

МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ В ЛИМФОЦИТАХ БОЛЬНЫХ ОСТРЫМИ РЕСПИРАТОРНЫМИ ВИРУСНЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ

И.В. Сергеева, Е.П. Тихонова, Н.И. Камзалакова, Г.В. Булыгин

*ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет имени
профессора В. Ф. Войно-Ясенецкого» Минздравсоцразвития России (г. Красноярск)*

Оценка характера и интенсивности метаболических процессов в лимфоцитах больных острыми респираторными вирусными инфекциями с различной степенью тяжести определялась по изменениям активности внутриклеточных ферментов и показала, что в разгар заболевания отмечена разнонаправленность интенсификации реакций пентозофосфатного цикла и гликолиза, а также при значительном повышении функциональной нагрузки на клетки происходит значительное снижение интенсивности реакций начального этапа цикла трикарбоновых кислот, что должно уменьшать энергетическую эффективность цикла, а интенсивное поступление метаболитов для снабжения цикла трикарбоновых кислот субстратами с аминокислотного обмена будет обеспечивать повышенный транспорт аминокислот в лимфоциты.

Ключевые слова: острые респираторные вирусные инфекции, лимфоциты, метаболические процессы, активность внутриклеточных ферментов.

Сергеева Ирина Владимировна — кандидат медицинских наук, ассистент кафедры инфекционных болезней и эпидемиологии с курсом ПО ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В. Ф. Войно-Ясенецкого», рабочий телефон: 8 (391) 220-13-77, факс: 8 (391) 220-13-77, e-mail: infeccia7979@mail.ru

Камзалакова Наталья Ивановна — доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой клинической иммунологии ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В. Ф. Войно-Ясенецкого», рабочий телефон: 8 (391) 220-15-52, e-mail: clinimm@mail.ru

Тихонова Елена Петровна — доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой инфекционных болезней и эпидемиологии с курсом ПО ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В. Ф. Войно-Ясенецкого», рабочий телефон: 8 (391) 220-15-52

Булыгин Геннадий Викторович — доктор медицинских наук, профессор кафедры клинической иммунологии ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В. Ф. Войно-Ясенецкого», рабочий телефон: 8 (391) 220-15-52

Острые респираторные вирусные инфекции (ОРВИ) являются самыми распространенными вирусными инфекциями человека и представляют собой серьезную медико-социальную проблему. По оценкам ВОЗ, гриппоподобными заболеваниями ежегодно в мире болеют до 100 млн человек [5, 6, 8]. Удельный вес гриппа и ОРВИ среди всех инфекционных болезней в России составляет 90 %. Не исключение это и для Красноярского края, где доля ОРВИ в общей структуре инфекционной заболеваемости составила в 2010 году 92 %. Так в 2010 году было зарегистрировано 572 618 случаев заболеваний гриппом и ОРВИ, а показатель заболеваемости составил 19 786,9 случаев на 100 тыс. населения, что на 18,3 % ниже показателя заболеваемости 2009 года — 23 954,9 случаев на 100 тыс. населения.

Известно, что развитие, тяжесть любого инфекционного заболевания и его исход зависят от состояния иммунной системы, её ответа на внедрившийся микроорганизм, в результате развития этого ответа происходит распознавание возбудителя, его инактивация и элиминация из организма. В патогенезе и клиническом течении ОРВИ также существенную роль играют нарушения иммунологического механизма защиты организма человека. По мнению ряда авторов, изменения, происходящие в иммунной системе при ОРВИ, расцениваются как адаптационная реакция организма на воздействие вирусов [1–3]. В первую очередь с патогеном контактируют иммунокомпетентные клетки, функциональное состояние которых и обуславливает адекватность иммунного ответа; наиболее важная роль среди них принадлежит лимфоцитам. Проявление в полном объеме функциональных возможностей лимфоцитов в процессах формирования адекватного иммунного ответа, в том числе и противовирусного, определяется внутриклеточным метаболизмом, который обеспечивается соответствующим уровнем активности ферментов в клетках [4, 7].

