

Кудрявцева А.В.¹, Петричук С.В.², Семёнова Г.Ф.², Измайлова Т.Д.², Курбатова О.В.²

Особенности энергетического обмена в митохондриях лимфоцитов периферической крови у детей и подростков с тяжелыми формами atopического дерматита

1 - ГБОУ ВПО "Первый МГМУ им. И.М.Сеченова", г.Москва; 2 - НЦЗД РАМН, г.Москва

Kudryavtseva A.V., Petrichuk S.V., Semenova G.F., Izmailova T.D., Kurbatova O.V.

The features of power activity within mitochondrions of peripheral blood lymphocytes among in children and teenagers with severe atopic dermatitis

Резюме

В статье представлены результаты исследования метаболического обмена лимфоцитов периферической крови у детей и подростков с тяжелым течением atopического дерматита в период обострения заболевания. Выявлено, что при тяжелом течении atopического дерматита на фоне снижения биоэнергетического обмена (активность фермента сукцинатдегидрогеназы, НАДН-диафоразы) в лимфоцитах наблюдается истощение энергетических возможностей (активность фермента α-глицерофосфатдегидрогеназы) наиболее экономичного пути получения питания для всех метаболических процессов, происходящих в клетках.

Ключевые слова: atopический дерматит, обострение, дети, тяжелое течение, основные митохондриальные ферменты (СДГ, НАДН-Д, α-ГФДГ)

Summary

This article presents the findings gained on the metabolic exchange of peripheral blood lymphocytes in children and teenagers with severe atopic dermatitis in the acute phase. It has been revealed that in severe atopic dermatitis accompanied by a decreased metabolic exchange (succinate dehydrogenase NADH-D enzymes activity,) lymphocytes demonstrate a depletion of energetic options (α-glycerophosphate dehydrogenase enzyme activity) used as the most economical way of obtaining power for all metabolic processes in cells.

Key words: atopic dermatitis, acute phase, children, severe course, basic mitochondrial enzymes (SDH, NADH-D, α-GPhDH)

Введение

Среди заболеваний детского возраста в последнее время преобладают аллергические заболевания, представляющие чрезвычайно важную медико-социальную проблему. Из этих заболеваний можно выделить аллергические повреждения кожи, основным из которых является atopический дерматит, распространенность и тяжелые формы которого имеют постоянную тенденцию к росту.

Несмотря на большие успехи, достигнутые в изучении особенностей возникновения и развития atopического дерматита у детей, часто не удается предотвратить формирование тяжелых форм заболевания, приводящих к инвалидизации и ухудшению качества жизни больного ребенка [1,2].

Atopический дерматит (АтД) – хроническое аллергическое заболевание кожи, имеющее непрерывно-рецидивирующее течение. В формировании АтД играют роль самые разнообразные факторы.

В настоящее время хорошо изучены иммунные механизмы формирования аллергических реакций немедленного и замедленного типов [1]. Особенности взаимодействия клеток иммунной системы (пролиферация Т-лимфоцитов пула CD4+, как и вовлечение многих других иммунокомпетентных клеток в каскад патофизиологических изменений), свойственные АтД, представлены в многочисленных публикациях [3–6].

Вместе с тем, неясны процессы, приводящие к формированию тяжелых вариантов течения АтД у детей разного возраста с различными клинико-морфологическими проявлениями болезни. Недостаточно изучены метаболические процессы в лимфоцитах при тяжелом течении АтД.

Р.П. Нарциссов и соавт. (1998) с помощью количественного цитохимического анализа ферментного статуса лимфоцита показали, что лимфоцит – «энзиматическое зеркало», отражающее состояние обменных процес-

сов, происходящих в клетках внутренних органов, исследование которых в живом организме невозможно [7].

Знание о состоянии энергетического обмена лимфоцита может вооружить врачей дополнительными данными о прогнозе, тяжести течения и эффективности лечения заболевания, а также о динамике процесса адаптации.

Цель работы – исследование активности основных митохондриальных ферментов (сукцинатдегидрогеназа – СДГ – основной фермент цикла Кребса; никотинамидадениндинуклеотид-диафлораза – НАДН-Д, осуществляющая перенос восстановленных эквивалентов цитоплазматического НАД-Н внутрь митохондрий, в результате чего конечным продуктом реакции в аэробных условиях оказывается пируват и альфа-глицерофосфатдегидрогеназа – α -ГФДГ – отражающая активность анаэробного гликолиза в клетке) у детей и подростков с АтД тяжелого течения.

Материалы и методы

В исследование включены 36 детей и подростков, страдающих АтД; 25 – с тяжелым течением и 11 – со среднетяжелым течением заболевания, в возрасте от 3-х месяцев до 15,9 лет.

