Univerzita Komenského v Bratislave

Súčasné trendy biochemického výskumu



Zborník príspevkov vydaných z príležitosti ukončenia projektu

Rozvoj Centra excelentnosti pre využitie informačných biomakromolekúl na zlepšenie kvality života

ITMS: 26240120027

Bratislava 2013

Európska únia
Európsky fond regionálneho rozvoja
Operačný program VÝSKUM a VÝVOJ
Agentúra Ministerstva školstva, vedy, výskumu a športu SR pre štrukturálne fondy EÚ
Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/Projekt je spolufinancovaný zo zdrojov EÚ

Editori : RNDr. Gabriela Gavurníková, CSc.
Mgr. Juraj Laco, PhD.
Prof. RNDr. Marta Kollárová, DrSc.

Vydavateľ: Univerzita Komenského v Bratislave
Bratislava, Slovenská republika
2013

ISBN: 978-80-223-3439-6

Táto publikácia bola vytvorená realizáciou projektu "Rozvoj Centra excelentnosti pre využitie informačných biomakromolekúl na zlepšenie kvality života, ITMS: 26240120027", na základe podpory operačného programu Výskum a vývoj financovaného z Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Vplyv veku na aktivitu enzýmu Ca^{2+}-ATPázy pri chronickom ochorení obličiek a v norme

Marcela Morvová[1], Libuša Šikurová[1]

[1]Katedra jadrovej fyziky a biofyziky
Fakulta matematiky, fyziky a informatiky
Univerzita Komenského v Bratislave
Mlynská dolina, 842 48 Bratislava
Slovenská republika
morvova@gmail.com, sirkuroval@gmail.com

Abstract

Patients with chronic kidney disease (CKD) have several times higher concentration of intracellular calcium. Plasma membrane calcium ATPase (PMCA) is a transport protein, responsible for long-term regulation of intracellular calcium levels, which is used for excretion of calcium in all eukaryotic cells. In this paper, we examined dependence of Ca^{2+}-ATPase activity of human erythrocytes on the age of the subject and whether there is a change due to chronic kidney disease. We measured the PMCA activity of 31 healthy volunteers (age range 32 – 82) and 30 patients with chronic kidney disease in the early stages (age range 32-77). For neither of the groups the correlation coefficient was significantly different from zero. In our analysis, we have not revealed a correlation between the Ca^{2+}-ATPase activity and the age of subjects in any groups.

Úvod

Časťou nášho relatívne komplexného výskumu, zameraného na monitorovanie parametrov u pacientov s chronickým ochorením obličiek (CKD), je aj sledovanie vybraných enzýmov v krvi. Enzým, na ktorý sústreďujeme svoju pozornosť je vápniková ATPáza plazmatickej membrány (PMCA) ľudských erytrocytov. PMCA je transportný proteín, ktorý predstavuje jeden z hlavných dopravných mechanizmov plazmatickej membrány zodpovedným za dlhodobú reguláciu pokojovej hladiny intracelulárneho vápnika, ktorý slúži na vylučovanie vápnika zo všetkých eukaryotických buniek. ATPáza funguje mechanizmom aktívneho transportu, pričom energia získaná z hydrolýzy ATP sa využíva na prenos iónov cez membránu. Pacienti s chronickým ochorením obličiek majú niekoľkonásobne zvýšenú koncentráciu intracelulárneho vápnika (Gafter et al., 1989; Yang, 1990; Zidek et al., 1992). Práve toto zvýšenie nás motivovalo k štúdiu vápnikovej ATPázy ako jedného z mechanizmov ovplyvňujúcich metabolizmus vápnika (Kaderjaková et al., 2012). Aktivita vápnikovej ATPázy však môže byť ovplyvňovaná viacerými faktormi. V tomto príspevku sme sa zaoberali otázkou, či je aktivita enzýmu Ca^{2+}-ATPázy ľudských erytrocytov závislá od veku subjektov a či dochádza k zmene tejto korelácie vplyvom ochorenia obličiek. Uvádza sa, že po 30. roku života dochádza k poklesu úrovne glomerulárnej filtrácie obličiek, jedného z parametrov charakterizujúcich stav obličiek, v priemere o 0,8 mL/min/1,73 m^2 za rok (Glassock, 2009). V závislosti od veku, je bazálna aktivita Ca^{2+}-ATPázy novorodencov a detí do 7 rokov vyššia ako dospelých jedincov a dosahuje maximum vo veku 8 – 13 rokov (Friederichs, Wurz, 1990). Tieto výsledky by mohli naznačovať, že sa aktivita Ca^{2+}-ATPázy behom života mení.