Целью исследований явилась оценка характера и интенсивности метаболических процессов в лимфоцитах больных ОРВИ по изменениям активности внутриклеточных ферментов в зависимости от тяжести течения болезни.

Материалы и методы. Для достижения поставленной цели определялись энзиматические показатели лимфоцитов 52-х больных в возрасте от 18 до 42 лет, с диагнозом ОРВИ, который устанавливался в условиях специализированного стационара. Определение активности ферментов производилось в лимфоцитах, выделенных из периферической крови больных ОРВИ в течение первых суток после поступления на стационарное лечение. Обследованные больные были распределены на 2 группы: перенесшие ОРВИ легким и среднетяжелым течением и с тяжелым течением заболевания. В качестве контрольных показателей использовались значения активности внутриклеточных ферментов лимфоцитов 37-ми практически здоровых лиц сопоставимого возраста, полученные нами ранее.

У всех больных в лимфоцитах, выделенных из венозной крови на градиенте плотности фиколл-верографина, биолюминесцентным методом с использованием бактериальной люциферазы, проводилось определение активности внутриклеточных ферментов. Определялись следующие энзиматические показатели: активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ), глицерол-3-фосфатдегидрогеназы (Г-3-ФДГ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), НАД- и НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназы (НАДИЦДГ и НАДФИЦДГ), НАД- и НАДФ-зависимой глутаматдегидрогеназы (НАДГДГ и НАДФГДГ), НАД- и НАДФ-зависимой малатдегидрогеназы (НАДМДГ и НАДФМДГ), а также глутатионредуктазы (ГР). Активность ферментов выражалась в мКЕ на 10 000 лимфоцитов.

Полученные в результате исследований данные были обработаны методами статистического анализа, используемыми в биологии и медицине с применением пакета прикладных программ Statistica 6.0. В таблицах представлены среднегрупповые показатели (М) и ошибка средней (m). В связи с тем, что распределение показателей активности внутриклеточных ферментов отличалось от нормального, оценка достоверности различий проводилась с помощью U-критерия Манна-Уитни.

Результаты и обсуждение. Определявшиеся в исследовании энзиматические показатели свидетельствовали о значительных отличиях внутриклеточных метаболических реакций лимфоцитов больных в разгаре заболевания от соответствующих параметров практически здоровых лиц контрольной группы (см. табл.).

Активность ферментов в лимфоцитах (мкЕ/10 000 кл.) больных с разными вариантами течения ОРВИ (М ± m)

Ферменты	Контроль n = 37	ОРВИ течение легкое и средней тяжести n = 31	Тяжелое течение ОРВИ n = 21
	1	2	3
Г-6-ФДГ	2,74 ± 0,31	3,23 ± 0,62 P ₁ < 0,05	2,75 ± 0,35
Г-3-ФДГ	0,84 ± 0,16	51,58 ± 5,92 P ₁ < 0,001	113,38 ± 14,30 P ₁ < 0,001 P ₂ < 0,001
ЛДГ	0,84 ± 0,08	0,49 ± 0,08 P ₁ < 0,001	1,23 ± 0,19 P ₂ < 0,001
НАДИЦДГ	1,95 ± 0,25	0,13 ± 0,02 P ₁ < 0,001	0,45 ± 0,08 P ₁ < 0,001 P ₂ < 0,001
НАДФИЦДГ	31,02 ± 2,20	0,04 ± 0,01 P ₁ < 0,001	0,30 ± 0,05 P ₁ < 0,001 P ₂ < 0,001
НАДГДГ	0,34 ± 0,06	58,91 ± 5,49 P ₁ < 0,001	121,42 ± 16,53 P ₁ < 0,001 P ₂ < 0,001
НАДФГДГ	0,11 ± 0,02	1,23 ± 0,18 P ₁ < 0,001	7,51 ± 0,87 P ₁ < 0,001 P ₂ < 0,001
НАДМДГ	21,62 ± 1,69	84,16 ± 13,70 P ₁ < 0,001	111,20 ± 8,79 P ₁ < 0,001 P ₂ < 0,001
НАДФМДГ	0,33 ± 0,07	1,19 ± 0,15 P ₁ < 0,001	3,72 ± 0,42 P ₁ < 0,001 P ₂ < 0,001
ГР	1,28 ± 0,30	5,00 ± 0,25 P ₁ < 0,001	7,87 ± 0,57 P ₁ < 0,001 P ₂ < 0,001

