

В.Н.Минеев, И.Ю.Супранович

Особенности связи котранспорта Na^+ , K^+ и 2Cl^- с β -адренергической системой в эритроцитах при бронхиальной астме

Кафедра госпитальной терапии имени академика М.В.Чернуцкого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П.Павлова: 197022, Санкт-Петербург, ул. Л.Толстого, 6/8

V.N.Mineev, I.Yu.Supranovich

Features of coupled Na^+ , K^+ , 2Cl^- -cotransport with erythrocyte β -adrenergic system in bronchial asthma

Summary

The aim of the study was to reveal particularities of coupled Na^+ , K^+ , 2Cl^- -cotransport with erythrocyte β -adrenergic system in bronchial asthma patients. Healthy controls ($n = 10$) and patients with bronchial asthma ($n = 36$) were examined. Effect of isoproterenol (10^{-6} M) on Na^+ , K^+ , 2Cl^- -cotransport was estimated. Balance of K^+ , Na^+ and Cl^- in erythrocyte lysates was studied by the flame emission and radiotracer techniques (spectrophotometer Perkin-Elmer AA 306). In healthy controls, isoproterenol increased activity of Na^+ , K^+ , 2Cl^- -cotransport up to 75 % according to Rb^+ influx constant and up to 113 % according to Na^+ efflux constant. In allergic asthma patients, isoproterenol decreased activity of Na^+ , K^+ , 2Cl^- -cotransport according to Na^+ efflux constant and Rb^+ influx constant. In nonallergic asthma patients, isoproterenol decreased activity of Na^+ , K^+ , 2Cl^- -cotransport according to Na^+ efflux constant and Rb^+ influx constant. Therefore, the influence of β_2 -adrenergic agonist isoproterenol on Na^+ , K^+ , 2Cl^- -cotransport in erythrocytes of healthy controls and asthma patients has been estimated. This fact indicates coupling of cotransport with cellular β_2 -adrenergic system while in allergic asthma patients "paradoxical" influence of isoproterenol was observed which was a decrease in Na^+ , K^+ , 2Cl^- -cotransport activity.

Key words: asthma, Na^+ , K^+ , 2Cl^- -cotransport; β -adrenergic system, erythrocytes.

Резюме

Целью исследования было выявление особенностей сопряжения Na^+ , K^+ , 2Cl^- -котранспорта с β_2 -адренергической системой при бронхиальной астме (БА). Были обследованы 10 практически здоровых лиц и 36 больных БА (21 пациент с аллергической БА и 15 – с неаллергической БА). Оценивалось влияние изопроterenола (10^{-6} М) на Na^+ , K^+ , 2Cl^- -котранспорт. Содержание в лизатах эритроцитов Na^+ , K^+ и Rb^+ определялось пламенно-эмиссионным анализом на атомно-абсорбционном спектрофотометре Perkin-Elmer AA 306 при эмиссионном режиме в воздушно-пропановом пламени. Изопроterenол у здоровых лиц увеличивает активность Na^+ , K^+ , 2Cl^- -котранспорта по константам входа Rb^+ на 75 % и выхода Na^+ на 113 %. У больных аллергической БА наблюдалось снижение активности Na^+ , K^+ , 2Cl^- -котранспорта по константам выхода Na^+ , K^+ и входа Rb^+ . У больных неаллергической БА наблюдалось увеличение Na^+ , K^+ , 2Cl^- -котранспорта по константам выхода Na^+ и входа Rb^+ . Было выявлено влияние β_2 -адреноагониста изопроterenола на параметры Na^+ , K^+ , 2Cl^- -котранспорта в эритроцитах здоровых лиц и пациентов с БА, что указывает на сопряжение ко-транспортной функции с β_2 -адренергической системой клетки, при этом у больных аллергической БА наблюдается "парадоксальное" влияние изопроterenола – снижение активности Na^+ , K^+ , 2Cl^- -котранспорта.

