

14. Учайкин В.Ф., Нисевич Н.И., Чередниченко Т.В. Вирусные гепатиты от А до ТTV у детей. — М.: Новая волна, 2003. — 432 с.

15. Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues // J. Biol. Chem. — 1957. — Vol. 226. — № 1. — P. 497-509.

Сведения об авторах

Булугин Вадим Геннадьевич — кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник ФГБУ НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН

Адрес: 660022, г. Красноярск, ул. П. Железняк, г. 3; e-mail: buluginvadim@mail.ru

Дударев Вадим Александрович — кандидат медицинских наук, доцент кафедры детской хирургии ГБОУ ВПО Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ.

Адрес: 660022, г. Красноярск, ул. П. Железняк, г. 1; тел. 8 (391) 2642821; e-mail: dudarev-va@yandex.ru.

Булугин Геннадий Викторович — доктор медицинских наук, профессор кафедры клинической иммунологии ГБОУ ВПО Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ.

Адрес: 660022, г. Красноярск, ул. П. Железняк, г. 1; тел. 8 (391) 2201552; e-mail: gen-vikt@mail.ru.

© КУРТАСОВА Л. М., ШМИДТ А. Р.

УДК 612.128:616.233-002-036.87-053.4

ФЕРМЕНТНЫЙ ПРОФИЛЬ ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ У ДЕТЕЙ РАННЕГО ВОЗРАСТА С РЕЦИДИВИРУЮЩИМ ОБСТРУКТИВНЫМ БРОНХИТОМ

Л. М. Куртасова¹, А. Р. Шмидт²

¹ГБОУ ВПО Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого Министерства здравоохранения РФ, ректор — д. м. н. проф. И. П. Артюхов; кафедра клинической иммунологии, зав. — д. м. н. проф. Н. И. Камзалакова; ²КГБУЗ Красноярский краевой центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями, гл. врач — Е. А. Татьяна.

Резюме. Цель исследования — изучение активности и корреляционных связей НАД- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах периферической крови у детей раннего возраста с рецидивирующим обструктивным бронхитом. Обследованы 54 больных рецидивирующим обструктивным бронхитом в возрасте 1 — 3 лет в период клинической ремиссии. Контрольную группу составили 20 здоровых детей. Активность НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах крови исследовали биolumинесцентным методом. В лимфоцитах крови у больных рецидивирующим обструктивным бронхитом наблюдается активация аэробного дыхания, высокая нагрузка рибозо-5-фосфата и НАДФ-зависимых реакций пластических процессов, снижение анаэробной реакции ЛДГ, уменьшение роли малатаспартатного шунта в энергетике клетки, понижаются уровни реакций анаболизма липидов, перенос продуктов липидного катаболизма на гликолиз, отмечается ингибирование оттока интермедиатов с цикла Кребса на реакции аминокислотного обмена, значительно снижается активность глутатионредуктазы.

Ключевые слов : лимфоциты, ферменты, рецидивирующий обструктивный бронхит.

Болезни органов дыхания у детей всегда находятся в центре внимания педиатров, прежде всего из-за высокой заболеваемости. В раннем детском возрасте респираторные заболевания не только ведут к нарушению функции дыхательной системы, но и сопровождаются изменением иммунореактивности организма.

Учитывая, что все модуляторы функциональной активности лимфоцитов, основного структурно-функционального элемента иммунной системы, прежде всего изменяют метаболизм клетки, переключая субстратный поток с одного метаболического пути на другой, влияя на энергетiku клетки и синтетические процессы, изменения иммунореактивности не могут не иметь метаболической основы.

Особо актуальным представляется изучение метаболизма лимфоцитов крови у детей раннего возраста. Именно у них можно ожидать наиболее значительные динамические изменения в клетке связанные с бурными темпами процессов роста, дифференцировки, с одной стороны, и быстротой возникновения обменных нарушений на клеточном уровне вследствие воздействия патологических факторов с другой.

В связи с чем, целью исследования явилось изучение активности и корреляционных связей НАД- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах периферической крови у детей раннего возраста с рецидивирующим обструктивным бронхитом.

