

УДК 612.017-577.121-616.441

©Коллектив авторов

## ГЛУТАТИОНОВАЯ РЕДОКС-СИСТЕМА, ИММУННЫЙ СТАТУС, ФЕРМЕНТЫ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ И МЕТАБОЛИЗМА ПУРИНОВЫХ НУКЛЕОТИДОВ ПРИ ГИПОТИРЕОЗЕ

*С.О. Тапбергенов\*, Б.С. Советов, Р.Б. Бекбосынова, С.М. Болысбекова*

Государственный медицинский университет Семей,  
Казахстан 071400 г. Семей, ул. Абая 105; тел.: (8-7222)56-98-02;  
эл. почта: salavat-tap@mail.ru

У животных с экспериментальным гипотиреозом изучены: состояние иммунного статуса, компоненты глутатиновой редокс-системы, активность ферментов антиоксидантной защиты и метаболизма пуриновых нуклеотидов.

Установлено, что на 8 сутки после тиреоидэктомии в крови крыс имеет место увеличение числа лейкоцитов, лимфоцитов, Т-хелперов, Т-супрессоров, возрастает число В-лимфоцитов. При этом снижается активность аденозиндеаминазы (AD), АМР-деаминазы (АМРD) и 5'-нуклеотидазы (5'Н) крови, но увеличивается соотношение активности ферментов AD/АМРD. Эти изменения активности ферментов катаболизма пуринов могут быть расценены как усиление функциональных взаимоотношений Т- и В-лимфоцитов при гипотиреозе. Функциональные сдвиги клеток иммунной системы сопровождаются повышением активности глутатионпероксидазы (ГПО), снижением активности супероксиддисмутазы, глутатионредуктазы (ГР) и соотношения ГР/ГПО. При этом на фоне увеличения количества общего, окисленного (GSSG) и восстановленного глутатиона (GSH) снижается их соотношение (GSH/GSSG).

В печени при гипотиреозе активация супероксиддисмутазы, сопровождается активацией глутатионпероксидазы, снижением активности глутатионредуктазы и соотношения ГР/ГПО. Одновременно, на фоне увеличения количества общего, окисленного и восстановленного глутатиона, снижается соотношение GSH/GSSG, снижается активность ферментов метаболизма пуриновых нуклеотидов и соотношение 5'Н/AD+АМРD.

Все эти данные свидетельствуют о функциональной взаимосвязи глутатиновой редокс-системы не только с ферментами антиоксидантной защиты, но и с активностью ферментов метаболизма пуриновых нуклеотидов и иммунным статусом. При гипотиреозе эти взаимоотношения более выражены.

**Ключевые слова:** гипотиреоз, глутатион, глутатионредуктаза, ферменты метаболизма пуринов

DOI: 10.18097/PBMC20156106737

### ВВЕДЕНИЕ

Токсическое действие активных форм кислорода, связанное с дисбалансом свободно-радикального окисления и активностью системы антиоксидантной защиты, является важнейшим патогенетическим звеном развития некоторых эндокринных заболеваний. В этом отношении особое место занимает рост патологии щитовидной железы, наблюдаемый в зоне повышенного радиационного фона, частности у лиц, проживающих в регионах, прилегающих к Семипалатинскому испытательному ядерному полигону. Установлено нарушение антиоксидантного статуса у лиц с выраженной патологией щитовидной железы с симптомами

гипотиреоза, вызванного последствиями аварии на Чернобыльской АЭС [1].

К настоящему времени сформировалось вполне закономерное представление о существовании прямой зависимости нарушений физиологических процессов от особенностей метаболизма, от состояния окислительно-восстановительных реакций и системы антиоксидантной защиты. В обеспечении антиоксидантной защиты клеток, наряду с супероксиддисмутазой (СОД) – ферментом, катализирующим превращение супероксид аниона ( $O_2^-$ ) до пероксида водорода и кислорода, – особое место занимает тиол-дисульфидная глутатионовая редокс-система и её ферменты: глутатионпероксидаза (ГПО) и глутатионредуктаза (ГР) [2, 3]. Основное

\* - адресат для переписки

место среди биотиолов, формирующих глутатионовую редокс-систему, занимает трипептид глутатион.

Глутатион является одним из самых мощных антиоксидантов, основным “сборщиком” свободных радикалов в клетках, он способен восстанавливать активные формы других антиоксидантов. Накоплено множество данных о роли колебаний окислительно-восстановительного состояния тиолдисульфидной системы клеток и тканей живых организмов в механизмах регуляции их функциональной активности [3]. Многочисленные и разнообразные по своей природе химические, физические и биологические агенты, в том числе гормоны, способные модифицировать тиолдисульфидную систему, оказывают, тем самым, прямое влияние на биохимические и физиологические процессы [4]. Истощение запасов глутатиона может привести и к нарушению функций клеток иммунной системы [5].