Ключевые слова: астма, Na^+ , K^+ , 2Cl^- -котранспорт, β_2 -адренергическая система, эритроциты.

Изучению активности транспортных систем Na^+ и K^+ у больных с бронхолегочной патологией и, в частности, с бронхиальной астмой (БА) был посвящен ряд исследований как в нашей стране [1, 2], так и за рубежом [3, 4]. На рубеже XIX–XX вв. было выполнено несколько работ фундаментального и прикладного плана. Показано, что одновалентные катионы Na^+ и K^+ принимают участие в регуляции бронхиальной проходимости и функций различных клеток, ответственных за развитие воспалительных изменений бронхов и легких.

Интерес к изучению котранспорта Na^+ , K^+ , 2Cl^- у больных БА обусловлен не только данными о функциональном значении этого механизма в сокращении гладкомышечных клеток бронхов, но и в трансэпителиальном переносе Cl^- , который контролирует уровень секреции слизи. Этим важным вопросам посвящен, в частности, интересный обзор С.Н.Орлова

и соавт. [2], авторы которого констатируют отсутствие существенного вклада отечественных лабораторий в разработку этих вопросов. Стоит подчеркнуть, что работы С.Н.Орлова и соавт. по исследованию транспорта одновалентных катионов и Са у больных БА на эритроцитарной модели заложили основы для изучения патогенетической роли клеточного ионного транспорта в пульмонологии [1].

Интерес пульмонологов к проблеме ионного мембранного транспорта при БА связан с поиском новых лечебных подходов. Так, ранее было показано бронхолитическое и протективное действие ингаляций фуросемида при этом заболевании, что связывалось с влиянием данного препарата на активность котранспорта Na^+ , K^+ , 2Cl^- [5].

В обзоре, посвященном ингаляционному применению диуретиков, подчеркивается, в частности, противоречивость данных литературы о влиянии

адреномиметиков на котранспорт Na^+ , K^+ , 2Cl^- : одни авторы считают, что стимуляция транспорта обеспечивается активацией α -адренорецепторов, другие — активацией β -адренорецепторов [6].

С целью выяснения особенностей сопряжения котранспорта Na^+ , K^+ , 2Cl^- с β_2 -адренергической системой (одной из ключевых сигнальных систем при БА) было проведено определение чувствительности котранспорта Na^+ , K^+ , 2Cl^- к β_2 -агонисту изопротеренолу.

Материалы и методы

Были обследованы 10 практически здоровых лиц и 36 больных БА, из них 21 пациент с аллергической БА (АБА) и 15 — с неаллергической (НБА). Все пациенты проходили лечение и наблюдались в клинике госпитальной терапии им. акад. М.В.Черноруцкого СПбГМУ им. акад. И.П.Павлова.

В качестве адекватной и патогенетически обоснованной модели были использованы эритроциты. Оценивали влияние изопротеренола (*Sigma*, США, 10^{-6} М) на входные потоки Rb^+ и выходные потоки Na^+ и K^+ в эритроцитах. Содержание в лизатах эритроцитов Na^+ , K^+ и Rb^+ определяли пламенно-эмиссионным анализом на атомно-абсорбционном спектрофотометре *Perkin Elmer AA 306* (*Perkin Elmer*, США) при эмиссионном режиме в воздушно-пропановом пламени [7]. Исследования катион-транспортной функции эритроцитов проводили в лаборатории физиологии клетки Института цитологии РАН (Санкт-Петербург). Была рассчитана доля активного (ингибируемого уабаином) транспорта ионов, доля котранспорта Na^+ , K^+ , 2Cl^- посредством оценки входа рубидия, подавляемого фуросемидом, и активность нечувствительных к уабаину и фуросемиду механизмов переноса одновалентных катионов (подробно методика описана В.Н.Минеевым и соавт. в 2007 г. [5]).

Анализ статистических данных проводили с помощью программного пакета *Statistica*.

