

АКТИВНОСТЬ НАД(Ф)-ЗАВИСИМЫХ ДЕГИДРОГЕНАЗ В ЛИМФОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ДЕТЕЙ РАННЕГО ВОЗРАСТА С ГИПЕРТРОФИЕЙ ГЛОТОЧНОЙ МИНДАЛИНЫ

Куртасова Л.М.¹, Шмидт А.Р.², Лубнина Т.В.²

¹ ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России, г. Красноярск, Россия

² КГБУЗ «Красноярский краевой центр по профилактике и борьбе со СПИД», г. Красноярск, Россия

Резюме. Обследованы 57 детей с гипертрофией глоточной миндалины в возрасте 1–3 лет. Контрольную группу составили 35 здоровых детей. Активность НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах периферической крови исследовали биолуминесцентным методом. В лимфоцитах крови у детей с гипертрофией глоточной миндалины наблюдается активация аэробного дыхания, увеличивается активность пластических процессов, зависящих от интенсивности пентозофосфатного цикла, отмечается уменьшение роли малатаспартатного шунта в энергетике клетки, снижение анаэробной реакции НАДНЛДГ, понижается уровень взаимодействия между циклом Кребса и реакциями аминокислотного обмена, снижается активность глутатионредуктазы.

Ключевые слова: лимфоциты, ферменты, гипертрофия глоточной миндалины

Введение

Распространенность хронической оториноларингологической патологии у детей в Российской Федерации составляет от 181,9 до 465 на 1000 детского населения, при этом аденоидно-гипертрофическая патология занимает ведущее место. Эпидемиологические исследования, проведенные Н.В. Терсковой с соавт. (2013), показали, что в городе Красноярске увеличение в размерах и воспаление глоточной миндалины в детском возрасте — одна из самых распространенных патологий среди всех заболеваний верхних дыхательных путей [2]. В то же время известно, что хронические заболевания ЛОР-органов у детей могут способствовать снижению функциональной активности иммунной системы.

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 энер-

гетику клетки и синтетические процессы, можно предположить, что изменения иммунного гомеостаза не могут не иметь метаболической основы.

В связи с чем целью данного исследования явилось изучение показателей активности НАД- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах крови у детей в возрасте 1–3 лет с гипертрофией глоточной миндалины.

Материалы и методы

Обследованы 57 детей в возрасте от одного года до трех лет (средний возраст — $2,12 \pm 0,77$) лет с гипертрофией глоточной миндалины. Диагноз: гипертрофия глоточной миндалины был установлен на основании жалоб и клинической картины: затруднение носового дыхания, дыхание через рот, отделяемое из носа, храп в ночное время; эндоскопической картины: наличие аденоидных вегетаций II, III степени в полости носоглотки; данных передней активной риноманометрии. Контрольную группу составили 35 практически здоровых ребенка аналогичного возраста.

Авторы:

Куртасова Л.М. — д.м.н., профессор кафедры клинической иммунологии ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России, г. Красноярск, Россия

Шмидт А.Р. — врач-педиатр, КГБУЗ «Красноярский краевой центр по профилактике и борьбе со СПИД», г. Красноярск, Россия

Лубнина Т.В. — врач-педиатр, КГБУЗ «Красноярский краевой центр по профилактике и борьбе со СПИД», г. Красноярск, Россия

Адрес для переписки:

Куртасова Людмила Михайловна
д.м.н., профессор кафедры клинической иммунологии ГБОУ ВПО
«Красноярский государственный медицинский университет имени
проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России
660022, Россия, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1.
Тел.: 8 (391) 220-06-28.
Факс: 8 (391) 221-16-38.
E-mail: sibmed-obozrenie@yandex.ru

Поступила 21.02.2014

Принята к печати 26.03.2014

© Куртасова Л.М. и соавт., 2014

Мононуклеары выделяли из цельной гепаринизированной крови центрифугированием в градиенте плотности фиколл-верографина [4]. 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) [1]. Активность исследуемых оксидоредуктаз выражали в ферментативных единицах [$1\text{E} = 1\text{ мкмоль/мин на } 10^4\text{ клеток}$]. Исследование проводили на ферментативном препарате NAD(P): FMN оксидоредуктаза-люцифераза из *Photobacterium leiognathi* (полученном в Институте Биофизики СО РАН, г. Красноярск). Измерение уровня биolumинесценции осуществляли на биolumинометре «БЛМ 8801» (Россия).

