

УДК 591.111.1:577.17:577.121

© Коллектив авторов

## **ВЛИЯНИЕ ТИРОКСИНА НА АКТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ ФЕРМЕНТОВ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА В МИЕЛОИДНЫХ КЛЕТКАХ КОСТНОГО МОЗГА И НЕЙТРОФИЛАХ КРОВИ ПОРОСЯТ**

Н.О.БАБИЧ<sup>1</sup>, Г.Л.АНТОНЯК<sup>2</sup>, М.Ф. ТЫМОЧКО

<sup>1</sup> Львовский государственный медицинский университет, Украина, 290010  
г.Львов, ул. Пекарская 69.

<sup>2</sup> Институт земледелия и биологии животных УААН, Украина, 290034  
г.Львов, ул В.Стуса 38.

Исследовали влияние тироксина на активность ферментов энергетического обмена (гексокиназы, 6-фосфофруктокиназы, пируваткиназы, лактатдегидрогеназы, изоцитратдегидрогеназы, цитохром с-оксидазы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы) в миелоидных клетках костного мозга и нейтрофильных гранулоцитах крови свиней в неонатальном периоде онтогенеза. После длительного введения гормона (в дозе 4 мг / кг массы животных через каждые 12 ч в течение 9 дней) в миелокариоцитах наблюдалась активация аэробного этапа энергетического метаболизма. В тех же условиях в нейтрофилах крови поросят отмечено более выраженное повышение активности ферментов гликолиза, хотя стимуляция процессов аэробного метаболизма тоже имела место. Вместе с тем, тироксин не оказывал влияния на скорость реакций пентозофосфатного пути в лейкоцитах крови и ингибировал их интенсивность в миелоидных клетках костного мозга животных.

**Ключевые слова:** тироксин, метаболизм, энергетический обмен, лекциты, миелокариоциты, нейтрофильные гранулоциты.

**ВВЕДЕНИЕ.** В обеспечении иммунологического гомеостаза человека и животных важная роль принадлежит циркулирующим гранулоцитам, функциональная активность которых представляет собой одно из основных звеньев, связывающих неспецифические защитные реакции и иммунный ответ организма на влияние патогена [1]. Полноценная активность системы иммунной защиты обусловлена, с одной стороны, способностью зрелых нейтрофилов к реализации свойственных им функций, а с другой - зависит от интенсивности образования и созревания этих клеток в органах гемопоэза, что обеспечивает пополнение пула гранулоцитов в циркуляторном русле [2,3]. Значительная роль в этом плане принадлежит реакциям энергетического обмена в лейкоцитах и их

гемопозитических предшественниках, интенсивность которых детерминирована наличием необходимых субстратов и адекватным уровнем активности ферментных систем - катализаторов этих реакций [4].

Тироксин, как известно, является мощным стимулятором метаболизма и регулятором процессов роста и дифференциации клеток многих тканей и клеточных линий [5,6]. Однако, несмотря на ряд экспериментальных работ, биохимические механизмы влияния этого йодтиронина на интенсивность миелопоэза, а также его роль в реализации функциональной активности зрелых нейтрофилов выяснены недостаточно. В связи с этим и были проведены исследования участия гормона в регуляции активности ферментов, катализирующих анаэробные и кислородзависимые реакции энергетического метаболизма в миелоидных клетках костного мозга и нейтрофильных гранулоцитах крови поросят.

**МЕТОДИКА.** Исследования проводены на 2-х группах поросят 3-10-дневного возраста, (по 15 в каждой). Тироксин вводили животным подопытной группы внутривентриально в дозе 4 мг/кг, начиная с 2-го дня после рождения каждые 12 часов до 10-дневного возраста; животным контрольной группы вместо раствора гормона вводили соответственный объем 0,85% NaCl.

Материалом для исследования были гемопозитическая ткань костного мозга и кровь 3-, 5- и 10-дневных поросят. Кровь получали из передней поллой вены животных, а гемопозитическую ткань костного мозга выделяли из бедренных костей после декапитации и обескровливания животных.

