

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НАД(Ф)- ЗАВИСИМЫХ ДЕГИДРОГЕНАЗ В ЛИМФОЦИТАХ КРОВИ И ЛИМФОИДНОЙ ТКАНИ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ АДЕНОИДИТЕ

Коленчукова О.А., Савченко А.А.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера», г. Красноярск, Россия

Резюме. С помощью биoluminesцентного метода проведено исследование активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах выделенных из венозной крови и аденоидной ткани у больных хроническим аденоидитом (ХА). В результате сравнительного анализа было выявлено значительное снижение метаболических процессов лимфоцитов крови и менее выраженное изменение в лимфоцитах аденоидной ткани у больных ХА. Обнаружено снижение энергетических и пластических процессов в лимфоцитах крови и анаэробного окисления глюкозы в клетках, выделенных из аденоидной ткани.

Ключевые слова: метаболизм, ферменты, лимфоциты, аденоидит

COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF NAD(P) – DEPENDENT DEHYDROGENASES IN BLOOD LYMPHOCYTES AND LYMPHOID TISSUE IN CHRONIC ADENOIDITIS

Kolenchukova O.A., Savchenko A.A.

Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation

Abstract. We implemented bioluminescent technique to study the activity of NAD(F) – dependent dehydrogenase in lymphocytes separated from dark blood and lymphoid tissue in chronic adenoiditis. As a result of comparative analysis we revealed significant lowering of metabolic processes in blood lymphocytes and less expressed changes in adenoid tissue lymphocytes in chronic adenoiditis. We marked the lowering of energy and plastic processes in cell lymphocytes in blood and glucose anaerobic oxidation after their separation from adenoid tissue.

Keywords: metabolism, enzymes, lymphocytes, adenoiditis

Адрес для переписки:

Коленчукова Оксана Александровна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
медицинских проблем Севера»
660022, Россия, г. Красноярск, ул. Партизана
Железняк, 3г.
Тел.: 8 (391) 228-06-83, 228-06-81, 228-06-62.
E-mail: Kalina-chyikova@mail.ru

Address for correspondence:

Kolenchukova Oksana A.
Research Institute of Medical Problems of the North
660022, Russian Federation, Krasnoyarsk,
Partizan Zhelezniak str., 3g.
Phone: 7 (391) 228-06-83, 228-06-81, 228-06-62.
E-mail: Kalina-chyikova@mail.ru

Образец цитирования:

О.А. Коленчукова, А.А. Савченко, «Сравнительная характеристика НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах крови и лимфоидной ткани при хроническом аденоидите» // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 3. С. 229-234. doi: 10.15789/1563-0625-2015-3-229-234

© Коленчукова О.А., Савченко А.А., 2015

For citation:

O.A. Kolenchukova, A.A. Savchenko, "Comparative characteristics of NAD(P) – dependent dehydrogenases in blood lymphocytes and lymphoid tissue in chronic adenoiditis", *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2015, Vol. 17, no. 3, pp. 229-234. doi: 10.15789/1563-0625-2015-3-229-234

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2015-3-229-234>

Введение

Проблема хронического аденоидита (ХА), ввиду ее медицинской и социальной значимости, многие годы находится в центре внимания оториноларингологов, педиатров и иммунологов. В общей детской популяции доля детей с данной патологией колеблется от 20 до 50%, доходя до 70% [3, 4, 5].

Глоточная миндалина в составе лимфоэпителиального глоточного кольца входит в состав единой иммунной системы, формируя иммунологическую резистентность организма. Основными функциями лимфоэпителиальных органов являются: барьерная функция, местный иммунитет, а также участие в системном иммунном ответе [1, 4]. Важной частью системы иммунной защиты организма является иммунитет слизистых оболочек (мукозальный иммунитет). Слизистая оболочка носа и носоглотки занимает в процессе формирования защитных реакций особое место. Она является тем биотопом, в пределах которого большинство антигенов впервые контактируют с макроорганизмом. Лимфоидная ткань, ассоциированная со слизистой оболочкой, представлена в основном элементами лимфоэпителиального кольца глотки и обеспечивает как эффекторные реакции, так и доставку антигенной информации к центральным органам иммунной защиты для формирования общего иммунного ответа и сохранения антигенной информации [4, 7]. Такая двойственность функций является «слабым местом» периферического звена иммунной системы и создает предпосылки для формирования целого комплекса сдвигов.