Примечание: P₁, P₂, P₃ — достоверность различий с показателем соответствующего столбца

Так при легком и среднетяжелом течении ОРВИ в лимфоцитах больных определялись достоверные при сравнении с уровнем контроля отличия активности всех изученных ферментов, однако изменения энзиматических показателей были разнонаправленными. Два фермента, ассоциированных с гликолизом (Г-6-ФДГ и Г-3-ФДГ) у больных ОРВИ,

были достоверно более активными, чем в контроле: активность Г-6-ФДГ была равна соответственно $3,23 \pm 0,62$ и $2,74 \pm 0,31$ ($p < 0,05$), а Г-3-ФДГ — $51,58 \pm 5,92$ и $0,84 \pm 0,16$ ($p < 0,001$). В то же время еще один фермент этого цикла — ЛДГ — у больных определялся менее активным, чем у обследованных из контрольной группы: $0,49 \pm 0,08$ и $0,84 \pm 0,08$ соответственно; $p < 0,001$.

Для ферментов цикла трикарбоновых кислот (ЦТК) и ассоциированных с ним реакций также отмечались разнонаправленные по отношению к уровню контроля изменения. Показатели в лимфоцитах НАДИЦДГ и НАДФИЦДГ, катализирующие реакции начального этапа цикла, у больных были ниже, чем в контроле: первый у больных равен $0,13 \pm 0,02$ при значении у больных равном $1,95 \pm 0,25$ ($p < 0,001$), а для второго эти значения составили соответственно $0,04 \pm 0,01$ и $31,02 \pm 2,20$ ($p < 0,001$). Следующие два фермента, связывающие между собой метаболизм аминокислотного обмена и ЦТК, НАДГДГ и НАДФГДГ, были достоверно более активными у больных с легким и среднетяжелым течением ОРВИ. Показатели НАДГДГ у больных и здоровых составили соответственно $58,91 \pm 5,49$ и $0,34 \pm 0,06$ ($p < 0,001$), а фермента НАДФГДГ — $1,23 \pm 0,18$ и $0,11 \pm 0,02$ ($p < 0,001$).

Метаболические реакции заключительного этапа ЦТК, катализируемые НАД- и НАДФ-малатдегидрогеназой, также определялись на более высоком уровне в лимфоцитах больных. Активность НАДМДГ у них была равна $84,16 \pm 13,70$ (в контрольной группе — $84,16 \pm 13,70$; $p < 0,001$), а НАДФМДГ — $1,19 \pm 0,15$ (в контроле — $0,33 \pm 0,07$; $p < 0,001$).

Как и для большинства изученных ферментов, для ГР отмечена более высокая активность в группе больных легкой и среднетяжелой формами ОРВИ: у них она определялась на уровне $5,00 \pm 0,25$ при величине показателя здоровых равным $1,28 \pm 0,30$ ($p < 0,001$). При тяжелом течении ОРВИ с последующими осложнениями в лимфоцитах больных определялись во многом подобные, по сравнению с контрольным уровнем, изменения метаболических реакций (см. табл.). Как и в предыдущей группе обследованных, выше, чем в контроле, были активность ферментов Г-3-ФДГ ($p < 0,001$), НАДГДГ ($p < 0,001$), НАДФГДГ ($p < 0,001$), НАДМДГ ($p < 0,001$), НАДФМДГ ($p < 0,001$) и ГР ($p < 0,001$); а ниже контрольного уровня — НАДИЦДГ ($p < 0,001$) и НАДФИЦДГ ($p < 0,001$). В отличие от легкого и среднетяжелого течения заболевания, в лимфоцитах больных этой группе не было обнаружено достоверных по сравнению с контролем изменений активности Г-6-ФДГ и ЛДГ.