Популяции лейкоцитов и миелоидные клетки костного мозга получали путем дифференциального центрифугирования крови и суспензий гемопозитических клеток в градиентах плотности фикола-верографина [7,8]. Активность гексокиназы (КФ 2.7.1.1), 6-фосфофруктокиназы (КФ 2.7.1.11), пируваткиназы (КФ 2.7.1.40), лактатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.27), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.49), НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназы (КФ 1.1.1.42) определяли при помощи спектрофотометрических методов, в основе которых лежит использование сопряженных систем окисления или восстановления никотинамидных коферментов [9]. Конечные концентрации компонентов реакционных смесей были следующими: 1) для определения активности гексокиназы -  $5 \cdot 10^{-4}$  М глюкозы,  $1 \cdot 10^{-3}$  М АТФ («Reanal», Венгрия),  $5 \cdot 10^{-4}$  М  $MgCl_2$ ,  $5 \cdot 10^{-4}$  М НАДФ<sup>+</sup> («Reanal»), 0,3 МЕ глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы («Fluka»); 2) для определения активности 6-фосфофруктокиназы -  $7 \cdot 10^{-4}$  М фруктозо-6-фосфата («Reanal»),  $1 \cdot 10^{-3}$  М АТФ,  $1 \cdot 10^{-3}$  М  $MgCl_2$ ,  $5 \cdot 10^{-5}$  М НАДН («Reanal»),  $7 \cdot 10^{-3}$  М цистеина, 0,3 МЕ фруктозобисфосфатаальдозазы («Sigma» США), 0,3 МЕ триозофосфатизомеразы («Sigma»), 0,3 МЕ глицерол-3-фосфатдегидрогеназы (НАД<sup>+</sup>) («Reanal»); 3) для определения активности пируваткиназы -  $1 \cdot 10^{-3}$  М фосфоенолпирувата («Reanal»),  $1 \cdot 10^{-2}$  М KCl,  $5 \cdot 10^{-3}$  М  $MgCl_2$ ,  $1 \cdot 10^{-3}$  М АДФ («Reanal»),  $5 \cdot 10^{-5}$  М НАДН («Reanal»), 0,3 МЕ лактатдегидрогеназы («Ferk»); 4) для определения активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы -  $1 \cdot 10^{-3}$  М глюкозо-6-фосфата («Reanal»),  $5 \cdot 10^{-4}$  М НАДФ<sup>+</sup>,  $5 \cdot 10^{-3}$  М  $MgSO_4$ ; 5) для определения активности лактатдегидрогеназы -  $1 \cdot 10^{-3}$  М пирувата натрия,  $5 \cdot 10^{-5}$  М НАДН,  $3 \cdot 10^{-3}$  М  $MgCl_2$ ; 6) для определения активности НАДФ-изоцитратдегидрогеназы -  $5 \cdot 10^{-4}$  М НАДФ<sup>+</sup>,  $1 \cdot 10^{-3}$  М  $MgSO_4$ ,  $1,5 \cdot 10^{-3}$  М DL-изоцитрата («Sigma»). Изменения активности цитохром с-оксидазы изучали при помощи спектрофотометрического метода, определяя скорость окисления ферментом восстановленного цитохрома с [10] в расчете на 1 мг белка.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Результаты исследований каталитической активности регуляторных ферментов гликолиза, дегидрогеназ пентозофосфатного пути и цикла трикарбоновых кислот а также митохондриальной цитохром с-оксидазы свидетельствуют о том, что под влиянием тироксина меняются соотношения между интенсивностью отдельных этапов энергетического метаболизма в миелоидных клетках костного мозга и нейтрофилах крови животных. Так, уже через 48 часов после начала инъекций гормона в клетках исследуемых популяций наблюдается интенсификация превращения глюкозы внутриклеточными ферментными системами (табл. 1, 2).