Одним из перспективных направлений, позволяющих охарактеризовать патогенез нарушения реактивности иммунитета при инфекционном процессе, является изучение метаболизма клеток иммунной системы [9]. На сегодняшний день установлено, что функциональные проявления лимфоцитов, например, такие как дифференцировка, пролиферация, синтез рецепторов и цитокинов, осуществляются только при соответствующем изменении их метаболизма [3, 5, 6, 7].

Таким образом, **целью работы** является характеристика метаболизма лимфоцитов, выделенных из венозной крови и лимфоидной ткани у больных хроническим аденоидитом.

Материалы и методы

Обследовано 55 детей в возрасте от 3 до 5 лет, поступивших в ЛОР-отделение с обострением хронического аденоидита (ХА). В качестве контроля использовались лабораторные данные 53 условно здоровых детей этого же возрастного

диапазона, у которых не были диагностированы ЛОР-заболевания.

Из аденоидной ткани, полученной после проведения аденотомии, выделяли лимфоциты. Для этого аденоидную ткань измельчали с помощью гомогенизатора, затем разводили в физиологическом растворе и наслаивали на фиколл-верографин ($\rho = 1,077$) и центрифугировали в течение 45 минут при 400 g. Из венозной крови обследуемого пациента выделяли лимфоциты с помощью фиколл-верографина $\rho = 1,077$ и центрифугировали в течение 45 минут при 400 g. Для контроля морфологического состава взвесей из венозной крови и аденоидной ткани определяли чистоту выхода лимфоцитов, которая составляла 97%. Полученные суспензии лимфоцитов дважды отмывали в питательной среде 199 по 10 мин при 400 g. Супернатант сливали, оставшиеся лимфоциты разводили в 1 мл среды 199 и получали взвеси. Подсчитывали количество лимфоцитов в камере Горяева.

Определение активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах крови и лимфоидной ткани проводили биолюминесцентным методом [8]. Данным методом определялась активность следующих ферментов: глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ), глицерол-3-фосфатдегидрогеназы (Г3ФДГ), малик-фермента (НАДФМДГ), НАД- и НАДН-зависимой реакции лактатдегидрогеназы (ЛДГ и НАДН-ЛДГ), НАД- и НАДН-зависимой реакции малатдегидрогеназы (МДГ и НАДН-МДГ), НАДФ- и НАДФН-зависимой глутаматдегидрогеназы (НАДФГДГ и НАДФН-ГДГ), НАД- и НАДН-зависимой глутаматдегидрогеназы (НАДГДГ и НАДН-ГДГ), НАД- и НАДФ-зависимых изоцитратдегидрогеназ (НАДИЦДГ и НАДФИЦДГ соответственно) и глутатионредуктазы (ГР). Активность дегидрогеназ в лимфоцитах крови выражали в ферментативных единицах ($1 \text{ E} = 1 \text{ мкмоль/мин}$ [9]) на 10^4 клеток.

Для всех полученных данных определяли медиану (Me) и 25 и 75 перцентилей (Q_{25} и Q_{75}). Проверку гипотезы о статистической достоверности исследуемых параметров проводили с помощью критерия Манна–Уитни и критерия парных выборок Вилкоксона. Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью пакета прикладных программ Statistica 7.0 (StatSoft, Inc.).

Результаты

При определении особенностей метаболизма в лимфоцитах крови у больных ХА было обнаружено снижение активности таких ферментов, как НАДФМДГ, НАДФИЦДГ, МДГ, НАДГДГ, НАДИЦДГ и обратных реакций ЛДГ, МДГ,

НАДГДГ и НАДФГДГ относительно контрольного диапазона (рис. 1 и 2).

При сравнительном анализе метаболической активности лимфоцитов, выделенных из крови и аденоидной ткани у больных ХА, было обнаружено снижение Г6ФДГ, ГЗФДГ, ЛДГ и НАДФМДГ и повышение активности НАДИЦДГ в лимфоцитах, выделенных из ткани глоточных миндалин (рис. 3).