Статистическая обработка полученных данных осуществлялась с помощью пакета прикладных программ «Statistica v.6.0» (Stat Soft Ins., США). Результаты исследования количественных параметров в группах сравнения представлены в виде \bar{M} — средней арифметической величины и ошибки средней арифметической (m). Оценка статистической значимости различий средних величин проводилась с использованием t-критерия Стьюдента. Критический уровень значимости (p) при проверке статистических гипотез принимали равным 0,05. При этом значения p могли ранжироваться по трем уровням достигнутых статистически значимых различий: $p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,001$.

Результаты и обсуждение

При исследовании показателей активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах периферической крови в группе детей с гипертрофией глоточной миндалины выявлено повышение уровня активности Г6ФДГ относительно контрольных величин (табл. 1). Глюкозо-6-фосфат дегидрогеназа является иницирующим ферментом пентозо-фосфатного пути (ПФП) и участвует в перераспределении части глюкозы с энергетических нужд клетки на пластические [8]. В результате деятельности ПФП, в том числе Г6ФДГ, в больших количествах образуется НАДФН, необходимый для реакций биосинтеза липидов и для регуляции восстановленного глутатиона — важного эндогенного антиоксиданта [11]. Кроме того, одним из продуктов ПФП является рибозо-5-фосфат, который используется для дальнейшего макромолекулярного синтеза [8, 10].

Следовательно, активация работы ПФП может увеличивать способность клетки к синтезу нуклеотидов. В то же время, увеличение интенсивности работы ПФП, несомненно, будет способствовать снижению в клетке количества глюкозы, доступной для использования в реакциях энергетического обмена.

Таким образом, при повышенном оттоке глюкозо-6-фосфата в ПФП, уровень реакций гликолиза будет понижен. Вероятно, это свидетельствует об уменьшении в лимфоцитах периферической крови в группе детей с гипертрофией глоточной миндалины по сравнению с контрольными параметрами активности анаэробной реакции ЛДГ, в ходе которой регенерируется НАД⁺, необходимый для циклической гликолитической оксидоредуктации.

Ферментативная реакция, которая может компенсировать отток субстратов с гликолиза, катализируется ГЗФДГ, активность, которой повышена в лимфоцитах крови в группе детей с гипертрофией глоточной миндалины (табл. 1) [5].

Необходимо отметить, что энергетический потенциал лимфоцитов определяется не только интенсивностью анаэробного окисления глюкозы, но и аэробными процессами. В значительной степени аэробные процессы зависят от активности ферментов цикла Кребса.

Результаты проведенных исследований обнаружили увеличение уровней активности НАДИЦДГ, НАДФИЦДГ и НАДМДГ в лимфоцитах периферической крови в 3,37, 6,96 и 2,41 раза, соответственно, в группе детей с гипертрофией глоточной миндалины относительно показателей контрольной группы (табл. 1), что определяет

ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ АКТИВНОСТИ НАД(Ф)-ЗАВИСИМЫХ ДЕГИДРОГЕНАЗ (мкЕ) В ЛИМФОЦИТАХ КРОВИ У ДЕТЕЙ С ГИПЕРТРОФИЕЙ ГЛОТОЧНОЙ МИНДАЛИНЫ ($\bar{M} \pm m$)

Показатель	Контрольная группа (n = 35)	Больные дети (n = 57)	p
Г6ФДГ	2,33±0,22	10,05±1,15	< 0,001
ГЗФДГ	2,27±0,19	3,41±0,24	< 0,001
НАДЛДГ	40,93±4,04	29,80±3,01	< 0,05
НАДМДГ	20,30±1,96	48,93±4,62	< 0,001
НАДФМДГ	4,80±0,45	6,32±0,12	< 0,001
НАДФГДГ	2,52±0,20	0,55±0,05	< 0,001
НАДГДГ	4,09±0,41	2,94±0,19	< 0,02
НАДИЦДГ	1,56±0,15	5,26±0,52	< 0,001
НАДФИЦДГ	10,17±1,17	70,76±8,10	< 0,001
НАДНЛДГ	78,97±7,18	26,11±2,02	< 0,001
НАДНМДГ	114,60±10,95	90,88±8,30	0,1 < p > 0,05
ГР	11,87±1,40	7,43±0,64	< 0,001
НАДНГДГ	188,70±17,58	20,42±2,25	< 0,001
НАДФНГДГ	174,61±17,47	52,62±5,23	< 0,001

Примечание. p — статистически значимые различия с показателями контрольной группы.

повышение интенсивности субстратного потока по циклу трикарбоновых кислот.

Кроме того, в лимфоцитах крови в группе детей с гипертрофией глоточной миндалины относительно группы контроля выявлено повышение активности НАДФМДГ, которая шунтирует «медленные» реакции цикла Кребса и является ключевым ферментом липидного анаболизма [6].