Следует отметить, что активность ферментов гликолитического пути в миелокариocyтах поросят опытной группы характеризуется своеобразной динамикой. Так, скорость гексокиназной реакции на третьи сутки после рождения достоверно не изменяется, а у 5-дневных поросят - снижается по сравнению со значениями, характерными для интактных животных. В то же время, у 3-дневных поросят опытной группы наблюдается повышение активности 6-фосфофруктокиназы. Это может быть связано с одновременной интенсификацией процессов гликогенолиза и повышением каталитической активности фосфоглюкомутазы в исследуемых клетках под влиянием тироксина [5]. Таким образом, пул глюкозо-6-фосфата - одного из предшественников субстрата 6-фосфофруктокиназной реакции, - может возрастать без участия гексокиназы. Изучение влияния гормона на активность 6-фосфофруктокиназы в динамике показывает, что на 5-й день эксперимента скорость реакции снижается до значений, характерных для интактных животных и остается на том же уровне до 10-го дня жизни. Не наблюдается достоверных изменений и в активности следующего ключевого фермента гликолиза - пируваткиназы (табл.1). Полученные результаты свидетельствуют об относительно низкой чувствительности гликолитической системы миелоидных предшественников к регуляторному действию тироксина.

В то же время в зрелых гранулоцитах крови под влиянием гормона резко возрастает интенсивность катаболизма глюкозы в реакциях анаэробного пути. Об этом свидетельствует и достоверное увеличение активности ключевых ферментов гликолиза в нейтрофилах поросят в течение всего периода исследования (табл. 2). Так, в клетках 3-дневных животных активность гексокиназы повышается почти в 2 раза, оставаясь на высоком уровне и в последующие периоды эксперимента. Подобными изменениями характеризуется активность 6-фосфофруктокиназы и пируваткиназы. Очевидно, высокая чувствительность гликолитических ферментов нейтрофилов к действию тироксина, а также других биорегуляторов связана с тем, что гликолиз является основным источником энергии для этих клеток, в значительной степени обеспечивая их способность к хемотаксису, фагоцитозу и дегрануляции в местах воспаления [1].

В процессе исследований влияния тироксина на функциональные свойства лактатдегидрогеназы установлено повышение активности этого фермента как в миелокариocyтах костного мозга, так и в нейтрофильных гранулоцитах крови (табл. 1, 2).

Повышение активности изоцитратдегидрогеназы, более выраженное в миелокариocyтах животных по сравнению с циркулирующими нейтрофилами может свидетельствовать об интенсификации катаболизма субстратов в цикле

трикарбоновых кислот после инъекций гормона (табл.1, 2). Активность изоцитратдегидрогеназы в миелоидных клетках поросят опытной группы значительно возрастает в течение всего периода исследований, в то время, как в нейтрофилах крови активность этого фермента увеличивается только в начале эксперимента (3-дневные животные).

Таблица 1. Влияние тироксина на активность ферментов энергетического обмена в миелокариоцитах костного мозга поросят.

Возраст	3-дневные животные		5-дневные животные		10- дневные животные	
Фермент	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт
Гексокиназа	20.50±1.16	23.44 ±1.48	19.78 ±1.05	12.49±1.40	16.50±1.20	11.39 ±0.42
6-Фосфо-фруктокиназа	93,2 ±12,3	376,2 ±22,3*	128,4 ±17,2	151,5±12,0	154,4±21,7	180,8 ±14,7
Пируваткиназа	65,4±5,0	62,6 ±5,8	48,2 ±4,6	67,20±7,32	39,8 ±2,4	45,37±5,74
Лактат-дегидрогеназа	157,0 ±8,0	184,5 ±7,8*	82,8 ±2,8	125,3±5,9*	78,5 ±6,8	76,3 ±7,1
Изоцитрат дегидрогеназа	4,60±0,18	3,87 ±0,11	4,46 ±0,27	5,67 ±0,42	4,78 ±0,21	8,56±0,79*
Цитохром с-оксидаза	2,94±0,15	12,56±0,75*	3,21 ±0,25	7,39±0,87*	3,58±0,32	8,03±0,79*
Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа	46,6±4,2	28,4 ±2,5*	45,3 ±6,0	23,0 ±1,5*	64,9 ±4,6	31,5±3,1*