Материалы и методы

Обследованы 54 ребенка в возрасте от одного года до трех лет (средний возраст — $2,9 \pm 0,8$ лет) с рецидивирующим обструктивным бронхитом в периоде клинической ремиссии. Исследования проведены на базе Краевого центра по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями, Красноярск. Контрольную группу составили 20 практически здоровых ребенка аналогичного возраста. С учетом Международной статистической классификации болезней и проблем, связанных со здоровьем X пересмотра: МКБ-10 (Женева: ВОЗ, 1995). В работе использован термин «рецидивирующий обструктивный бронхит». Лимфоциты выделяли из цельной гепаринизированной крови центрифугированием в градиенте плотности фиколаверографина [6]. Затем осуществляли биolumинесцентное

определение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ), глицерол-3-фосфатдегидрогеназы (ГЗФДГ), НАД- и НАДН-зависимой лактатдегидрогеназы (НАДЛДГ и НАДНЛДГ, соответственно), НАД- и НАДН-зависимой малатдегидрогеназы (НАДМДГ и НАДНМДГ, соответственно), НАД- и НАДН-зависимой глутаматдегидрогеназы (НАДГДГ и НАДНГДГ, соответственно), НАД- и НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназы (НАДИЦДГ и НАДФИЦДГ, соответственно), НАДФ- и НАДФН-зависимой глутаматдегидрогеназы (НАДФГДГ и НАДФНГДГ, соответственно), малатдегидрогеназы декарбоксилирующей (НАДФМДГ) и глутатионредуктазы (ГР) [3]. Активность исследуемых оксидоредуктаз выражали в ферментативных единицах [$1E = 1\text{мкмоль/мин на } 10^4 \text{ клеток}$]. Исследование проводили на ферментативном препарате NAD(P): FMN оксидоредуктаза – люцифераза из *Photobacterium leiognathi* (полученном в Институте Биофизики СО РАН, Красноярск). Измерение уровня биолюминесценции осуществляли на биолюминометре «БЛМ 8801» (Россия).

Статистическая обработка полученных данных осуществлялась с помощью пакета прикладных программ «Statistica v. 6.0» (Stat Soft, Ins., США). С учетом нормального распределения изучаемых количественных признаков были использованы следующие методы описательной и сравнительной статистики. Результаты исследования количественных параметров в группах сравнения представлены в виде $M \pm m$ – средней арифметической величины и ошибки средней арифметической (m). Оценка статистической значимости различий средних величин проводилась с использованием t – критерия Стьюдента. Проведена ранговая корреляция по Пирсону. Критический уровень значимости (p) при проверке статистических гипотез принимали равным 0,05.

Результаты и обсуждение

Анализ полученных данных показал увеличение в 5,18 раза ($p < 0,001$) в группе больных рецидивирующим обструктивным бронхитом относительно контрольных значений активности Г6ФДГ-ключевого фермента пентозофосфатного цикла, продукты которого используются в реакциях макромолекулярного синтеза [1,9].

Исследование активности оксидоредуктаз с преимущественно энергетической направленностью не позволяет однозначно утверждать об активации аэробного и анаэробного дыхания в лимфоцитах крови в группе детей с рецидивирующим обструктивным бронхитом. Прежде всего необходимо отметить снижение в 18,38 раза ($p < 0,001$) активности анаэробной реакции ЛДГ в лимфоцитах крови больных рецидивирующим обструктивным бронхитом, что отражает уменьшение интенсивности субстратного потока по гликолизу (табл. 1). Значительное снижение показателей активности НАДНЛДГ в лимфоцитах крови у детей с рецидивирующим обструктивным бронхитом сочетается со снижением уровня ГЗФДГ и, как уже отмечалось выше, повышением активности Г6ФДГ. Это, в свою очередь,

способствует снижению концентрации гликолитических интермедиатов и соответственно ингибированию анаэробного дыхания.

Изучение показателей активности исследуемых ферментов митохондриального компартмента в группе больных рецидивирующим обструктивным бронхитом обнаружило увеличение интенсивности аэробных процессов в лимфоцитах крови (табл. 1). Так, в лимфоцитах крови установлено увеличение в 14,63 раза ($p < 0,001$) активности НАДИЦДГ – фермента в значительной степени определяющего интенсивность субстратного потока по циклу трикарбоновых кислот [1,5]. Кроме того, в группе больных рецидивирующим обструктивным бронхитом повышается внутриклеточная активность другой исследуемой оксидоредуктазы лимонного цикла – МДГ относительно контрольных значений (табл. 1). Следует отметить в лимфоцитах крови у детей с рецидивирующим обструктивным бронхитом увеличение в 1,64 раза ($p < 0,001$) по сравнению с показателями контрольной группы активности одной из вспомогательной дегидрогеназных реакций цикла трикарбоновых кислот, особенно на метаболическом участке после 2-оксоглутаратдегидрогеназного комплекса.