Наиболее общим обстоятельством, обращающим на себя внимание при анализе энзиматических показателей лимфоцитов больных этой группы, является то, что активность почти всех (за исключением Г-6-ФДГ) ферментов определялась выше, чем при легком и среднетяжелом течении ОРВИ. Так, достоверно более высоким, чем в предыдущей группе больных, были показатели Г-3-ФДГ (соответственно $113,38 \pm 14,30$ и $51,58 \pm 5,92$; $p < 0,001$), ЛДГ ($1,23 \pm 0,19$ и $0,49 \pm 0,08$; $p < 0,001$), НАДИЦДГ ($0,45 \pm 0,08$ и $0,13 \pm 0,02$; $p < 0,001$), НАДФИЦДГ ($0,30 \pm 0,05$ и $0,04 \pm 0,01$; $p < 0,001$), НАДГДГ ($121,42 \pm 16,53$ и $58,91 \pm 5,49$; $p < 0,001$), НАДФГДГ ($7,51 \pm 0,87$ и $1,23 \pm 0,18$; $p < 0,001$), НАДМДГ ($111,20 \pm 8,79$ и $84,16 \pm 13,70$; $p < 0,001$), НАДФМДГ ($3,72 \pm 0,42$ и $1,19 \pm 0,15$; $p < 0,001$), а также ГР ($7,87 \pm 0,57$ и $5,00 \pm 0,25$; $p < 0,001$). И только активность фермента Г-6-ФДГ определялась ниже в группе с более тяжелым течением ОРВИ, не отличаясь при этом и от уровня контрольного значения.

Заключение. Таким образом, при легком и среднетяжелом течении ОРВИ у пациентов наблюдаются следующие особенности внутриклеточного метаболизма лимфоцитов. У них в 61,4 раза более активно, чем у здоровых, осуществляется пополнение гликолиза субстратами с липидного обмена, что, вероятно, и обеспечивает возможность более

интенсивного оттока субстратов на пентозофосфатный путь; однако активность реакции, перерабатывающей лактат в пируват, у них ниже. Активность реакций начального этапа ЦТК в лимфоцитах больных в десятки раз ниже, что, по-видимому, и является причиной дополнительного привлечения субстратов с аминокислотного обмена через реакции, катализируемые НАДГДГ и НАДФГДГ для сохранения возможностей цикла по выработке макроэргов. Это не вполне рациональное использование аминокислот, предназначенных для обеспечения синтетических и пластических потребностей клеток на их энергетические нужды, должно быть обеспечено более интенсивным их поступлением в лимфоциты извне. Этим можно объяснить высокий показатель ГР, которая не только поддерживает возможности глутатионовой антиоксидантной защиты, активация которой вполне адекватна в условиях патологического процесса с участием иммунокомпетентных клеток, но и осуществляет активный транспорт в них аминокислот.

Такое компенсаторное восполнение субстратного потока в ЦТК оказывается вполне оправданным, с точки зрения поддержки функциональных возможностей лимфоцитов, и реакции заключительного наиболее эффективного по выработке АТФ этапа цикла у больных более активны, чем в контроле. Показатель НАДМДГ у пациентов с ОРВИ выше в 3,89 раза, а НАДФМДГ — в 3,61 раза по сравнению с контролем, т. е. повышены как выработка АТФ, так и объем субстратов ЦТК на гликолиз реакцией малат-пируват, а более высокое количество последнего является фактором, снижающим активность реакции лактат-пируват, о чем указывалось выше.