Установлено участие ферментов обмена пуриновых нуклеотидов в формировании механизмов общего адаптационного синдрома и функции иммунной системы [6]. Дисбаланс активности этих ферментов приводит к дисфункции иммунокомпетентных клеток и последующему иммунодефициту [7]. Одним из ферментов этой группы является 5'-нуклеотидаза (5'Н) – фермент катализирующий образование аденозина из АМР.

Аденозин оказывает многочисленные метаболические и функциональные эффекты: угнетает пролиферацию, дифференцировку и функции иммунных клеток, расширяя сосуды различных тканей, способствует поступлению кислорода и продукции АТР. Аденозин подавляет использование S-аденозилметионина в реакциях метилирования, которые служат важным фактором активации и пролиферации лимфоцитов [8]. При острой гипоксии повышение внеклеточной концентрации аденозина является защитным событием, ограничивающим воспалительный процесс. В то же время длительное увеличение концентрации внеклеточного аденозина может усугублять течение патологического процесса [9-11]. Это, по-видимому, может быть связано с тем, что аденозин через стадию образования аденина подвергается окислению ксантиноксидазой в мочевую кислоту, что сопровождается образованием пероксида водорода и других токсичных форм кислорода, оказывающих повреждающее действие на клетки [12].

Целью данной работы было исследование функциональной взаимосвязи глутатионовой редокс-системы с состоянием иммунного статуса, с активностью ферментов метаболизма пуриновых нуклеотидов и ферментов антиоксидантной защиты при экспериментальном гипотиреозе.

## МЕТОДИКА

Исследования проведены на беспородных белых крысах в возрасте 3-3,5 месяца с массой тела 160-200 г. Гипотиреоз вызывали тотальной тиреоидэктомией. В опыт брали животных на 8-е сутки после тиреоидэктомии.

В работе использовали сыворотку крови животных и отфильтрованный после центрифугирования при 800 об/мин гомогенат ткани печени в 0,25 молярном растворе сахарозы.

Состояние глутатионовой редокс-системы оценивали определяя количество общего, окисленного (GSSG) и восстановленного глутатиона (GSH) [13]. Об активности компонентов антиоксидантной системы защиты организма судили также по соотношению GSH/GSSG [14]. Активность ГР и глутатионпероксидазы ГПО определяли по методу, описанному Власовой с соавт. [15], а активность СОД – Дубининой с соавт. [16].

Активность ферментов обмена пуриновых нуклеотидов – АД и АМРД – определяли по методике Тапбергенова [17] и выражали в нмоль аммиака на мг белка в мин. Об активности 5'-нуклеотидазы (5'Н) судили по скорости гидролиза АМФ до аденозина и фосфорной кислоты и выражали в мкмоль  $H_3PO_4$  на мг белка в мин.

Для оценки иммунологического статуса в периферической крови подсчитывали общее количество лейкоцитов и лимфоцитов. Количество Т-лимфоцитов преимущественно с хелперной и супрессорной активностью определяли методом, описанным Limatyul et al. [18]. Количество Т- и В-лимфоцитов определяли, используя тест розеткообразования [19]. Количество В-лимфоцитов определяли по наличию рецептора к С3-компоненту комплемента [20].

Результаты исследования обрабатывали при помощи t-критерия Стьюдента. В работе приведены среднеарифметические данные  $\pm$  ошибка средних. Различия считали достоверными при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При гипотиреозе в крови снижается активность СОД и ГР, более чем в 3 раза возрастает активность ГПО, а также увеличивается уровень всех форм глутатиона: общего, восстановленного и окисленного (табл. 1). Снижение соотношения активности ГР/ГПО и резкое снижение соотношения GSH/GSSG, свидетельствуют об усиленном использовании восстановленной формы глутатиона в глутатионпероксидазной системе и о снижении уровня GSH, вызванное снижением активности ГР при гипотиреозе.

При таком состоянии глутатионовой редокс-системы в крови гипотиреозных животных обнаружено увеличение общего числа лейкоцитов и лимфоцитов (табл. 2). Повышается абсолютное содержание Т- и В-лимфоцитов, увеличивается абсолютное содержание Т-хелперов и Т-супрессоров.

Изменения иммунного статуса у животных с гипотиреозом сопровождаются снижением в крови активности ферментов метаболизма пуриновых нуклеотидов: 5'Н, АД и АМРД, а также увеличением соотношения активности АД/АМРД (табл. 3).

Таблица 1. Ферменты антиоксидантной системы и глутатион редокс-система в крови крыс при гипотиреозе.

Показатель	Контроль (n = 15)	Гипотиреоз (n = 20)
Супероксиддисмутаза (СОД) у.е / мл в мин	22,05±2,27	17,57±0,46*
Глутатионпероксидаза (ГПО) мкмоль окис. глутатион/ мл в мин	298,18±14,02	932,25±36,69*
Глутатионредуктаза (ГР) мкмоль НАДФН/мл в мин	6,0±0,31	2,8±0,16*
Соотношение ГР/ГПО	0,02±0,01	0,003±0,001*
Общий глутатион (мкмоль/л)	1680,28±82,05	2362,72±43,52*
Окисленный глутатион (GSSG) (мкмоль/л)	115,05±9,44	273,96±12,09*
Восстановленный глутатион (GSH) (мкмоль/л)	1565,23±72,61	2088,82±31,43*
Соотношение (GSH/ GSSG)	13,6±0,08	7,64±0,11*

Примечание. Здесь и в остальных таблицах звёздочкой обозначены статистически значимые различия ( $p < 0,05$ ) в сравнении с контролем.

