

УДК 616.322.-002.2-06.616.155

ВИВЧЕННЯ ВПЛИВУ ГОСТРОТИ ЗАПАЛЕННЯ ПІДНЕБІННИХ МИГДАЛИКІВ НА АКТИВНІСТЬ ІОННИХ АТФ-АЗ ЕРИТРОЦИТІВ КРОВІ ЛЮДИНИ

Н. Є. Нурищенко, С. В. Андрейченко, М. С. Мірошніченко

*Київський національний університет імені Тараса Шевченка, вул. Володимирська, 58, 01033, Київ-33,
e-mail: mnurish@mail.ru*

Надійшла до редакції 24 вересня 2003 р.

В роботі вивчали вплив гостроти запалення піднебінних мигдаликів у хворих на хронічний тонзиліт на активність іонних АТФ-аз мембран еритроцитів. Показано, що в умовах загострення запального процесу загальна ферментативна активність різко знижується, і досягає мінімального рівня при ангінах. Затухання запального процесу супроводжується поступовим відновленням ферментативної активності іонних АТФ-аз, причому на стадії компенсації хронічного тонзиліту спостерігалась їх помітна стимуляція, що мала сприяти нормалізації мембранного потенціалу та поверхневого заряду еритроцитів.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: хронічний тонзиліт, еритроцит, іонний транспорт, АТФ-аза, мембрани

Захворюваність населення України хронічним тонзилітом в останні роки істотно збільшилась в зв'язку із зростанням техногенних навантажень і, відповідно, пригніченням імунної системи організму [1, 2, 3].

Відомо, що тривала тонзилогенна інтоксикація в умовах впливу інфекційного агенту на мигдалики призводить також і до порушень метаболічних процесів в клітинах периферичної крові таких хворих [4,5].

При розвитку в організмі запального процесу в крові з'являються різні активні метаболіти, котрі, взаємодіючи з плазматичними мембранами, обумовлюють зміни в їх проникності до різних класів іонів. В результаті порушується іонна рівновага по обидва боки плазматичної мембрани, виникають коливання осмотичного тиску та з'являються явища набряку в клітинах та тканинах [6, 7].

Важливу роль в регуляції осмотичних процесів в клітинах і, зокрема, еритроцитах крові відіграють векторні ферменти біомембран, такі як Na^+ , K^+ -АТФ-аза, Ca^{2+} -АТФ-аза та Mg^{2+} -АТФ-аза. Ці ферменти працюють подібно до іонних насосів і протидіють коливанням мембранного потенціалу та зростанню внутрішньоклітинної концентрації Na^+ та Ca^{2+} [8, 9].

Метою даного дослідження було вивчення ферментативної активності іонних АТФ-аз еритроцитів крові хворих на хронічний тонзиліт на різних стадіях розвитку запального процесу в піднебінних мигдаликах, в умовах загострення та ремісії цієї хвороби.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Дослідження були проведені на 3-х групах хворих, які перебували на різних стадіях хронічного тонзиліту (ХТ), а саме у фазі компенсації (I), декомпенсації (II) і у гострій фазі захворювання (III) в загальній кількості у 24 особи по 8 чоловік у групі. Крім того, була сформована окрема група умовно здорових людей з добровольців, що проходили планові обстеження ЛОР-органів (контроль).

У хворих на ХТ клінічна картина визначалась за такими показниками: суб'єктивний стан почуття болю, відчуття комка в горлі, по анамнестичним даним про частоту захворювання ангіною, а також за результатами об'єктивного дослідження стану регіонарних лімфатичних вузлів у поєднанні з фарингоскопією.

У пацієнтів брали венозну кров у пробірки з гепарином (50 од/мл). Кров центрифугували 10 хв при 300 g. Верхній шар еритроцитів, що містив також і лейкоцити разом із плазмою відкидали. Потім еритроцити 3 рази промивали охолодженим розчином 0,145 М NaCl в 0,02 М Трис-HCl-буфері (рН 7,6 при 20 °C).

Кожного разу суспензію клітин центрифугували при 300 g протягом 10 хв, верхній шар еритроцитів з лейкоцитами збирали фільтрувальним папером і викидали [8].

Утворений осад еритроцитів руйнували гомогенізацією в середовищі, що містило 0,25 М сахарози, 0,1 мМ ЕДТА, 1,25 мМ імідазолу та 1 мМ меркаптоетанолу. Гомогенат центрифугували при 800 g 20 хв.