В лимфоцитах больных с тяжелым течением ОРВИ сохраняются во многом подобные закономерности в соотношении величин большинства ферментных показателей с уровнем их контрольных значений, т. е. можно считать, что метаболические механизмы формирования функциональных возможностей лимфоцитов пациентов с ОРВИ едины, но их особенности зависят от степени тяжести заболевания. Более тяжелый вариант течения патологического процесса сопровождается и более выраженной интенсификацией ряда внутриклеточных реакций ЦТК, о чем свидетельствуют более высокие, чем при легком и среднетяжелом течении ОРВИ. Следует отметить, что интенсификация реакций, обусловленная тяжестью течения заболевания, подтверждается и изменением соотношений величин двух ферментов начального этапа ЦТК с контрольным уровнем: вследствие чего ее значения активности НАД- и НАДФИЦДГ в лимфоцитах больных второй группы становятся по своей величине ближе к показателям контрольной группы.

Не так однозначны при более тяжелом варианте течения ОРВИ были изменения активности ферментов, относящихся к реакциям гликолиза. Если показатель Г-3-ФДГ, подобно показателям ферментов ЦТК, продолжал увеличиваться с утяжелением заболевания, то для ЛДГ отмечена обратная тенденция — этот фермент резко повышал свою активность как по отношению к величине показателя больных с легким и среднетяжелым течением заболевания ($p < 0,001$), так и в 1,5 раза — к уровню контроля (однако разница с контролем по U-критерию недостоверна). Активность же Г-6-ФДГ, как уже указывалось, не отличалась от контрольной и была ниже, чем в группе с легким и среднетяжелым течением заболевания. Вероятно, это обстоятельство может явиться одним из факторов, определяющим тяжесть течения ОРВИ, так как этот фермент отражает интенсивность реакций в пентозофосфатном пути и обеспечение внутриклеточным метаболизмом способности лимфоцитов к синтетическим, пластическим и пролиферативным процессам. Без повышенных же возможностей клеток к пролиферации синтезу цитокинов, иммуноглобулинов и других гуморальных факторов невозможно развитие иммунного ответа адекватного условиям, предъявляемым инфекционной агрессией.

Список литературы

1. Булыгин Г. В. Особенности структурно-метаболических параметров Т- и В-лимфоцитов здорового человека и при некоторых патологических состояниях / Г. В. Булыгин, Г. Н. Казакова, Э. В. Каспаров. — Красноярск : «Сибирь», 1998. — 127 с.
2. Булыгин Г. В. Метаболические основы регуляции иммунного ответа / Г. В. Булыгин, Н. И. Камзалакова, А. В. Андрейчиков. — Новосибирск : СО РАМН, 1999. — 346 с.
3. Бурместер Г. Р. Наглядная иммунология / Г. Р. Бурместер, А. Пецутто. — М. : БИНОМ, Лаборатория знаний, 2007. — 320 с.
4. Гаврилов А. В. Цитохомия липидов нейтрофильных лейкоцитов периферической крови у больных гриппом А (H3N2) / А. В. Гаврилов // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. — 2006. — № 22. — С. 36–39.
5. Карпухина Г. И. Грипп : руководство для врачей / Г. И. Карпухина. — СПб. : Гиппократ, 2001. — 360 с.
6. Деева Э. Г. Грипп. На пороге пандемии : руководство для врачей / Э. Г. Деева. — М. : ГЭОТАР-Медиа, 2008. — 208 с.
7. Дранник Г. Н. Клиническая иммунология и аллергология / Г. Н. Дранник. — М. : ООО «Медицинское информационное агентство», 2003. — 604 с.
8. Карпухин Г. И. Диагностика, профилактика и лечение острых респираторных заболеваний / Г. И. Карпухин, О. Г. Карпухина. — СПб. : Гиппократ, 2000. — 184 с.