Примечания: 1. Здесь и в таблице 2 активность гексокиназы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, изоцитратдегидрогеназы выражали в нмоль НАДФ<sup>+</sup>/ мин · мг белка; 6-фосфофруктокиназы, пируваткиназы, лактатдегидрогеназы - в нмоль НАДН/ мин · мг белка; цитохром с-оксидазы - в условных единицах / мин мг белка. 2. \* - достоверность отличий в значениях показателей между контрольной и опытной группами животных (P < 0,05 – 0,001). В каждой возрастной группе было по 5 животных.

Таблица 2. Влияние тироксина на активность ферментов энергетического обмена в нейтрофилах крови поросят

Возраст	3-дневные животные		5- дневные животные		10- дневные животные	
Фермент	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт
Гексокиназа	3,53±0,41	7,15±0,59*	5,70±0,51	17,89±1,35*	7,74 ±0,41	7,98 ±0,53
6-Фосфо-фруктокиназа	89,9 ±4,5	117,4±7,9*	112,3±8,0	396,3±31,7*	133,2 ±5,2	70,2 ±9,5*
Пируваткиназа	30,5±1,60	126,8±5,4*	23,8±0,95	59,3 ±6,4*	25,4 ±1,3	64,02±3,53*
Лактат-дегидрогеназа	37,6 ±2,1	175,3±7,9*	54,1 ±2,3	241,8±9,5*	166,5 ±9,9	135,2 ±9,2
Изоцитрат дегидрогеназа	2,91±0,21	4,83±0,37*	4,58±0,53	6,03 ±0,45	3,80 ±0,46	4,52 ±0,25
Цитохром с-оксидаза	3,28±0,14	3,76 ±0,40	4,04±0,17	10,84±0,62*	4,35 ±0,51	5,83±0,27*
Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа	9,26±0,35	8,54 ±0,35	8,90±0,48	9,08 ±0,63	8,15 ±0,68	7,73 ±0,55

Под влиянием тироксина в клетках исследуемых популяций происходит увеличение активности цитохром с-оксидазы (табл.1,2). Активность фермента в миелокариоцитах костного мозга достоверно повышается уже в течение 48 часов



после начала инъекций ( $P < 0,001$ ). Это, очевидно, объясняется стимуляцией синтеза молекул цитохром с-оксидазы в миелокариоцитах, как и в других клетках организма [11]. Что касается зрелых гранулоцитов крови, то активация фермента наблюдается только на 5-е сутки эксперимента. Это может обуславливаться меньшей чувствительностью цитохром с-оксидазы нейтрофилов к влиянию тироксина по сравнению с костномозговыми предшественниками этих клеток. Вероятно, процесс синтеза фермента в миелоидных клетках костного мозга является первичной мишенью для действия гормона, а зрелые нейтрофилы с повышенным содержанием молекул цитохром с-оксидазы появляются в циркуляции на более поздних стадиях эксперимента.

Для оценки интенсивности превращения моносахаридов в реакциях пентозофосфатного пути проводились исследования активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в гранулоцитах крови и миелоидных клетках костного мозга поросят. Установлено, что в миелокариоцитах животных опытной группы наблюдается резкое ингибирование катализированной ферментом реакции в течение всего периода исследований (табл. 1). Поскольку продукт пентозофосфатного пути рибозо-5-фосфат является исходным соединением при синтезе пуриновых нуклеотидов, то снижение уровня метаболизма глюкозы в реакциях шунта может вести к ингибированию синтеза компонентов нуклеиновых кислот. Вероятно, такой эффект тироксина в некоторой степени может быть причиной снижения пролиферативной активности миелоидных предшественников при действии гормона, выявленного нами в предыдущих исследованиях [12]. В то же время в нейтрофилах крови достоверных изменений активности фермента не обнаружено, что дает основание утверждать об отсутствии гормонального эффекта на интенсивность реакций пентозофосфатного пути в исследуемой популяции клеток.