Обсуждение

Исследуемые ферменты занимают ключевые позиции на разных метаболических путях клетки. Так, снижение активности анаэробной реакции ЛДГ и НАД- и НАДН-зависимых реакции МДГ (рис. 2А, Б) в лимфоцитах крови больных ХА может быть обусловлено низкой активностью анаэробного окисления глюкозы и, таким образом,

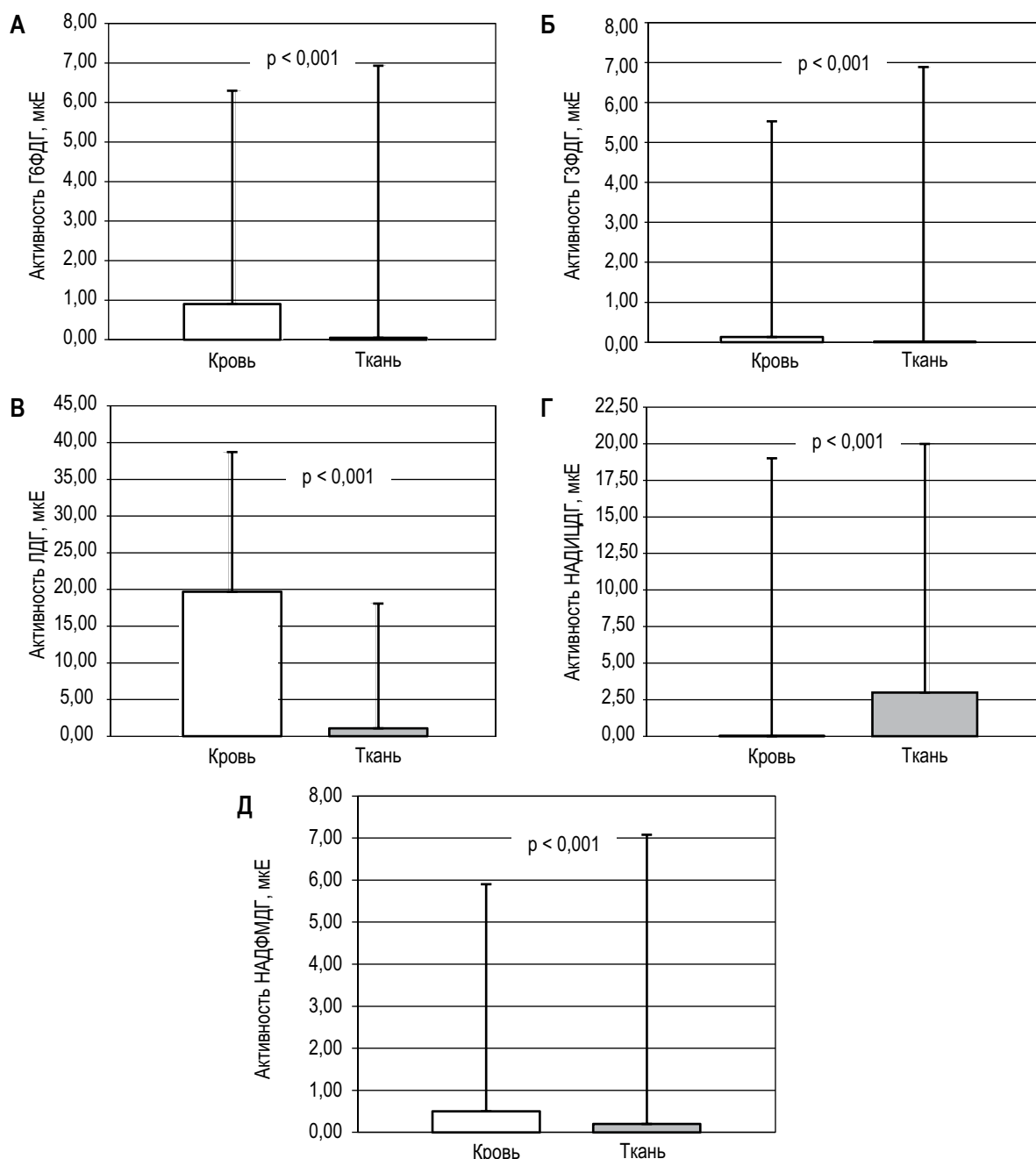


Рисунок 1. Активность НАД-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах крови у больных ХА