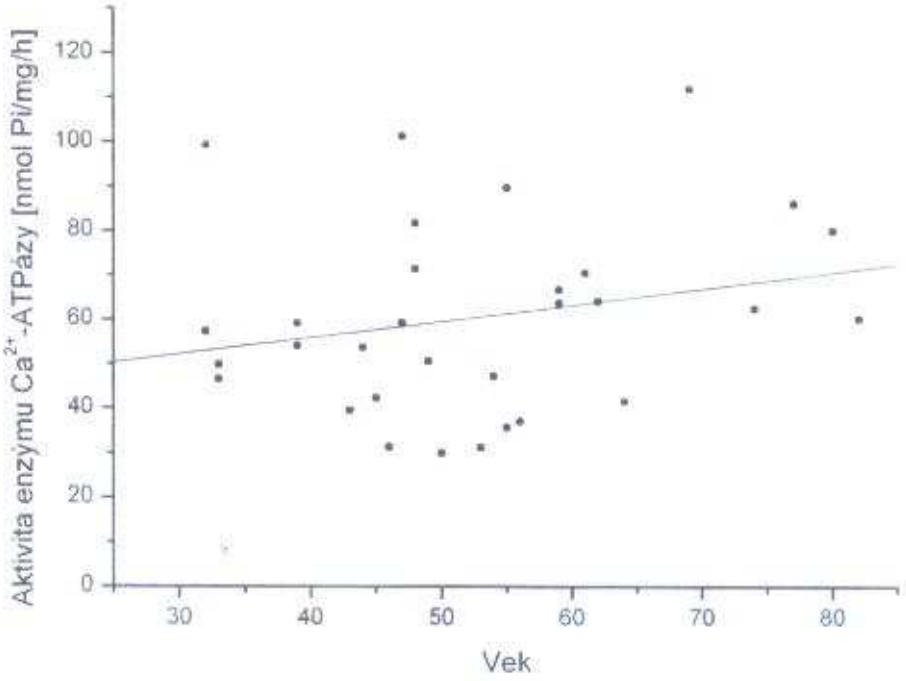
Materiál a metódy

Na zodpovedanie výskumnej otázky tohto príspevku sme zmerali aktivitu enzýmu Ca^{2+}-ATPázy 31 zdravým dobrovoľnikom (pomer žien k mužom bol 15:16) a 30 pacientom s chronickým ochorením obličiek v skorých štádiách (pomer žien k mužom bol 12:18). V kontrolnej skupine zdravých dobrovoľníkov bolo vekové rozpätie 32 – 82 rokov so strednou hodnotou veku 57,1 ± 14,6 (mean ± SD). V skupine pacientov s chronickým ochorením obličiek bolo vekové rozpätie 32 – 77 rokov so strednou hodnotou veku 52,7 ± 13,8 (mean ± SD). Pacienti aj zdraví dobrovoľníci boli informovaní osobne aj písomne a podpísali Informovaný súhlas. Protokoly boli odsúhlasené Etickou komisiou Slovenskej zdravotníckej univerzity. Krv bola odoberaná do skúmaviek s heparínom, následne bola oddelená plazma, leukocyty aj trombocyty a masa erytrocytov bola využitá na túto prácu. Metódou Hanahan & Ekholmovej sme vyizolovali plazmatickú membránu (Hanahan, Ekholm, 1974). Pri transporte iónov vápnika ATPázou dochádza k hydrolýze ATP na ADP a anorganický fosfát (P_i). Aktivitu Ca^{2+}-ATPázy sme vypočítali ako nmol P_i, ktoré vznikli štiepením ATP pri prechode iónov vápnika, vztiahnuté na 1 mg proteínu danej membrány za hodinu (nmol P_i/mg/h). Obsah bielkovín sme stanovili štandardnou Lowryho metódou (Lowry, 1951). Anorganický fosfát sme stanovili spektroskopicky (UV-VIS spektrofotometer Schimadzu UV-1700) s využitím kolorimetrického fosfátového kitu (Phosphate Colotimetric Assay Kit, Biovision), poskytujúceho intenzívny absorpčný pás okolo 650 nm.