Больные с тяжелым течением АтД распределялись по возрасту следующим образом: до года – 5 больных (средний возраст=0,7±0,19 лет); от года до 5 лет – 6 (средний возраст=2,1±1,1 лет); старше 5 лет – 14 (средний возраст=11,4±1,6 лет).

Все дети были обследованы в период обострения болезни. При величине индекса SCORAD от 30 до 60 баллов обострение АтД расценивали, как среднетяжелое, более 60 баллов, как тяжелое.

У всех больных имел место ранний дебют АтД; средний возраст дебюта составил 0,3±1,2 лет; трое детей болели с самого рождения.

Для определения активности митохондриальных дегидрогеназ лимфоцитов использовали количественный цитохимический анализ с применением световой микроскопии. Кроме уровней активности внутриклеточных ферментов (СДГ), НАДН-Д и α -ГФДГ) с расчетом параметров распределения клеток по активности фермента, определяли также активность кислой фосфатазы (КФ) в лимфоцитах периферической крови.

Цитоморфоденситометрический метод выявления активности дегидрогеназ включал применение анализа

тора изображений фирмы «Diagnost», с помощью которого оценивали активность СДГ и НАДН-Д с расчетом общего продукта ферментной реакции и индекса соотношения активности СДГ/НАДН-Д [8–10].

Результаты исследования обработаны методами вариационной статистики (программы Statistica 6.0, WINSTAT 4.3 и SPSS 9.0). При сравнения показателей до и после лечения использован *t*-тест Стьюдента для парно связанных значений, процента изменения показателей между группами – непараметрический *U*-тест Манна-Уитни.

Результаты и обсуждение

При анализе особенностей метаболизма лимфоцитов у детей и подростков с АтД тяжелого и среднетяжелого течения в период обострения заболевания было отмечено резкое снижение активности СДГ, α -ГФДГ и увеличение активности КФ по сравнению с группой условно здоровых детей.

При изучении особенностей энергетического обмена в лимфоцитах у детей с АтД в период обострения было отмечено снижение активности СДГ независимо от тяжести течения заболевания и возраста больных ($p < 0,001$); в свою очередь, активность НАДН-Д при среднетяжелом течении болезни была достоверно повышена (табл. 1).

При тяжелом течении АтД достоверно более низкие значения активности СДГ выявлены у детей младше 5 лет по сравнению с больными старшего возраста; у детей этой группы также была снижена активность НАДН-Д (табл. 2).

Индекс соотношения СДГ/НАДН-Д ниже 1,0 был выявлен только у больных с тяжелым течением болезни: из них – у 4-х детей раннего возраста (средний возраст=1±0,4 лет) и у 7 – старшего (средний возраст=12,2±1,8 лет).

Снижение активности СДГ при нормальной или увеличенной активности НАДН-Д свидетельствовало об активации первого этапа дыхательной цепи митохондрий и угнетении второго этапа. Как известно, в клетках, богатых СДГ не происходит накопления лактата и можно ожидать полного окисления глюкозы с высвобождением большого количества энергии. В нашем исследовании мы ожидали увидеть возрастные энергетического потенциала клетки (увеличение активности СДГ), однако этого не происходило. Возможно, этот процесс был неустойчив

Таблица 1. Средняя активность митохондриальных ферментов лимфоцитов периферической крови (M±m) при atopическом дерматите у детей и подростков (n=36) в период обострения

Количество продукта ферментной реакции, усл. ед	Течение atopического дерматита		Контрольные значения (x=482)
	Среднетяжелое (x*=143)	тяжелое (x=264)	
Сукцинатдегидрогеназа	53470±3408 ¹	51715±2362 ¹	68085±1158
Никотинамидадениндинуклеотид-диафлораза	52390±1556 ¹	45650±3561	46698±1427
Индекс СДГ/НАДН-Д	1,26±0,09	1,3±0,09	1,44±0,05

Примечания: 1 – различия достоверны ($p < 0,05$) между полученными результатами и контрольными значениями;

*x- число исследованных лимфоцитов.

Таблица 2. Средняя активность митохондриальных ферментов лимфоцитов периферической крови ($M \pm m$) при атопическом дерматите тяжелого течения у детей и подростков ($n=25$) в период обострения

Количество продукта ферментной реакции/усл. ед	Возраст детей, лет		Контрольные значения ($n=482$)
	до 5 ($n=110$)	старше 5 лет ($n=154$)	
Сукцинатдегидрогеназа	42759 \pm 2259 ¹	54491 \pm 2352 ¹	68085 \pm 1158
Никотинамиц adenиндинуклеотид-диафораза	34087 \pm 2150 ¹	46372 \pm 3820	46698 \pm 1427
Индекс СДГ/НАДН-Д	1,3 \pm 0,153	1,2 \pm 0,153	1,44 \pm 0,05

Примечания: 1 – различия достоверны ($p < 0,05$) между полученными результатами и контрольными значениями;

* n – число исследованных лимфоцитов.