А – Активность Г6ФДГ в лимфоцитах крови и ткани при ХА
Б – Активность ГЗФДГ в лимфоцитах крови и ткани при ХА
В – Активность НАД-ЛДГ в лимфоцитах крови и ткани при ХА
Г – Активность НАДИЦДГ в лимфоцитах крови и ткани при ХА
Д – Активность НАДФМДГ в лимфоцитах крови и ткани при ХА

снижением уровня наработки НАДН в гликолизе [2, 10]. Низкий уровень пирувата в гликолизе может привести к снижению интенсивности субстратного потока по циклу трикарбоновых кислот [11], что выявляется через резко сниженную активность МДГ (рис. 1В). В то же время низкая

активность фермента НАДГДГ (рис. 1Г), поставляющего продукты аминокислотного обмена в цикл Кребса и НАДН-ГДГ (рис. 2В) – фермента, который осуществляет НАД-зависимый перенос субстратов с цикла Кребса на реакции аминокислотного обмена, определяет нали-

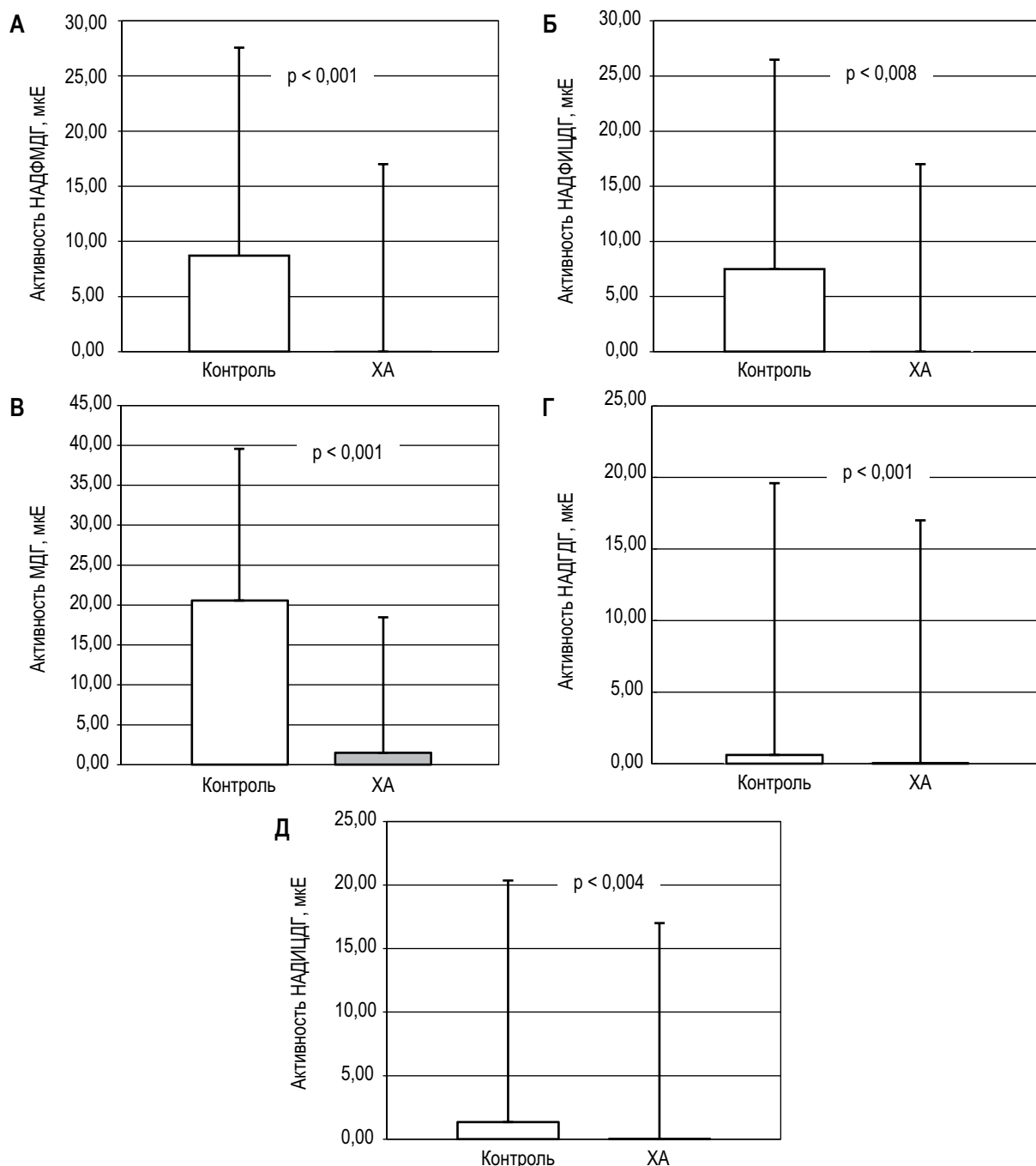


Рисунок 2. Активность НАДФН-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах крови у больных ХА

А – Активность НАДФМДГ в лимфоцитах крови при ХА и контроле
Б – Активность НАДФИЦДГ в лимфоцитах крови при ХА и контроле
В – Активность НАД-МДГ в лимфоцитах крови при ХА и контроле
Г – Активность НАД-ГДГ в лимфоцитах крови при ХА и контроле
Д – Активность НАДИЦДГ в лимфоцитах крови при ХА и контроле