Супернатант фільтрували, а потім центрифугували при 26 700 g 10 хв. Згодом супернатант, що утворився, центрифугували при 101000 g. Осад ресуспендували в середовищі А такого складу: 5 мМ гістидину, 0,1 мМ CaCl_2 , 0,2 мМ ЕДТА, 0,25 М сахарози. Плазматичні мембрани виділяли шляхом центрифугування в ступінчатому градієнті густини сахарози протягом 2 год при 90 000 g. Зону

плазматичних мембран розводили дистильованою водою до густини 1,02 і потім знов центрифугували 1 год при 112 000 g. Отриманий осад ресуспендували в середовищі А і використовували у подальших дослідженнях.

Кількісно препарати мембран характеризували по вмісту в них білка, котрий визначали по методу Лоурі [10]. У виділених препаратах мембран вивчали активність іонних АТФ-аз – K^+ , Na^+ -АТФ-ази, Mg -АТФ-ази та Ca^{2+} -АТФ-ази.

Для визначення активності АТФ-аз до 0,1 мл суспензії мембран додавали 0,3 мл інкубаційного середовища В. Склад середовища В для визначення загальної активності АТФ-аз був такий: $NaCl$ - 150 мМ; KCl - 10 мМ; $MgSO_4$ - 3 мМ; Na_2ATP - 5 мМ; тріс- HCl (рН-7,4) - 50 мМ; ЕДТА - 1 мМ; $CaCl_2$ - 3 мМ. Активність Mg^{2+} -АТФ-ази визначали у середовищі С, що замість 3 мМ $CaCl_2$ містило 0,2 мМ уабаїну. Інкубацію проводили протягом 1 год при 37 °С.

Реакцію зупиняли додаванням 0,4 мл 10 % трихлороцтової кислоти (ТХУ). Білок осаджували центрифугуванням при 300 g 20 хв. Активність АТФ-аз визначали по кількості неорганічного фосфору (P_H) в супернатанті, котру вимірювали за методом Лоурі-Лопеца [11]. Для цього до 0,5 мл 5 % ТХУ-надосадочної рідини додавали 3,5 мл 0,12 М ацетатного буфера (рН - 4,5). Після перемішування послідовно з інтервалом в 1 хв додавали 0,4 мл свіжоприготовленого 1 % розчину молібдату амонію в 0,05 М сірчаній кислоті та 0,4 мл свіжоприготовленого 1 % розчину аскорбінової кислоти в 0,005 М розчині сульфату міді. Розчин перемішували і відстоювали при 20°С 20 хв. За цей час відбувалось утворення забарвлення, котре реєстрували на довжині хвилі в 570 нм за допомогою фотоколориметра КФК-2.

Кількість P_H визначали по калібровочній кривій, що була попередньо побудована з використанням стандартних розчинів.

Активність Ca^{2+} -АТФ-ази підраховували із різниці між загальною АТФ-азною активністю у присутності і відсутності у розчині 3 мМ $CaCl_2$. Активність ферменту виражали в мкмоль/год на 1 мг білка мембран.

Статистичну обробку даних проводили загальноприйнятими методами варіаційної статистики при рівні ймовірності в 95 % [12].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ

В результаті проведених досліджень було встановлено, що загальна АТФ-азна активність мембран еритроцитів залежить від стану хворого на хронічний тонзиліт, а також гостроти запального процесу в піднебінних мигдаликах (табл).

Табл.

Визначення загальної АТФ-азної активності мембран еритроцитів хворих на різних стадіях хронічного тонзиліту

Групи пацієнтів	АТФ-азна активність, мкмоль P_H /год на мг білка		
	K^+ , Na^+ -АТФ-аза	Ca^{2+} -АТФ-аза	Mg -АТФ-аза
I (фаза компенсації ХТ)	0,0870±0,0020	0,2010±0,0030	0,1290±0,0080
II (фаза декомпенсації ХТ)	0,020±0,006	0,0090±0,0015	0,0060±0,0003
III (гостра фаза ХТ)	0,00086±0,00005	0,00010±0,00006	0,00004±0,00002
IV (умовно здорові)	0,0290±0,0053	0,0220±0,0042	0,0270±0,0018

Порівняно з контролем найменша активність загальної АТФ-ази спостерігалась при гострому запаленні піднебінних мигдаликів, але поступово починала зростати при послабленні запального процесу. Так, у фазі декомпенсації ХТ АТФ-азна активність ще залишалась в 2 рази меншою, ніж у контролі, однак у період ремісії ХТ вже відмічалось значне збільшення загальної АТФ-азної активності, причому в цьому випадку вона більш, ніж в 5 разів перевищувала контрольний рівень (рис. 1).