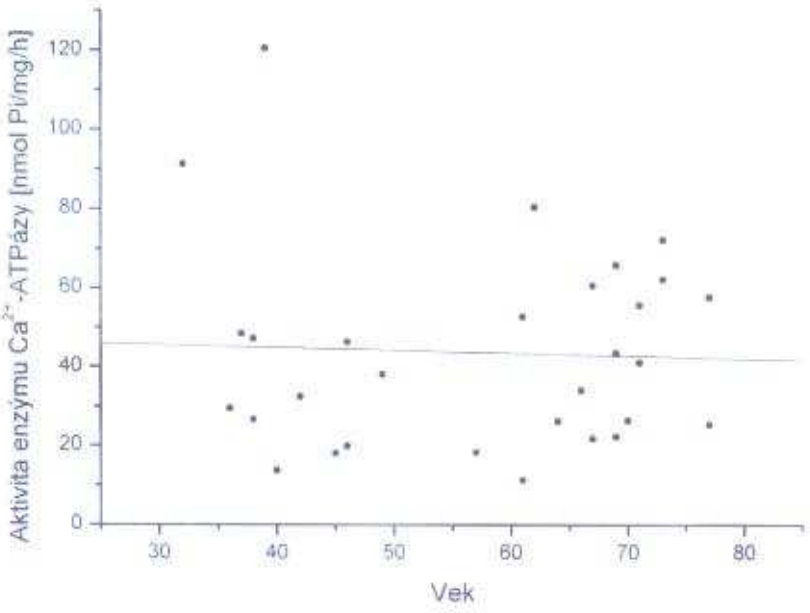
Výsledky a diskusia

Na grafe číslo 1 je znázornená závislosť aktivity enzýmu Ca^{2+}-ATPázy od veku subjektov pre kontrolnú skupinu zdravých dobrovoľníkov s vynesenou lineárnou regresiou. Na grafe číslo 2 je znázornená závislosť aktivity Ca^{2+}-ATPázy od veku subjektov pre skupinu s chronickým ochorením obličiek. Štatisticky sme výsledky testovali analýzou Simple linear regression & Correlation (StatsDirect). Zistili sme, že ani pre jednu z testovaných skupín nie je korelačný koeficient signifikantne rôzny od nuly. V našej analýze sme neodhalili koreláciu medzi aktivitou enzýmu Ca^{2+}-ATPázy a vekom subjektov v žiadnej z testovaných skupín.

Graf 1 Závislosť aktivity enzýmu Ca^{2+}-ATPázy od veku pre kontrolnú skupinu (n = 31) s lineárnou regresiou s predpisom: y = 0,367054x + 41,145671



Graf 2 Závislosť aktivity enzýmu Ca^{2+}-ATPázy od veku pre CKD skupinu (n = 30) s lineárnou regresiou s predpisom: y = - 0,070165x + 47,710768



Naše výsledky sú v zhode s výsledkami uvádzanými v literatúre. U diabetických pacientov bolo zistené signifikantné zníženie aktivity Na^+/K^+-ATPázy u skupiny starších subjektov oproti mladším, avšak u Ca^{2+}-ATPázy sa nepozorovala žiadna zmena (Rabini et al.,

1997). Tiež bazálna aktivita Ca^{2+}-ATPázy nebola ovplyvnená vekom subjektu, ale v skupine starších pacientov (> 60 rokov) bola o 23 % znížená citlivosť enzýmu na tyroidný hormón T_4 oproti mladšej skupine (≤ 50 rokov) (Davis et al., 1987). Nebola potvrdená ani žiadna signifikantná zmena v aktivite enzýmu mužov v porovnaní so ženami. (Friederichs, 1990). Štatistická analýza neodhalila žiadnu koreláciu medzi aktivitou Mg^{2+}-ATPázy, Na^+/K^+-ATPázy, Ca^{2+}-ATPázy a vekom, pohlavím alebo fázou menštruačného cyklu (Reinila, 1982). Zmeny v aktivite enzýmu môžu byť spôsobené pred-„receptorovou" poruchou (čo zohráva úlohu v skupine chorých), poruchou v proteíne alebo počte exprimovaných proteínov. Neprítomnosť efektu (predpokladanej zmeny aktivity enzýmu Ca^{2+}-ATPázy s vekom) môže byť spôsobená najmä tým, že aktivitu Ca^{2+}-ATPázy ovplyvňujú dva dôležité faktory, ktoré môžu spôsobiť jej aktuálne a rýchle výkyvy v rámci skupiny a to hladina glukózy a krvný tlak. Diabetickí pacienti majú zníženú aktivitu Ca^{2+}-ATPázy (Flecha et al., 1990), zároveň Ca^{2+}-ATPáza negatívne koreluje s krvným tlakom (Song, 1990).