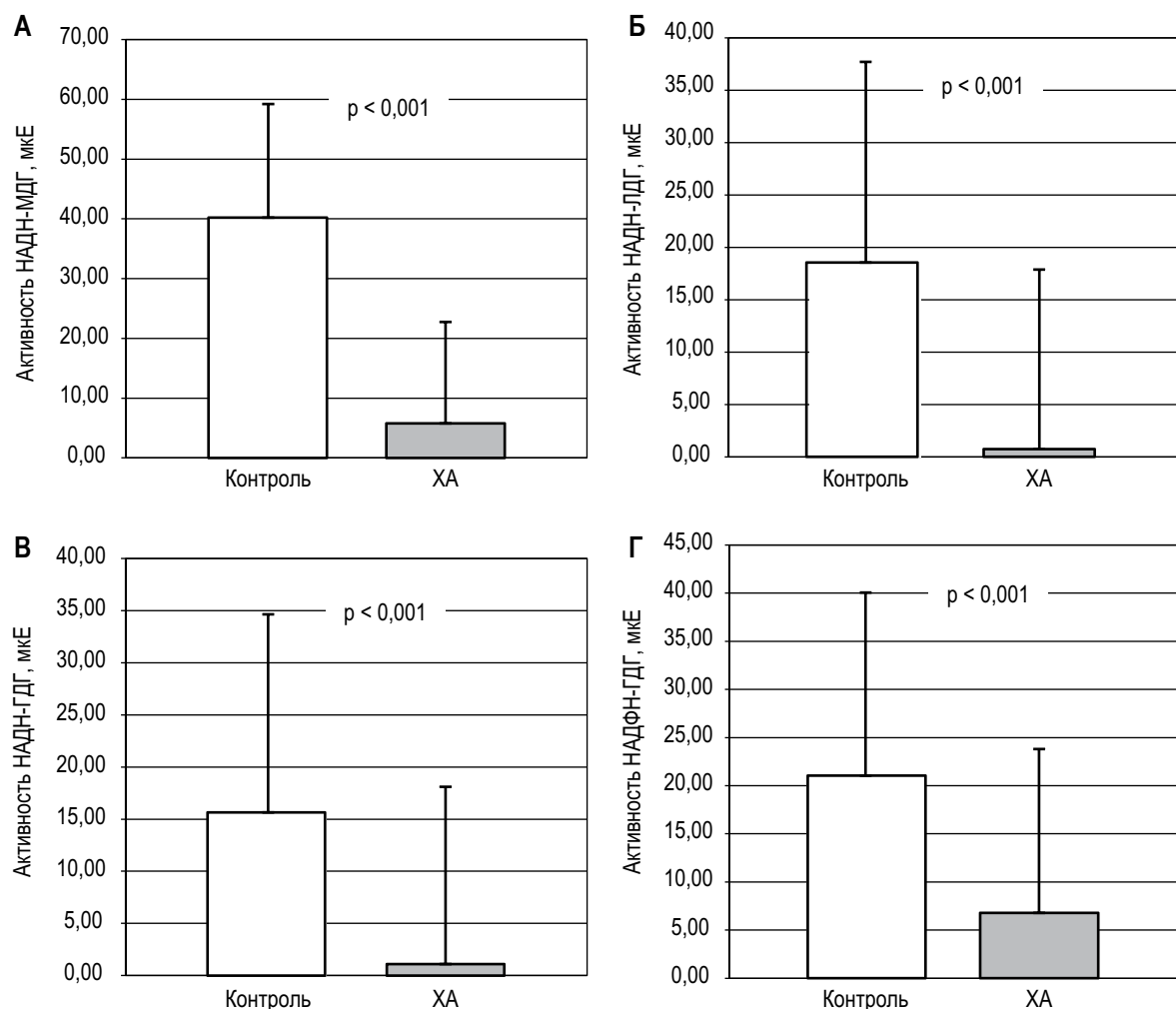


Рисунок 3. Активность НАД-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах крови и лимфоидной ткани у больных ХА

А – Активность НАДН-МДГ в лимфоцитах крови при ХА и контроле
Б – Активность НАДН-ЛДГ в лимфоцитах крови при ХА и контроле
В – Активность НАДН-ГДГ в лимфоцитах крови при ХА и контроле
Г – Активность НАДФН-ГДГ в лимфоцитах крови при ХА и контроле

чие компенсаторных процессов, направленных на поддержание уровня интенсивности аэробной энергетики. Сниженные уровни активности НАДИЦДГ и МДГ (рис. 1В, Д) характеризуют функциональную недостаточность цикла Кребса. При этом низкий уровень НАДФИЦДГ (рис. 1Б) – вспомогательного фермента цикла трикарбоновых кислот – также характеризует субстратную недостаточность цикла Кребса. Также снижены процессы липидного анаболизма, что подтверждается ингибированием малик-фермента и позволяет предположить у больных ХА в лимфоцитах крови уменьшение интенсивности аэробного дыхания и обменных процессов в митохондриальном компартменте [6, 9].

Особенностью метаболизма лимфоцитов, выделенных из ткани глоточных миндалин, по сравнению с лимфоцитами венозной крови является

снижение активности ГЗФДГ (рис. 3Б). Этот фермент характеризует уровень переноса продуктов липидного катаболизма на реакции анаэробного окисления глюкозы [2, 9]. Следовательно, в лимфоцитах ткани снижена субстратная стимуляция гликолиза. В лимфоцитах, выделенных из аденоидной ткани, имеет место снижение активности аэробной реакции ЛДГ (рис. 3В), которая определяет недостаточную способность лимфоцитов метаболизировать эндогенный лактат и, в целом, в связи с ингибированием гликолиза – к снижению уровня наработки пирувата, при снижении уровня Г6ФДГ (рис. 3А) – ключевого фермента пентозофосфатного цикла, нарабатывающего интермедиаты для реакций макромолекулярного синтеза [11]. При этом повышена активность цикла Кребса, о чем свидетельствует достоверно

высокий уровень НАДИЦДГ – лимитирующего фермента цикла (рис. 3Г).

Таким образом, в лимфоцитах крови у больных ХА выявляется выраженное изменение метаболических реакций, определяющих недостаточ-

ность энергетических и пластических процессов. При этом в лимфоцитах аденоидной ткани наблюдается снижение анаэробного окисления глюкозы при повышении пластических процессов.