В то же время следует отметить, что высокий уровень интенсивности субстратного потока по циклу Кребса в лимфоцитах крови в группе детей с гипертрофией глоточной миндалины не определяет увеличение оттока интермедиатов через НАДНГДГ и НАДНФГДГ на реакции аминокислотного обмена (табл. 1).

Известно, что одной из метаболических систем, поддерживающих водородный градиент, является малат-аспартатный шунт, ключевую реакцию которого осуществляет НАДНМДГ [4, 8]. Как следует из таблицы 1 в лимфоцитах крови в группе детей с гипертрофией глоточной миндалины активность НАДНМДГ снижена относительно параметров контрольной группы.

При исследовании активности изучаемых оксидоредуктаз в лимфоцитах периферической крови установлено статистически значимое снижение аэробной реакции ЛДГ в группе детей с гипертрофией глоточной миндалины по сравнению с контрольными величинами (табл. 1).

В группе детей с гипертрофией глоточной миндалины в лимфоцитах крови снижены активность НАДГДГ и уровень НАДФГДГ, что отражает понижение окислительного дезаминирования глутамата и восстановительного аминирования α -оксоглутарата.

В лимфоцитах периферической крови в группе детей с гипертрофией глоточной миндалины по сравнению с показателями контрольной группы снижен уровень активности ГР. Уменьшение активности данного фермента в лимфоцитах крови характеризует понижение антиоксидантной защиты клетки. Известно, что ГР – фермент, осуществляющий восстановление глутатиона за счет окисления НАДФН, что определяет его функциональную важность в реакциях глутатионзависимой антиоксидантной системы [11]. В то же время данный фермент содержится в хроматине клеточных ядер, где участвует в пролиферативных процессах [9].

Заключение

Полученные нами данные выявили повышенный отток субстратов через Г6ФДГ на пластические процессы в лимфоцитах крови в группе детей с гипертрофией глоточной миндалины. Следует отметить в данной группе детей пониженную интенсивность анаэробного окисления глюкозы в лимфоцитах периферической крови.

При этом повышение активности ГЗФДГ – фермента, который характеризует интенсивность липидного катаболизма и осуществляет перенос его продуктов на окислительно-восстановительные реакции гликолиза – не компенсирует низкий уровень субстратного потока по анаэробному гликолизу в лимфоцитах крови у детей с гипертрофией глоточной миндалины.

Ингибирование анаэробной и аэробной реакции ЛДГ, с одной стороны, свидетельствует о снижении возможности окисления цитоплазматического НАДН, что может способствовать постоянному ингибированию гликолиза на уровне гексокиназы и фосфофруктокиназы, с другой – об ослаблении способности лимфоцитов метаболизировать эндогенный лактат при аэробном дыхании.

В лимфоцитах крови у детей с гипертрофией глоточной миндалины наблюдается высокий уровень субстратного потока по циклу трикарбоновых кислот, вносящему наибольший вклад в процессы внутриклеточного энергообращения. Однако уровень субстратного взаимодействия между циклом Кребса и реакциями аминокислотного обмена снижен. Кроме того, в лимфоцитах крови у детей с гипертрофией глоточной миндалины обнаружено снижение роли малатаспартатного шунта в энергетическом внутриклеточном обмене.

Необходимо отметить уменьшение активности глутатионредуктазы у детей с гипертрофией глоточной миндалины, что может привести, во-первых, к повышению интенсивности внутриклеточных перекисных процессов, а, во-вторых, к снижению пролиферативной способности лимфоцитов.

Учитывая, высокую значимость метаболических реакций для функциональной активности лимфоцитов, основного структурно-функционального элемента иммунной системы, вероятно, полученные нами данные необходимо учитывать при разработке иммунокорректирующих мероприятий у детей с гипертрофией глоточной миндалины.

Список литературы / References

1. Савченко А.А., Сунцова Л.И. Высококчувствительное определение активности дегидрогеназ в лимфоцитах периферической крови биoluminesцентным методом // Лабораторное дело. 1989. № 11. С. 23-25. [Savchenko A.A., Suntsova L.I. Vysokochuvstvitel'noe opredelenie aktivnosti degidrogenaz v limfotsitakh perifericheskoy krovi bioluminescentnym metodom [Highly sensitive determination of dehydrogenase activity in peripheral blood lymphocytes by bioluminescent method]. *Laboratornoe delo = Laboratory Science*, 1989, no. 11, pp. 23-25.]
2. Терскова Н.В., Николаева А.И., Вахрушев С.Г., Смбалян А.С. Загрязнение атмосферного воздуха как фактор риска гипертрофии глоточной миндалины // Сибирское медицинское обозрение. 2013. № 5. С. 59-64. [Terskova N.V., Nikolaeva A.I., Vakhrushev S.G., Smbatyan A.S. Zagryaznenie atmosfernogo

vozdukha kak faktor riska gipertrofii glotochnoy mindaliny [Air pollution as a risk factor of pharyngeal tonsils enlargement]. *Sibirskoe meditsinskoe obozrenie = Siberian medical review*, 2013, no. 5, pp. 59-64.]