Таким образом, результаты исследований дают основание утверждать об участии тироксина в регуляции энергетического метаболизма в клетках миелоидного ряда животных. Однако, ферментные системы циркулирующих нейтрофильных гранулоцитов и их предшественников в костном мозге характеризуются неодинаковой чувствительностью к регуляторному действию гормона. Так, в миелокариоцитах костного мозга более выражена (по сравнению с клетками крови) интенсификация аэробного этапа энергетического обмена с повышением активности ферментов цикла трикарбоновых кислот и окислительно-восстановительных процессов в дыхательной цепи митохондрий. В то же время в нейтрофильных гранулоцитах действие тироксина проявляется, в основном, в стимуляции анаэробного пути превращения углеводов, а влияние гормона на интенсивность реакций аэробного этапа катаболизма субстратов проявляется в меньшей степени.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Бережная Н.М.* (1988) Нейтрофилы и иммунологический гомеостаз. Киев: Наукова думка, 192 с.
2. *Алмазов В.А., Афанасьев Б.В., Зарицкий А.Ю., Мамаев Н.Н.* (1979) Физиология лейкоцитов человека. Л.: Наука, 232с.

3. *Da Silva F.M., Massart-Leen A.M., Burvenich C.* (1994) *Vet. Q.* **16**, № 4, 220-5.
4. *Strauss R.G., Mauer A.M.* (1978) In: *Perinatal Physiology*. (Ed. U.Stave). Plenum Medical Book Company. New York-London, 199-213.
5. *Рачев Р.Р., Ещенко Н.Д.* (1975) *Тиреоидные гормоны и субклеточные структуры*. М.: Медицина, 294с.
6. *Antonyak H., Slebodzinski A., Snitynski V., Brzezinska-Slebozinska E.* (1997) *Abstr. XXXIII Intern. Congr. of Physiol. Sciences.* - St.Petersburg, P.041.15
7. *Boyum A.A.* (1968) *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **21**, Suppl.97. 51 - 76.
8. *Harrison F.L., Beswick T.M., Chesterton C.I.* (1981) *Biochem.J.* **194**, 789- 796.
9. *Астауров Б.Л.* (1974) *Методы биологии развития*. М., 349-350.
10. *Cooperstein S.J., Lazarow A.* (1951) *J. Biol. Chem.* **189**, 665-670.
11. *Wiesner R.J., Kurowski T.T., Lak R.* (1992) *Molecular Endocrinology*. **6**, 1458-1467.
12. *Бабич Н.О.* (1998) Тезисы докл. на междунар. конференции студентов и молодых ученых. Тернополь, 12.

Поступила 3.09.98.

# **THE INFLUENCE OF THYROXINE ON THE ENZYMES OF ENERGY METABOLISM IN BONE MARROW MYELOID CELLS AND NEUTROPHILS OF NEONATAL PIGLET**

BABYCH N.O., ANTONYAK H.L., TYMOCHKO M.F.

Lviv State Medical University, Pekarska Str. 69, 290010 Lviv, Ukraine  
Institute of Agriculture and Animal Biology, V.Stus Str.38, 290034 Lviv, Ukraine

The influence of thyroxine on the activities of enzymes of energy metabolism (hexokinase, 6-phosphofructokinase, pyruvate kinase, lactate dehydrogenase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, NADP-isocitrate dehydrogenase, cytochrome *c* oxidase) was investigated in bone marrow myeloid cells and blood neutrophils of 3-10-day old neonatal piglets. Data obtained suggest different responsiveness of energy metabolism enzymes to thyroxine action. Repeated hormone injections resulted in the preferential stimulation of enzymes involved in oxidative stages of carbohydrate catabolism in animal myelocaryocytes, while the activities of anaerobic enzymes in these cells were less affected. At the same time glycolytic enzymes in neutrophil granulocytes showed higher sensitivity to thyroxine action than enzymes catalyzing oxidative stages of energy metabolism.

**Key words:** thyroxine, energy metabolism, myeloid cells, leukocytes, neutrophilic granulocytes