METABOLIC PROCESSES IN LYMPHOCYTES AT PATIENTS WITH UPPER RESPIRATORY TRACT INFECTIONS

I.V. Sergeyeva, E.P. Tikhonova, N.I. Kamzalakova, G.V. Bulygin

*SBEI HPE «Krasnoyarsk State Medical University n.a. professor V.F. Voyno-Yasenetsky
Minhealthsocdevelopment» (с. Krasnoyarsk)*

The estimation of temperament and intensity of metabolic processes in lymphocytes at patients with varying severity of upper respiratory tract infection was determined according to changes of desmoenzymes activity. It showed that the different reacting intensification of pentose phosphate cycle and glycolysis was registered at the height of disease. Also at substantial increase of functional load on cells there is an appreciable reacting intensity depression of initial stage of tricarboxylic acids cycle that should reduce power efficiency of cycle. And intensive admission of metabolites for supply of tricarboxylic acids cycle by substrates of amino-acid exchange will provide the raised transport of amino acids to lymphocytes.

Keywords: upper respiratory tract infection, lymphocytes, metabolic processes, activity of desmoenzymes.

About authors:

Sergeeva Irina Vladimirovna — candidate of medical sciences, assistant of infectious diseases and epidemiology chair with IE course at SBEI HPE «Krasnoyarsk State Medical University n.a. professor V.F. Voyno-Yasenetsky Minhealthsocdevelopment», office phone: 8 (391) 220-13-77, fax: 8 (391) 220-13-77, e-mail: infeccia7979@mail.ru

Kamzalakova Natalia Ivanovna — doctor of medical sciences, professor, head of clinical immunology chair at SBEI HPE «Krasnoyarsk State Medical University n.a. professor V.F. Voyno-Yasenetsky Minhealthsocdevelopment», office phone: 8 (391) 220-15-52, e-mail: clinimm@mail.ru

Tikhonova Elena Petrovna — doctor of medical sciences, professor, head of infectious diseases and epidemiology chair with IE course at SBEI HPE «Krasnoyarsk State Medical University n.a. professor V.F. Voyno-Yasenetsky Minhealthsocdevelopment», office phone: 8 (391) 220-15-52

Bulygin Gennady Viktorovich — doctor of medical sciences, professor of clinical immunology chair at SBEI HPE «Krasnoyarsk State Medical University n.a. professor V.F. Voyno-Yasenetsky Minhealthsocdevelopment», office phone: 8 (391) 220-15-52

List of the Literature:

1. Bulygin G. V. Features of structural and metabolic parameters T — and V-lymphocytes of healthy person and at some pathological conditions / G. V. Bulygin, G. N. Kazakova, E.V. Kasparov. — Krasnoyarsk: «Siberia», 1998. — 127 P.
2. Bulygin G. V. Metabolic bases of regulation of immune answer / G. V. Bulygin, N. I. Kamzalakova, A. V. Andreychikov. — Novosibirsk: SB RAMS, 1999. — 346 P.
3. Burmester G R. Evident immunology / G. R. Burmester, A. Petsutto. — M: BINOMIAL, Laboratory of knowledge, 2007. — 320 P.
4. Gavrilov A. V. Lipids cytochemistry of neytrofilny leucocytes of aperipheric blood at patients with flu A (H3N2) / A. V. Gavrilov // the Bulletin of physiology and respiration pathology. — 2006. — № 22. — P. 36-39.
5. Karpukhina G. I. Flu: guidance for doctors / G. I. Karpukhina. — SPb.: Hippocrates, 2001. — 360 P.
6. Deeva E. G. Flu. On pandemic threshold: guidance for doctors / E. G. Deeva. — M: GEOTAR-media, 2008. — 208 P.
7. Drannik G. N. Clinical immunology and allergology / G. N. Drannik. — M: LC Medical informational agency, 2003. — 604 P.
8. Karpukhin G. I. Diagnostics, prophylaxis and treatment of upper respiratory tract infection / G. I. Karpukhin, O. G. Karpukhina. — SPb.: Hippocrates, 2000. — 184 P.