3. 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, no. 2, pp. 157-163.

4. Boym A. Isolation of lymphocytes from blood and bone marrow. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 1968, Vol. 21, no. 97, pp. 77-80.

5. De la Roche M., Tessier S.N., Storey K.B. Structural and functional properties of glycerol-3-phosphate dehydrogenase from a mammalian hibernator. *Protein J.*, 2012, Vol. 31, no. 2, pp. 109-119.

6. Hsieh S.Y., Chen S.H., Hung H.C. Functional roles of the tetramer organization of malic enzyme. *J. Biol. Chem.*, 2009, no. 27, pp. 18096-18105.

7. Lu M., Banerjee S., Saidel G.M., Yu X. Regulation of cytosolic and mitochondrial oxidation via malate-aspartate shuttle: an observation using dynamic ¹³C NMR spectroscopy. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2011, Vol. 701, pp. 185-192.

8. 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, no. 3, pp. 388-392.

9. Pallardo F.V., Markovic J., Garcia-Gimenez J.L., Vina J. Role of nuclear glutathione as a key regulator of cell proliferation. *Mol. Aspects Med.*, 2009, Vol. 30, no. 1, pp. 77-85.

10. Stanton R.C. Glucose-6-phosphate dehydrogenase, NADPH, and cell survival. *IUBMB Life*, 2012, Vol. 64, no. 5, pp. 362-369.

11. Tandogan B., Sengezer C., Ulusu N.N. In vitro effects of imatinib on glucose-6-phosphate dehydrogenase and glutathione reductase. *Folia Biol. (Praha)*, 2011, Vol. 57, no. 2, pp. 57-64.

Meditsinskaya Immunologiya/ Medical Immunology
2014, Vol. 16, No 4, pp. 381-384

SHORT COMMUNICATIONS

NAD(P)-DEPENDENT DEHYDROGENASE ACTIVITY IN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES OF INFANTS WITH ENLARGEMENT OF PHARYNGEAL TONSILS

Kurtasova L.M.^a, Shmidt A.R.^b, Lubnina T.V.^b

^a Krasnoyarsk V.F. Voyno-Yasenetsky State Medical University of the Ministry of Health Care of Russian Federation, Krasnoyarsk, Russian Federation

^b Krasnoyarsk Regional Centre of Preventive Care and Control of Aids, Krasnoyarsk, Russian Federation

Abstract. We have observed and examined 57 children 1 to 3 years old diagnosed with enlargement of pharyngeal tonsils. A control group was presented by 35 healthy children. Bioluminescence technique was applied for studying NAD(P)-dependent dehydrogenase activity in peripheral blood lymphocytes. Activation of aerobic respiration and increasing activity of pentose phosphate cycle-dependent plastic processes were registered in blood lymphocytes of children with hypertrophic pharyngeal tonsils; along with decreased function of malate-aspartate shunt in energy metabolism of the cells, diminished anaerobic reaction of NADH-dependent LDH, lower interaction between Krebs cycle and reactions of amino acid metabolism, and reduced activity of glutathione reductase. (*Med. Immunol.*, 2014, vol. 16, N 4, pp 381-384)

Keywords: lymphocytes, enzymes, pharyngeal tonsil enlargement

Authors:

Kurtasova L.M., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Clinical Immunology, Krasnoyarsk V.F. Voyno-Yasenetsky State Medical University, Russian Ministry of Health Care, Krasnoyarsk, Russian Federation

Shmidt A.R., Pediatrician, Krasnoyarsk Regional Centre of Preventive Care and Control of AIDS, Russian Federation

Lubnina T.V., Pediatrician, Krasnoyarsk Regional Centre of Preventive Care and Control of AIDS, Krasnoyarsk, Russian Federation

Address for correspondence:

Kurtasova Lyudmila M

PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Clinical Immunology, Krasnoyarsk V.F. Voyno-Yasenetsky State Medical University, Russian Ministry of Health Care

660022, Russian Federation, Krasnoyarsk, Partizan Zheleznayak str., 1.

Phone: 7 (391) 220-06-28.

Fax: 7 (391) 221-16-38.

E-mail: sibmed-obozrenie@yandex.ru

Received 21.02.2014

Accepted 26.03.2014