и не сохранял своей активности в заданных интервалах, так как адаптационные возможности организма были исчерпаны и не позволяли повышать энергетический потенциал клетки в целях предупреждения его «срыва».

Известно также, что НАДН-Д наряду с СДГ играет важную роль среди флавинозависимых дегидрогеназ. Они катализируют перенос электронов НАДН-К к акцептору – одному из белков дыхательной цепи. Переносчики электронов сгруппированы в так называемые «дыхательные ансамбли», встроенные в структуру внутренней митохондриальной мембраны.

Динамика активности НАДН-Д позволяет проанализировать состояние механизмов, обеспечивающих динамическое равновесие окислительно-восстановительных реакций, протекающих в лимфоцитах в период обострения АтД тяжелого течения.

Реакция окислительного фосфорилирования сохраняет приблизительно 40% энергии, высвобождающейся в процессе переноса электронов.

Как уже было упомянуто ранее, у больных со среднетяжелым течением АтД активность этого фермента была достоверно повышена. У детей младшего возраста зафиксировано достоверное снижение уровня НАДН-Д, без снижения индекса СДГ/НАДН-Д.

Вероятно, выявленные изменения являются маркерами высокой энергетической потребности клетки в условиях активно текущего иммунологически обусловленного воспалительного процесса, требующего от клетки большого количества энергии. Обмен между цитоплазмой, где происходят окислительно-восстановительные процессы и митохондриями, осуществляет «челночный» механизм переноса восстановленных эквивалентов цитоплазматиче-

ского НАДН-Н внутрь митохондрий, в результате чего конечным продуктом реакции в аэробных условиях оказывается пируват. Большое значение в этом процессе отдается также глицерофосфатному «челночному» механизму.

Исследование активности α -ГФДГ (норма от 11 до 13 гр/ЛФ) показало достоверное значительное ее снижение у всех больных с АтД независимо от возраста и тяжести течения заболевания (табл. 3). Минимальные значения обнаружены у детей с тяжелым течением АтД в возрасте до пяти лет ($p < 0,05$). Достоверной разницы при среднетяжелом и тяжелом течении у детей старшего возраста обнаружено не было.

КФ, как известно, является маркером активности утилизации продуктов метаболизма в лимфоците (норма от 45 до 60%). Обнаруженное значительное повышение уровня этого фермента позволили предположить интенсивность процесса утилизации у больных с тяжелым течением заболевания (табл. 4). Говорить о каких-то закономерностях не представлялось возможным вследствие малого числа пациентов; тем не менее, мы считаем важным значительное превышение показателя активности по сравнению с нормой у всех детей с АтД.

Выводы

Таким образом, на основании полученных результатов можно было сделать следующие выводы:

- в условиях формирования и течения АтД на фоне нестабильно протекающего окисления глюкозы (цикл трикарбоновых кислот) в лимфоцитах периферической крови снижается активность анаэробного гликолиза за счет уменьшения активности «челночных» систем (α -ГФДГ), координирующих взаимосвязь процессов дыхания и гликолиза;

Таблица 3. Активность альфа-глицерофосфатдегидрогеназы (гр/ЛФ) в лимфоцитах периферической крови у детей и подростков с различным течением атопического дерматита

Течение заболевания	Возраст больных, лет	
	до 5 ($n=19$)	старше 5 ($n=17$)
Среднетяжелое	6,1 \pm 0,56 ¹ ($n=8$)	6,6 \pm 1,0 ¹ ($n=3$)
Тяжелое	4,0 \pm 0,4 ¹ ($n=11$)	5,3 \pm 0,4 ¹ ($n=14$)

Примечание: 1 – различия достоверны ($p < 0,05$) между полученными результатами и контрольными значениями

Таблица 4. Активность кислой фосфатазы (гр/ЛФ) в лимфоцитах периферической крови у детей и подростков с различным течением атопического дерматита

Течение заболевания	Возраст больных ,лет	
	до 5 (n=19)	старше 5 (n=17)
Среднетяжелое	84,2±4,3 ¹ (n=8)	80,7±4,7 ¹ (n=3)
Тяжелое	80,1±3,6 ¹ (n=11)	77,8±1,9 ¹ (n=14)

Примечание: 1 – различия достоверны (p<0,05) между полученными результатами и контрольными значениями

- активность переносчиков электронов к дыхательным ансамблям внутренней митохондриальной мембраны увеличивается;

- усиливаются процессы катаболизма.