Результаты и обсуждение

Результаты исследования котранспорта Na^+ , K^+ , 2Cl^- приведены в таблице. Как видно, изопротеренол у здоровых лиц увеличивает общий транспорт Na^+ и K^+ , характеризующийся константами входа Rb^+ на 7 %, выхода Na^+ — на 12 % и K^+ — на 12 %. Кроме того, он увеличивает активность котранспорта Na^+ , K^+ , 2Cl^- по константам входа Rb^+ на 75 % и выхода Na^+ — на 113 %.

У больных АБА и НБА результаты воздействия изопротеренола были противоположными. У пациентов с АБА наблюдали уменьшение общего транспорта Na^+ и K^+ по константе выхода Na^+ , снижение активности воздействия котранспорта Na^+ , K^+ , 2Cl^- — по константам выхода Na^+ , K^+ и входа Rb^+ , увеличение остаточного транспорта — по константе выхода K^+ .

У больных НБА наблюдали следующие изменения транспортных систем: увеличение общего транспорта Na^+ и K^+ — по константе выхода Na^+ , снижение активного транспорта — по константе выхода K^+ , увеличение котранспорта Na^+ , K^+ , 2Cl^- — по константам выхода Na^+ и входа Rb^+ .

Таким образом, выявлено влияние β_2 -агониста изопротеренола на параметры котранспорта Na^+ , K^+ , 2Cl^- в эритроцитах здоровых лиц и больных БА, что указывает на сопряжение котранспортной функции с β_2 -адренергической системой клетки. При этом у больных АБА наблюдается "парадоксальное" влияние изопротеренола — снижение активности котранспорта Na^+ , K^+ , 2Cl^- .

Противоречивость данных предыдущих исследований о влиянии адреномиметиков на котранспорт Na^+ , K^+ , 2Cl^- может быть связана с методиками. Причины, которые могут влиять на изменение активности копереносчика Na^+ , K^+ , 2Cl^- подробно обсуждались [8].

Полученные ранее [5] данные о повышении активности котранспорта Na^+ , K^+ , 2Cl^- при АБА согласуются с генетическими исследованиями [9], в кото-

Таблица
Константы выхода K^+ , Na^+ и входа Rb^+ ($\text{мин}^{-1} \times 10^{-4}$) в условиях воздействия изопротеренола в обследованных группах

		Здоровые (n = 10)		АБА (n = 21)		НБА (n = 15)	
		без нагрузки	с изопротеренолом	без нагрузки	с изопротеренолом	без нагрузки	с изопротеренолом
ОБТ	KK	4,76 ± 0,93	5,32 ± 0,14*	4,90 ± 0,86	4,92 ± 0,91	4,56 ± 0,79	5,23 ± 1,08
	KNa	27,7 ± 7,6	31,0 ± 3,2*	33,1 ± 9,2	25,0 ± 2,4*	28,7 ± 8,8	30,1 ± 2,2*
	KRb	1,71 ± 0,88	1,83 ± 0,09*	0,95 ± 0,33	0,92 ± 0,27	1,76 ± 0,69	1,80 ± 0,99
АТ	KK	0,43 ± 0,19	0,29 ± 0,08	0,53 ± 0,19	0,65 ± 0,21	0,42 ± 0,11	0,27 ± 0,05*
	KNa	11,0 ± 3,1	12,5 ± 2,6	16,2 ± 4,4	17,4 ± 4,7	9,1 ± 1,9	10,2 ± 2,3
	KRb	1,01 ± 0,21	1,08 ± 0,32	0,45 ± 0,15	0,45 ± 0,12	1,08 ± 0,29	1,09 ± 0,31
КТ	KK	1,47 ± 0,44	1,48 ± 0,39	1,18 ± 0,49	0,99 ± 0,02*	1,49 ± 0,28	1,48 ± 0,38
	KNa	7,2 ± 1,8	15,3 ± 1,1*	11,1 ± 2,8	9,8 ± 0,7*	7,4 ± 2,1	12,3 ± 0,9*
	KRb	0,47 ± 0,13	0,82 ± 0,08*	0,32 ± 0,11	0,24 ± 0,02*	0,46 ± 0,11	0,80 ± 0,06*
ОТ	KK	3,07 ± 1,09	3,51 ± 1,34	3,07 ± 1,17	3,98 ± 0,09*	3,27 ± 1,79	3,32 ± 1,99
	KNa	8,1 ± 3,1	8,2 ± 3,8	14,4 ± 2,6	12,0 ± 2,9	7,1 ± 3,3	8,1 ± 3,7
	KRb	0,34 ± 0,09	0,31 ± 0,08	0,19 ± 0,06	0,21 ± 0,06	0,34 ± 0,10	0,30 ± 0,09