При этом, по-видимому, на повышении активности аэробного дыхания не сказывается снижение шунтирующей реакции НАДФМДГ. Однако малик фермент не только определяет шунтирование медленных участков цикла Кребса, но и является ключевым ферментом липидного анаболизма [7,8,10].

Таблица 1

Пок з тели ктивности НАД(Ф)-з висимых дегидроген з (мкЕ) в лимфоцит х крови у детей с рецидивирующим обструктивным бронхитом ($M \pm m$)

Показатель	Контрольная группа (n = 20)	Больные дети (n = 54)	p
Г6ФДГ	2,09 ± 0,76	10,83 ± 1,14	< 0,001
ГЗФДГ	2,56 ± 0,19	0,44 ± 0,004	< 0,001
НАДЛДГ	41,73 ± 4,07	46,43 ± 4,19	
НАДФМДГ	5,16 ± 0,47	0,85 ± 0,03	< 0,001
НАДФГДГ	1,92 ± 0,16	1,86 ± 0,11	
НАДФИЦДГ	10,22 ± 1,04	16,72 ± 1,74	< 0,002
НАДМДГ	20,14 ± 1,26	34,52 ± 3,64	< 0,001
НАДГДГ	6,22 ± 0,51	9,09 ± 0,22	< 0,001
НАДИЦДГ	1,25 ± 0,10	18,29 ± 0,34	< 0,001
НАДНЛДГ	66,2 ± 6,41	3,60 ± 0,27	< 0,001
НАДНМДГ	123,04 ± 9,47	9,34 ± 0,87	< 0,001
ГР	12,37 ± 1,23	1,71 ± 0,15	< 0,001
НАДНГДГ	174,52 ± 14,29	4,73 ± 0,64	< 0,001
НАДФНГДГ	151,94 ± 11,68	35,96 ± 3,62	< 0,001

Примечание: p – статистически значимые различия с показателями контрольной группы.

В связи с чем одной из причин способствующей снижению уровня ГЗФДГ – фермента, который определяет перенос продуктов липидного катаболизма на окислительно-восстановительные реакции гликолиза [1] в лимфоцитах крови в группе больных рецидивирующим обструктивным бронхитом может быть понижение реакций липидного анаболизма.

Результаты проведенного исследования выявили, что высокий уровень интенсивности субстратного потока по циклу трикарбоновых кислот в лимфоцитах крови в группе больных рецидивирующим обструктивным бронхитом не определяет увеличения оттока интермедиатов через НАДНГДГ и НАДФНГДГ на реакции аминокислотного обмена (табл. 1).

Известно, что одной из метаболических систем, поддерживающих водородный градиент, является малатаспартатный шунт, ключевую реакцию которого осуществляет НАДНМДГ [1,4]. В лимфоцитах периферической крови у детей с рецидивирующим обструктивным бронхитом отмечается снижение в 13,17 раза ($p < 0,001$) активности НАДНМДГ по сравнению с показателями контрольной группы (табл. 1).

Высокий уровень НАДГДГ в лимфоцитах крови в группе больных рецидивирующим обструктивным бронхитом отражает повышение окисления продуктов аминокислотного обмена в реакциях лимонного цикла.

Необходимо отметить значительное падение активности глутатионредуктазы – фермента одной из систем антиоксидантной защиты клетки [2] в лимфоцитах крови в группе детей с рецидивирующим обструктивным бронхитом относительно контроля (табл. 1).

Результаты исследования корреляционной зависимости изучаемых метаболических ферментов установили снижение в 2,5 раза количества корреляционных связей в лимфоцитах периферической крови в группе больных рецидивирующим обструктивным бронхитом по сравнению с контрольной группой детей (рис. 1). Однако 80% этих

связей в группе больных рецидивирующим обструктивным бронхитом имели высокие коэффициенты корреляции, в то время как в контрольной группе отмечалась только одна корреляционная связь с высоким коэффициентом корреляции (НАДНЛДГ – НАДНМДГ $r = 0,83, p < 0,001$).

В группе больных рецидивирующим обструктивным бронхитом наблюдались положительные корреляционные связи между показателями активности НАДЛДГ и НАДМДГ, а также обратными реакциями данных энзимов как и у детей в контрольной группе. При этом, следует отметить, что в группе больных рецидивирующим обструктивным бронхитом эти корреляционные связи были более прочными, чем в контрольной группе (рис. 1).