Снижение активности α-ГФДГ ведет к истощению возможностей наиболее экономичного пути получения питания (энергия АТФ) для всех метаболических процессов, происходящих в клетках. Вследствие этого начинают расходоваться такие энергетические субстраты, как ненасыщенные жирные кислоты, входящие в состав клеточных мембран (кожа), и гликогенные аминокислоты, что ведет к еще большей разбалансировке внутреннего гомеостаза клеток.

Все изложенное позволяет говорить о нарушении метаболических процессов в лимфоцитах, клетках, которые играют важную роль не только в развитии и поддержании аллергического воспаления при АтД, но и в его разрешении.

В литературе существует немного работ, посвященных изучению активности ферментов лимфоцитов периферической крови, и всего несколько из них посвящены проблеме АтД.

Анализ особенностей течения АтД, проведенный Е.Ю. Капустиной (2006), показал сходные закономерности [11].

По данным Л.М. Куртасовой и соавт. (2001) в период ремиссии АтД сохраняются низкие значения активности α-ГФДГ и других ферментов, отражающих интенсивность аэробного гликолиза при увеличении таковой анаэробного.

Выявленные изменения могут свидетельствовать о нестойкости ремиссии АтД у обследованных больных и необходимости проведения терапии, корригирующей внутриклеточный обмен в лимфоцитах [12].■

Кудрявцева А.В. – к.м.н., ст.н.сопр. лаборатории иммунопатологии у детей лечебного факультета при кафедре детских болезней Первого МГМУ им И.М.Сеченова, г.Москва; *Петричук С.В.* – д. б.н., зав. лабораторией цитохимии ГУ НЦЗД РАМН, г.Москва; *Семёнова Г.Ф.* – д.б.н., вед. науч. сопр. лаборатории цитохимии ГУ НЦЗД РАМН, г.Москва; *Измайлова Т.Д.* – к.м.н., ст.науч. сопр. лаборатории цитохимии ГУ НЦЗД РАМН, г.Москва; *Курбатова О.В.* – к.б.н., науч. сотрудник лаборатории цитохимии ГУ НЦЗД РАМН, г.Москва; *Австр, ответственный за переписку* - *Кудрявцева Ася Валерьевна*, Москва, ул.Б.Пироговская, д.19, стр 1, e-mail: sciencekuda@gmail.com

Литература:

1. Балаболкин И.И., Гребенюк В.Н. Атопический дерматит у детей. М., 1999; 240.
2. Кондюрина Е.Г., Филатова Т.А. и др. Атопический дерматит у детей: Современные эпидемиологические тенденции //Бюллетень СО РАМН, 2004; 1(111): 39–44.
3. Werfel T., Morita A., Grewe M. et al. Allergen specificity of skin-infiltrating T-cells is not restricted to a type-2 cytokine pattern in chronic skin lesions of atopic dermatitis//J.Invest.Dermatol., 1996; 107: 871–876.
4. Akdis C.A., Blesken T., Akdis M. et al. Role of IL-10 in specific immunotherapy//J.Clin.Invest.. 1998; 102: 98–106.
5. Hori S., Nomura T., Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor FoxP3// Science, 2003; 299: 1057–1061.
6. Roncarolo M.G., Levings M.K., Traversari C. Differentiation of T-regulatory cells by immature dendritic cells//J.Exp.Med., 2001; 193: 5–9.
7. Нарцисов Р.П. Анализ изображения клетки – следующий этап развития клинической цитохимии в педиатрии//Педиатрия, 1998; 4: 101–105.
8. Измайлова Т.Д., Радыгина Т.В., Коноплева Т.Н. и соавт. Митохондриальная активность популяций лимфоцитов у здоровых детей дошкольного и раннего школьного возраста//Российский педиатрический журнал, 2007; 1: 11–14.
9. Петричук С.В., Шищенко В.М., Духова З.Н. и соавт. Диагностические и прогностические возможности клинической цитохимии. М.: 2005: 74.
10. Akdis C.A. Mechanisms of allergic disease//Curr.Opin. Immunol., 2006; 18:P.718–726.
11. Капустина Е. Ю. Активность митохондриальных ферментов лимфоцитов периферической крови у детей с респираторными и кожными проявлениями аллергии. Автореф. дис...канд. мед наук. М., 2006; 26.
12. Куртасова Л.М., Савченко А.А., Шакина Н.А. Метаболическая активность иммунокомпетентных клеток крови у больных атопическим дерматитом//Медицинская иммунология, 2001; 3(2):165.