Список литературы / References

1. Белова Е.В., Капустина Т.А., Манчук В.Т., Коленчукова О.А. Эпидемиологическая и клиничко-патогенетическая характеристика хронического аденоидита, ассоциированного с хламидийной инфекцией // Бюллетень РАМН, 2008. № 1. С. 101-105. [Belova E.V., Kapustina T.A., Manchuk V.T., Kolenchukova O.A. Epidemiological and clinical pathogenic characteristics of chronic adenoiditis associated with chlamydia infection. *Bulleten' RAMN = Bulletin of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2008. no. 1, pp. 101-105. (In Russ.)]
2. Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф. Биологическая химия. М.: Медицина, 1998. 704 с. [Berezov T.T., Korovkin B.F. Biological chemistry]. Moscow: Medicine, 1998. 704 p.
3. Капустина Т.А., Белова Е.В., Манчук В.Т., Коленчукова О.А. Хроническая инфекция у детей, страдающих хроническим аденоидитом // Вестник оториноларингологии, 2008. № 2. С. 23-26. [Kapustina T.A., Belova T.V., Manchuk V.T., Kolenchukova O.A. [Chlamydial infection in chronic adenoiditis children. *Vestnik otorinolaringologii = Bulletin of Otolaryngology*, 2008, no. 2, pp. 23-26. (In Russ.)]
4. Хасанов С.А., Бабаханов Г.К., Хасанов М.С. Совершенствование диагностики и хирургического лечения аденоидов у детей // Вестник оториноларингологии, 2008. № 1. С. 55-57. [Khasanov S.A., Babakhanov G.R., Khasanov M.S. Improved diagnostic and surgical techniques in adenoid treatment in children]. *Vestnik otorinolaringologii = Bulletin of Otolaryngology*, 2008, no. 1, pp. 55-57. (In Russ.)]
5. Куртасова Л.М., Шмидт А.Р., Лубнина Т.В. Активность НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах периферической крови у детей раннего возраста с гипертрофией глоточной миндалины // Медицинская иммунология, 2014. Т. 16, № 4. С. 381-384. [Kurtasova L.M., Shmidt A.R., Lubnina T.V. NAD(P)-dependent dehydrogenase activity in peripheral blood lymphocytes of infants with enlargement of pharyngeal tonsils. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2014, Vol. 16, no. 4, pp. 381-384. (In Russ.)]
6. Куртасова Л.М., Савченко А.А., Манчук В.Т. Метаболические аспекты иммунореабилитации детей с atopическими заболеваниями. Новосибирск: Наука, 2006. 222 с. [Kurtasova L.M., Savchenko A.A., Manchuk V.T. Metabolic aspects of immunorehabilitation of children with atopie diseases]. Novosibirsk: Science, 2006. 222 p.
7. Лукашевич М.Г., Киселев В.В., Кирий Г.И. Аденоиды и часто болеющие дети – клиничко-морфометрические параллели // Вестник оториноларингологии, 2010. № 4. С. 35-37. [Lukashevich M.G., Kiselev V.V., Kiriy G.I. Adenoids and sickly children: clinico-morphological parallels. *Vestnik otorinolaringologii = Bulletin of Otolaryngology*, 2010, no. 4, pp. 35-37. (In Russ.)]
8. Савченко А.А., Сунцова Л.Н. Высококочувствительное определение активности дегидрогеназ в лимфоцитах периферической крови биолуминесцентным методом // Лабораторное дело, 1989. № 11. С. 23-25. [Savchenko A.A., Suntsova L.N. Highly sensitive determination of activity dehydrogenase in lymphocytes of peripheral blood by a bioluminescent method. *Laboratornoe delo = Laboratory Diagnostics*, 1989, no. 11, pp. 23-25. (In Russ.)]
9. Jeong D.W., Cho I.T., Kim T.S. Effects of lactate dehydrogenase suppression and glycerol-3-phosphate dehydrogenase overexpression on cellular metabolism. *Mol. Cell. Biochem.*, 2009, Vol. 284, no. 1-2, pp. 1-8.
10. Luo C., Wang X., Long J., Liu J. An NADH-tetrazolium-coupled sensitive assay for malate dehydrogenase in mitochondria and crude tissue homogenates. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 2008, Vol. 68, no. 2, pp. 101-111.
11. Park I., Choe S.S., Choi A.H., Kim K.H., Yoon M.J., Suganami T., Ogawa Y., Kim J.B. Increase in Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase in Adipocytes Stimulates Oxidative Stress and Inflammatory Signals. *Diabetes*, 2006, Vol. 55, pp. 2939-2949.

Авторы:

Коленчукова О.А. — д.б.н., доцент, ведущий научный сотрудник, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера», г. Красноярск, Россия

Савченко А.А. — д.м.н., профессор, заведующий лабораторией молекулярно-клеточной физиологии и патологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера», г. Красноярск, Россия

Authors:

Kolenchukova O.A., PhD, MD (Biology), Associate Professor, Leading Research Associate, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation

Savchenko A.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Laboratory of Molecular and Cellular Physiology and Pathology, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation

Поступила 12.03.2015

Отправлена на доработку 16.03.2015

Принята к печати 06.04.2015

Received 12.03.2015

Revision received 16.03.2015

Accepted 06.04.2015