В той же час при проведенні диференціального аналізу активності іонних АТФ-аз було встановлено (рис. 2), що найбільшого рівня активності досягає Ca^{2+} -АТФ-аза в умовах компенсаторної фази ХТ, коли вона майже в 9 разів перевищувала контрольне значення. Активність K^+ , Na^+ -АТФ-ази в мембранах еритроцитів таких хворих була трохи нижчою, але все одно в 3 рази вищою, ніж у контролі. На стадії декомпенсації активність як K^+ , Na^+ -АТФ-ази, Ca^{2+} -АТФ-ази і Mg^{2+} -АТФ-ази різко спадала, хоча більш виражено це відбувалось у випадку з Ca^{2+} -АТФ-азою. В гострій фазі запалення ферментативна активність цих іонних АТФ-аз знизилась до мінімального значення на рівні 1% від загальної АТФ-азної активності в контролі.

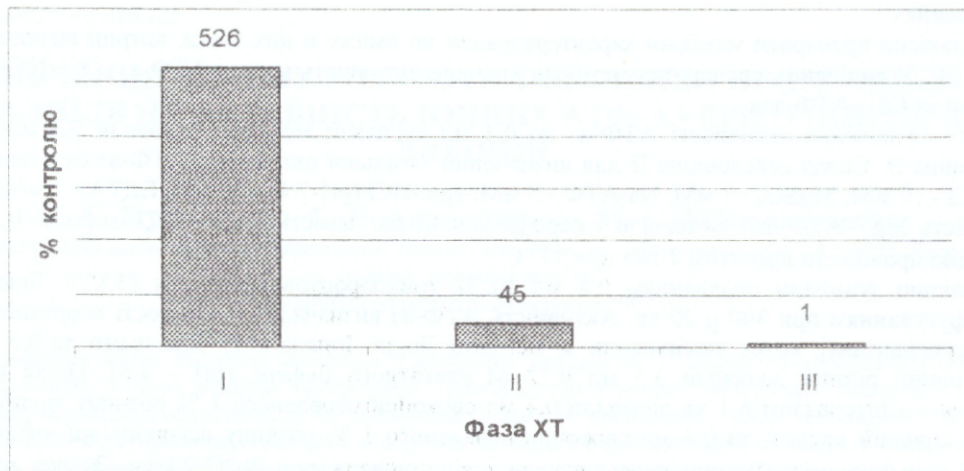


Рис. 1. Залежність загальної АТФ-азної активності мембран еритроцитів у хворих на хронічний тонзиліт від гостроти запального процесу: I – фаза компенсації ХТ; II – фаза декомпенсації ХТ; III – гостра фаза ХТ.



Рис. 2. Залежність активності K^+Na^+ -АТФ-ази, Ca^{2+} -АТФ-ази та Mg^{2+} -АТФ-ази мембран еритроцитів від стану піднебінних мигдаликів у хворих на хронічний тонзиліт та у здорових людей: ▲ – Ca^{2+} -АТФ-аза; ■ – Mg^{2+} -АТФ-аза; ● – K^+Na^+ -АТФ-аза; I – фаза компенсації; II – фаза декомпенсації; III – гостра фаза; IV – контроль.

Проведені експерименти показали, що в умовах розвитку запального процесу в піднебінних мигдаликах відбувається поступове пригнічення АТФ-азної активності мембран еритроцитів і її спадання майже до нуля під час ангіни.

Отримані дані слід пояснювати як конформаційними змінами ферментів при гострому запаленні, так і значним екрануванням центрів зв'язування іонів калію, натрію, кальцію та АТФ імунними комплексами, що мали приєднатись до еритроцитів завдяки існуванню на їх поверхні специфічних рецепторів до антитіл [7, 13].