В то же время в группе больных рецидивирующим обструктивным бронхитом по сравнению с контрольной группой детей менялась направленность и сила корреляционных связей ГЗФДГ в лимфоцитах периферической крови. Так, если в контрольной группе активность ГЗФДГ была взаимосвязана с уровнем НАДЛДГ средней по величине силы положительной корреляционной зависимостью, то в группе больных рецидивирующим обструктивным бронхитом отмечалась сильная положительная корреляционная связь данного энзима с НАДФНГДГ. Кроме того, в группе больных рецидивирующим обструктивным бронхитом были установлены положительные корреляционные связи глутатионредуктазы с малик-ферментом и НАДНГДГ, отсутствующие в контрольной группе детей (рис. 1).

Таким образом, ферментный профиль лимфоцитов периферической крови в группе детей с рецидивирующим обструктивным бронхитом характеризуется повышением наработки рибозо-5-фосфата и НАДФН-зависимых реакций макромолекулярного синтеза, снижением субстратного потока по гликолизу и увеличением интенсивности субстратного потока по циклу Кребса, вносящего наибольший вклад в процессы клеточного энергообразования,

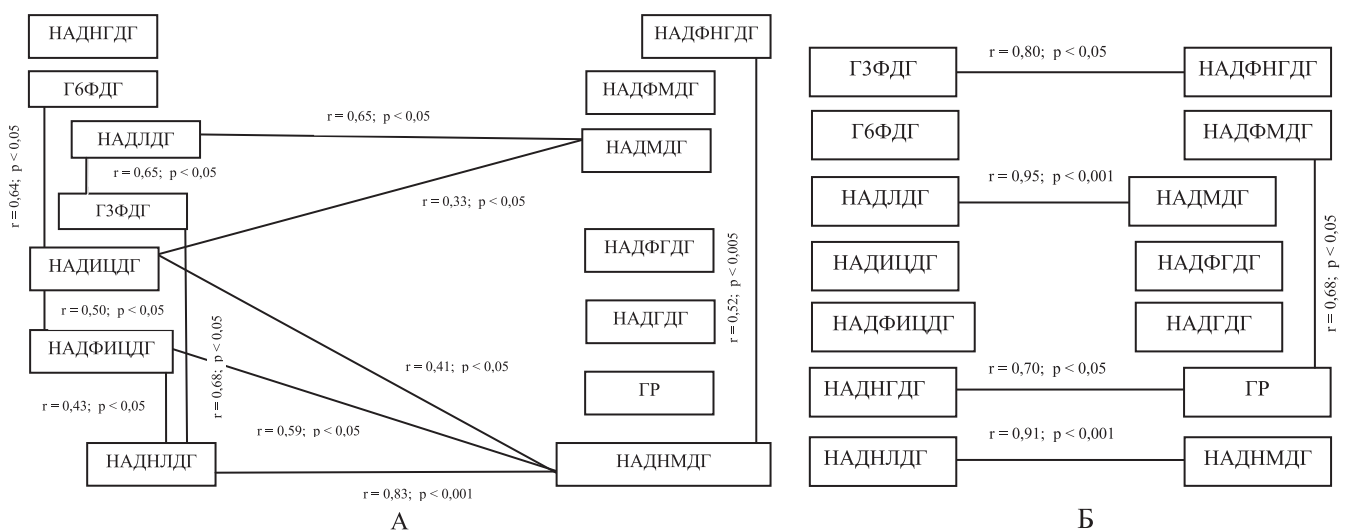


Рис. 1. Корреляционные связи показателей активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах крови в контрольной группе (А) и у детей с рецидивирующим обструктивным бронхитом (Б).

а так же снижением роли малатаспартатного шунта в энергетике клетки. Кроме того, в группе больных рецидивирующим обструктивным бронхитом в лимфоцитах крови повышается уровень НАД-зависимого окислительного дезаминирования глутаминовой кислоты, снижается внутриклеточный анаболизм липидов, а также перенос продуктов липидного катаболизма на гликолиз, отмечается ингибирование оттока субстратов на реакции аминокислотного обмена с цикла трикарбоновых кислот и значительное падение активности глутатионредуктазы.

Следует отметить, что у детей с рецидивирующим обструктивным бронхитом в лимфоцитах крови меняются не только величины активности изучаемых оксидоредуктаз, а также направленность и сила взаимосвязей между исследуемыми ферментами.

Следовательно, у больных рецидивирующим обструктивным бронхитом в период клинической ремиссии наблюдаются изменения активности и корреляционной зависимости НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах периферической крови. Учитывая, высокую значимость метаболических реакций для функциональной активности лимфоцитов и согласно полученным нами результатам исследования, можно предположить, что дети больные рецидивирующим обструктивным бронхитом нуждаются в метаболической коррекции внутриклеточных обменных процессов в иммунокомпетентных клетках.