Примечание: ОБТ — общий транспорт, АТ — активный транспорт, КТ — котранспорт, ОТ — остаточный транспорт, KK, KNa — константы выхода K^+ , Na^+ , KRb — константа входа Rb^+ ; * — $p < 0,05$.

рых выявлена повышенная экспрессия гена — ко-транспортера Na^+ , K^+ , 2Cl^- (NKCC) в гомогенатах бронхов у больных БА. Любопытно, что обнаружение этих фактов было неожиданностью для авторов, которые проанализировали экспрессию 75 генов белков, связанных, по их мнению, с патогенезом БА. Ранее было показано наличие при БА корреляционных связей между активностью ко-транспорта Na^+ , K^+ , 2Cl^- и показателями тяжести течения заболевания (основными параметрами функции внешнего дыхания), а также с различными маркерами аллергического воспаления (уровнем эозинофилии периферической крови, уровнем эозинофилии и содержанием эпителиальных клеток в цитологическом анализе мокроты, выраженностью аллергического воспаления в мокроте) [8].

Отметим также, что доказано присутствие и функциональное значение NKCC в клетках гладкой мускулатуры бронхов. Обосновано, что механизм релаксации гладкой мышцы бронхов при воздействии петлевых диуретиков (фуросемида) включает в себя ингибирование ими данного белка [10].

Кроме того, для клиницистов представляет интерес возможность существования еще одного механизма бронхолитического эффекта изопроterenолола как β_2 -агониста — механизма сопряжения активации β_2 -адренергической системой клетки с ко-транспортной системой Na^+ , K^+ , 2Cl^- . При этом результирующий эффект при АБА — снижение активности ко-транспорта Na^+ , K^+ , 2Cl^- — аналогичен вышеупомянутому воздействию фуросемида.

Несомненно, что выявленное сопряжение ионной транспортной и β_2 -адренергической сигнальной систем может быть связано с целым рядом других важных эффекторных реакций, учитывая, что ко-транспорт Na^+ , K^+ , 2Cl^- вовлечен в регуляцию разнообразных клеточных функций (через влияние на клеточный объем), включая пролиферацию, рост, программируемую гибель и некроз [11–14].

Заключение

Хотелось бы надеяться, что отечественные пульмонологи, астмологи, мембранологи проявят интерес к сигнальным системам, участвующим в мембранном транспорте самых разнообразных ионов при БА, а также при такой частой и социально значимой патологии, как хроническая обструктивная болезнь легких. Выявленные нарушения со временем могут на практике применяться как мишень для лечебного воздействия. Во всяком случае, ко-транспортер Na^+ , K^+ , 2Cl^- , присутствующий во многих тканях, в 2006 г. был упомянут в журнале *Pharmacological Reviews* среди 1 535 мишеней для разработки новых лекарственных препаратов [15].