Утворення конформаційних змін у АТФ-аз при прогресуванні запалення може бути також обумовлено появою в крові хворих активних метаболітів-цитокінів, інтерферонів, простагландинів тощо, котрі, взаємодіючи з мембранами, здатні порушувати в певній мірі їх структурованість та проникність [7, 9, 14, 15].

Значний спалах АТФ-азної активності на фазі компенсації ХТ, безумовно, сприяє перебігу репаративних процесів в пошкоджених еритроцитах, оскільки стимуляція іонних АТФ-аз протидіє градієнтним потокам іонів, сприяє нормалізації мембранного потенціалу і поверхневого заряду, що, в свою чергу, має зумовлювати припинення злипання еритроцитів та їх стаз в капілярах [15].

ВИСНОВКИ

1. На відкритих мембранах еритроцитів хворих на хронічний тонзиліт було показано існування залежності активності іонних АТФ-аз від гостроти запального процесу в піднебінних мигдаликах.
2. Встановлено односторонність змін в активності окремих компонентів загальної АТФ-ази, що контролюють трансмембранну міграцію іонів калію, натрію, кальцію та магнію в умовах розвитку запального процесу в еритроцитах. Це вказує на їх просторову взаємодію та взаємозалежність.
3. Показано, що гостра фаза запалення супроводжується значним пригніченням загальної іон-транспортної-АТФ-азної активності та її окремих компонентів, котрі при затуханні запалення поступово відновлюються, причому на стадії компенсації ХТ можуть помітно перевищувати контрольні рівні.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Заболотный Д.И., Мельников О.Ф. Теоретические аспекты генеза и терапии хронического тонзилита. – К.: Здоров'я, 1999. – 122 с.
2. Мельников О.Ф. Современные тенденции в изучении генеза хронического тонзилита и в разработке методов лечения // Сучасні проблеми отоларингології. – Київ, 1993. – С.252–255.
3. Кливленко-иммунологическое обоснование эффективности иммунотерапии больных хроническим тонзиллитом и фарингитом, постоянно проживающих в зоне повышенной радиации / Заболотный Д.И., Мельников О.Ф., Волончук М.И. и др. // Сучасні проблеми отоларингології. – Київ, 1993. – С. 338–342.
4. Мельников О.Ф. Современные представления о роли лимфоглоточного кольца в реакциях иммунитета в норме и патологии // Иммунология и аллергология. – 1998. – №1. – С. 64–68.
5. Веремеенко К.Н. Ферменты в отоларингологии. – К.: Здоров'я, 1988. – 184 с.
6. Солдатов И.Б. Хронический тонзиллит и другие очаги инфекции верхних дыхательных путей // VII съезд отоларингологов СССР (Тбилиси, 21-23 окт., 1975 г.): Тезисы докладов. – М.: Медицина, 1975. – С. 60–66.
7. Sigal L.H., Ron Y. Immunology and Inflammation: Basic mechanisms and clinical consequences. – N.Y.: McGraw-Hill, Inc., 1994. – 805 p.
8. Казенков А.М., Маслов М.Н., Шалабодов А.Д. Исследование активности Na, K – АТФ-азы в эритроцитах млекопитающих // Биохимия. – 1984. – Т.49. – №7. – С.1089–1094.
9. Кравцов А.В., Алексеенко И.Р. Механизмы регуляции векторных ферментов биомембран – К.: Наук. думка, 1990. – 176 с.
10. Lowry O.H., Rosenbrough N.S., Farr A.L., Randall R.B. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – V.193. – P. 266–275.
11. Болдырев А.А. Транспортные аденозинтрифосфатазы. Современные методы исследования. – М.: Наука, 1977. – С.179–180.
12. Рокицкий П.Ф. Биологическая статистика. – Минск: Выща школа, 1973. – 320 с.
13. Карась А.Ф., Андрейченко С.В., Нурищенко Н.Е. та ін. Нормалізуючий вплив стохастичного ультразвуку на хеміломінесценцію плазми крові та АТФазну активність еритроцитів крові хворих на хронічний тонзиліт // Фізика живого. – 1995. – Т.3. – №1. – С.81–85.
14. Болдырев А.А. Биологические мембраны и транспорт ионов. – М.: Изд-во МГУ, 1985. – 208 с.
15. Большая медицинская энциклопедия // Под ред. акад. Б.В. Петровского. – Изд. 3-е. – М.: Советская энциклопедия, 1976. – Т.4. – С.413–424.