Záver

V tejto publikácii sme porovnali 31-člennú skupinu zdravých dobrovoľníkov s vekovým rozpätím 32 – 82 rokov a 30 člennú skupinu pacientov s chronickým ochorením obličiek v skorších štádiách s vekovým rozpätím 32 – 77 rokov. Zaoberali sme sa otázkou, či je aktivita enzýmu Ca^{2+}-ATPázy ľudských erytrocytov závislá od veku subjektov, a či dochádza k zmene korelácie aktivity Ca^{2+}-ATPázy s vekom subjektu vplyvom ochorenia obličiek. Štatistická analýza našich výsledkov neodhalila koreláciu medzi aktivitou enzýmu Ca^{2+}-ATPázy v skupine zdravých dobrovoľníkov, ani v skupine pacientov s chronickým ochorením obličiek.

Poďakovanie

Táto publikácia, bola vytvorená realizáciou projektu "Rozvoj Centra excelentnosti pre využitie informačných biomakromolekúl na zlepšenie kvality života" (ITMS 26240120027), na základe podpory operačného programu Výskum a vývoj financovaného z Európskeho fondu regionálneho rozvoja a podporovaná grantom Univerzity Komenského UK/297/2013.

Literatúra

DAVIS, P.J. et al. Donor age-dependent decline in response of human red cell Ca^{2+}-ATPase activity to thyroid hormon in vitro. In *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. Volume 64, Issue 5, 1987, pp. 921-925.

FLECHA, F.L.G. et al. Decreased Ca2+-ATPase activity after glycosylation of erythrocyte membranes in vivo and in vitro. In *Diabetes*. Volume 39, Issue 6, 1990, pp. 707-711.

FRIEDERICHS, E., WURZ, A. Age-related determination of the basal and calmodulin-stimulate human RBC Ca^{2+}-ATPase activity. In *Biochemical Medicine and Metabolic Biology*. Volume 43, Issue 1, 1990, pp. 39-44.

GAFTER, U. et al. 1989. Red blood cell calcium homeostasis in patients with end-stage renal disease. In *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. Volume 114, Issue 3, 1989, pp. 222-231.

GLASSOCK, R.J. The GFR Decline with Aging: A Sign of Normal Senescence, Not Disease. In *Nephrology Times*. Volume 2, Issue 9, 2009, pp. 6-8.

HANAHAN, D.J., EKHOLM, J.E. The Preparation of Red cell Ghosts (Membranes). In *Methods in Enzymology*. Volume 31, Issue Biomembranes Part A, 1974, pp. 168-172.
KADERJAKOVÁ, Z. et al. Effects of chronic kidney disease on blood cells membrane properties. In *Bioelectrochemistry*. Volume 87, 2012, pp. 226-229
LOWRY, O.H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. In *Journal of Biological Chemistry*. Volume 193, Issue 1, 1951, pp. 265-275.
RABINI, R.A. et al. Diabetes mellitus and subjects' ageing: A study on the ATP content and ATP-related enzyme activities in human erythrocytes. In *European Journal of Clinical Investigation*. Volume 27, Issue 4, 1997, pp. 327-332.
REINILA, M. et al. Standardized method for the determination of human erythrocyte membrane adenosine triphosphatases. In *Analytical Biochemistry*. Volume 124, Issue 1, 1982, pp. 19-26.
SONG, K. Changes of Ca2(+)-ATPase and calmodulin in erythrocytes and their responses to nifedipine in essentrial hypertension. In *Chinese Journal of Cardiology*. Volume 18, Issue 5, 1990, pp. 260-261.
YANG, Y. Changes in RBC Ca2(+)-ATPase activity and red-cell calcium concentration during dialysis in patients with uremia. In *Zhonghua yi xue za zhi*. Volume 70, Issue 1, 1990, pp. 23-25.
ZIDEK, W. et al. Isolation of an ultrafilterable Ca2+-ATPase inhibitor from the plasma of uraemic patients. In *Clinical Science*. Volume 82, Issue 6, 1992, pp. 659-665.