Литература

- Орлов С.Н., Баранова И.А., Покудин Н.И. и др. Транспорт одновалентных катионов и кальция в эритроцитах у больных бронхиальной астмой. Вестн. АМН СССР 1991; 3: 43–49.
- Орлов С.Н., Баранова И.А., Чучалин А.Г. Внутриклеточные системы сигнализации и патология легких. Транспорт ионов в клетках эпителия дыхательных путей. Пульмонология 1999; 1: 77–83.
- Barg W., Malolepszy J. Aktywnosc adenylozyntrofosfatazy sodowo-potasowej i wspoltransportu jonow sodu, potasu i chloru u chorych na astme oskrzelowa i przewlekla obturacyjna choroba pluc. Pneumonol. Alergol. Pol. 1994; 62 (7–8): 381–385.
- Agrawal A., Agrawal K.P., Ram A. et al. Basis of rise in intracellular sodium in airway hyperresponsiveness and asthma. Lung 2005; 183 (6): 375–387.
- Минеев В.Н., Веренинов А.А., Синицина Т.М. и др. Транспорт одновалентных катионов через мембрану эритроцитов и бронхолитическое и протективное действие ингаляции фуросемида при бронхиальной астме. Пульмонология 2007; 1: 82–87.
- Брюханов В.М., Зверев Я.Ф. Ингаляционное применение диуретиков — новое лечение бронхообструктивного синдрома. Клин. фармакол. и тер. 2002; 11 (5): 57–64.
- Веренинов А.А., Виноградов Т.А., Ивахинова И.С. и др. Применение пламенно-эмиссионного анализа для измерения потоков щелочных катионов через клеточную мембрану. Цитология 1982; 24 (1): 98–103.
- Супранович И. Ю. Изменения транспорта одновалентных катионов в эритроцитах больных бронхиальной астмой. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. СПб.; 2009.
- Dolganov G. M., Woodruff P. G., Novikov A. A. et al. A novel method of gene transcript profiling in airway biopsy homogenates reveals increased expression of a Na-K-Cl cotransporter (NKCC1) in asthmatic subjects. Genome Res. 2001; 11: 1473–1483.
- Iwamoto L.M., Nakamura K.T., Wada R.K. Immunolocalization of a Na-K-2Cl cotransporter in human tracheobronchial smooth muscle. J. Appl. Physiol. 2003; 94: 1596–1601.
- Веренинов А.А., Юринская В.Е., Рубашкин А.А. Апоптозная дегидратация лимфоидных клеток: моделирование изменения баланса ионных потоков. Докл. РАН 2006; 411 (6): 824–828.
- Веренинов А.А., Горыачая Т.С., Мешков А.В. et al. Analysis of the monovalent ion fluxes in U937 cells under the balanced ion distribution: recognition of ion transporters responsible for changes in cell ion and water balance during apoptosis. J. Cell. Biol. 2007; 31 (14): 382–393.
- Юринская В.Е., Горыачая Т.С., Рубашкин А.А. и др. Перераспределение K^+ , Na^+ и Cl^- при апоптозе клеток U937, вызванном стауропоксином, к механизму апоптозной дегидратации клеток. Цитология 2010; 52 (7): 562–567.
- Arrebola F., Fernandez-Segura E., Campos A. et al. Changes in intracellular electrolyte concentration during apoptosis induced by UV irradiation of human myeloblastic cells. Amer. J. Physiol. Cell. Physiol. 2006; 290: 638–649.
- Zheng C. J., Han L. Y., Yap C. W. et al. Therapeutic targets: progress of their exploration and investigation of their characteristics. Pharmacol. Rev. 2006; 58: 259–279.

Информация об авторах

Минеев Валерий Николаевич — д. м. н., проф. кафедры госпитальной терапии им. акад. М.В.Черноруцкого СПбГМУ им. акад. И.П.Павлова; тел.: 8-921-359-62-95; e-mail: vnmineev@mail.ru
 Супранович Ирина Юрьевна — зав. отделением врачей общей практики поликлиники № 31 СПбГМУ им. акад. И.П.Павлова, заочный аспирант кафедры госпитальной терапии им. акад. М.В.Черноруцкого СПбГМУ им. акад. И.П.Павлова; тел.: 8-960-266-10-42; e-mail: super1965@rambler.ru

Поступила 14.12.10

© Минеев В.Н., Супранович И.Ю., 2011

УДК 616.248-07:616.155.1-008.9-074