ENZYME PROFILE OF BLOOD LYMPHOCYTES IN INFANTS WITH RECIDIVATING OBSTRUCTIVE BRONCHITIS

L. M. Kurtasova¹, A. R. Shmidt²

¹ Krasnoyarsk state medical university named
after Prof. V. F. Voyno-Yasenetsky

² Krasnoyarsk Region AIDS Centre

Abstract. The purpose of the study – the research of the activity and correlation links NAD- and NADP- dependent dehydrogenases in peripheral blood lymphocytes in infants with recidivating obstructive bronchitis. Were examined 54 patients with recidivating obstructive bronchitis at age of 1 - 3 years old in the period of clinical remission. The control group consisted of 20 healthy children. The activity of NAD (P) - dependent dehydrogenases in blood lymphocytes was studied by the bioluminescent method. In blood lymphocytes in patients with recidivating obstructive bronchitis was observed the activation of aerobic respiration, high operating time of ribose- 5-phosphate and NADP- dependent reactions of plastic processes, reducing of anaerobic lactate dehydrogenase reaction, reducing the role of malate aspartate shunt in energy of cell, decrease the levels of the anabolic reactions of lipids, transfer the products of lipid catabolism to glycolysis, are noted the inhibition of intermediates outflow

from the Krebs cycle in the reaction of amino acid metabolism, noticeably reduces the activity of glutathione reductase.

Key words: lymphocytes, enzymes, recidivating obstructive bronchitis.

Литература

1. Биохимия / Под ред. Е.С. Северина. – М.: ГЭОТАР – МЕД, 2004. – 784с.
2. Калинина Е.В., Чернов Н.Н., Алленд Р. и др. Современные представления об антиоксидантной роли глутатиона и глутатионзависимых ферментов // Вестник РАМН. – 2010. – № 3. – С. 46-54.
3. Савченко А.А., Сунцова Л.И. Высокочувствительное определение активности дегидрогеназ в лимфоцитах периферической крови биолюминесцентным методом // Лабораторное дело. – 1989. – № 11. – С. 23-25.
4. Abbrescia D.I., La Piana G., Lofrumento N.E. Malate-aspartate shuttle and exogenous NADH / cytochrome electron transport pathway as two independent cytosolic reducing equivalent transfer systems // Arch. Biochem. Biophys. – 2012. – Vol. 518, № 2 – P. 157-163.
5. Alexander B.M., Mehta M.P. Role of isocitrate dehydrogenase in glioma // Expert. Rev. Neurother. – 2011. – Vol. 11, № 10 – P. 1399-1409.
6. Boyum A. Isolation of lymphocytes from blood and bone marrow // Scand. Clin. Lab. Invest. – 1968 – Suppl. 21 – P. 77-80.
7. MacDonald M.J., Marshall L.K. Survey of normal appearing mouse strain which lacks malic enzyme and NAD – linked glycerol phosphate dehydrogenase: normal pancreatic beta cell function, but abnormal metabolite pattern in skeletal muscle // Mol. Cell. Biochem. – 2001. – Vol. 220, № 2 – P. 117-125.
8. Nogalska A., Pankiewicz A., Goyke E. et al. The age-related inverse relationship between of and lipogenic enzymes genes expression in rat white adipose tissue // Exp. Gerontol. – 2003. – Vol. 38, № 4. – P. 415-422.
9. Norris M.G., Malys N. What is the true enzyme kinetics in the biological system? An investigation of macromolecular crowding effect upon enzyme kinetics of glucose-6-phosphate dehydrogenase // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2011. – Vol. 405, № 3 – P. 388-392.
10. Wand B., Wand P., Zhend E. et al. Biochemical properties and physiological roles of NADP-dependent malic enzyme in Escherichia coli // J. Microbiol. – 2011. – Vol. 49, № 5. – P. 797-802.

Сведения об авторах

Куртасова Людмила Михайловна – доктор медицинских наук, профессор кафедры клинической иммунологии, ГБОУ ВПО Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В. Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ.

Адрес: 660022, г. Красноярск, ул. П. Железняк, г. 1; тел. 8 (391) 2201552; e-mail: sibmed-obozrenie@yandex.ru.

Шmidt Анатолий Рудольфович – врач педиатр, лечебно-консультативного отдела КГБУЗ Красноярский краевой центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями.

Адрес: 660049, г. Красноярск, ул. Карла Маркса, г. 45; тел. 8 (391) 2121624; e-mail: shmidt@aims.krsn.ru.