti kontrolnej skupine zdravých dobrovoľníkov.

Biobliografické odkazy

[Gafter et al., 1989] Gafter, U. et al. (1989). Red blood cell calcium homeostasis in patients with end-stage renal disease. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 114(3): 222-231.

[Lajdová et al., 2009] Lajdová, I. et al. (2009). Intracellular calcium homeostasis in patients with early stages of chronic kidney disease: effects of vitamin D3 supplementation. *Nephrology Dialysis Transplantation*., 24(11): 3376-3381.

[Lowry, 1951] Lowry, O. H. et al. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*., 193(1): 265-275.

[Polak-Jonkisz et al., 2010] Polak-Jonkisz, D. et al. (2010). The endogenous modulators of Ca^{2+}-Mg^{2+}-dependent ATPase in children with chronic kidney disease (CKD). *Nephrology Dialysis Translantation.*, 25(2): 438-444.

[Spieker et al., 1993] Spieker, C. et al. (1993). Ca^{2+}ATPase activity in essential and renal hypertension. *Clinical and Experimental Hypertension*., 15(1): 143-152.