Таблица 2. Изменения показателей иммунного статуса при гипотиреозе.

Показатель	Контроль (n = 15)	Гипотиреоз (n = 20)
Лейкоциты ( $10^9$ /л)	6,63±0,38	11,01±0,60*
Лимфоциты абс. сод.	4367,27±547,93	6411,11±391,31*
Лимфоциты %	62,92±2,95	60,37±1,83
Т-лимфоциты абс. сод	1015,23±132,16	1309,75±80,63
Т-лимфоциты %	20,85±1,05	20,4±2,26
Т-хелперы абс. сод.	627,92±25,50	875,40±44,7*
Т-хелперы %	11,40±1,27	11,50±0,76
Т-супрессоры абс. сод	456,91±63,66	841,40±46,51*
Т-супрессоры %	12,2±1,11	12,66±1,58
В-лимфоциты абс.	412,18±9,87	885,80±155,82*
В-лимфоциты %	8,92±1,13	10,67±1,25*

Таблица 3. Активность ферментов метаболизма пуриновых нуклеотидов в крови крыс при гипотиреозе.

Показатель	Контроль(n=15)	Гипотиреоз(n=20)
5'-нуклеотидаза (5'Н) мкмоль/мг в мин	37,71±6,00	25,02±3,00*
Аденозиндезаминаза (AD) мкмоль/мг в мин	482,96±39,82	368,49±33,72*
АМФ-дезаминаза (AMPD) мкмоль/мг в мин	299,97±42,67	191,80±23,82*
Коэффициент А (5'Н / AMPD)	0,12±0,01	0,13±0,02
Коэффициент В (AD / AMPD)	1,61±0,02	1,92±0,04*

Ранее нами было установлено, что изменения активности 5'Н, AD и AMPD отражаются на функциональном состоянии клеток иммунной системы [7]. В связи с этим, для более полной характеристики иммунного статуса мы предложили использовать не просто показатели активности ферментов метаболизма пуриновых нуклеотидов, а их соотношения, выражаемые через коэффициенты А и В (патент № 25985, изобретение № 9176 от 19.03 1998, Казахстан). Коэффициент А – соотношение активности ферментов 5'Н/AMPD, коэффициент В – соотношение активности ферментов AD/AMPD:

- увеличение коэффициента А выше контрольных величин свидетельствует о нормальной (нормализации) реактивности клеточного иммунитета, его Т-хелперного звена.

- снижение коэффициента А – это либо Т-хелперное ограничение (недостаточность), либо Т-хелперный иммунодефицит.

- снижение коэффициента В ниже контрольных величин связано с тем, что имеет место активация Т-супрессоров и нарушение функциональной взаимосвязи Т- и В- систем иммунитета.

- при увеличении коэффициента В имеет место восстановление (усиление) полноценной функциональной взаимосвязи Т- и В-звеньев иммунитета [7].

С учётом этих данных, увеличение коэффициента “В” (то есть отношение AD/AMPD), обнаруженное нами в крови гипотиреозных животных (табл. 3), может быть расценено как усиление функциональной взаимосвязи Т- и В-звеньев иммунитета.

Таким образом, интенсивное использование глутатионовой редокс-системы, а также зависимое от активности ферментов изменение количественного соотношения метаболитов пуринового обмена, приводящее к активации функциональной взаимосвязи Т- и В-звеньев иммунитета при гипотиреозе, могут быть расценены как адаптационная реакция организма на недостаток тиреоидных гормонов.

В печени гипотиреозных животных резко снижается активность ферментов метаболизма пуриновых нуклеотидов (табл. 4), что является косвенным показателем возможных изменений функции клеток печени. При этом снижается и соотношение активности ферментов ( $5'H/AD+AMPD$ ), ответственных за уровень аденозина в клетках печени (табл. 4). В результате изменений активности этих ферментов, уровень аденозина в печени снижается и за счёт усиления его дальнейшего катаболизма идёт процесс образования пероксида водорода и супероксидного аниона [12]. В результате этого резко активируются СОД и ГПО, снижается активность ГР. Эти изменения активности ферментов сопровождаются снижением их соотношения (ГР/ГПО), что свидетельствует об активации процессов антиоксидантной защиты в печени при уменьшении уровня GSH, вызванного снижением активности ГР при гипотиреозе (табл. 4).

Таким образом, при гипотиреозе в печени, как реакция на недостаток тиреоидных гормонов, на фоне активации СОД, имеет место интенсивное вовлечение для антиоксидантной защиты глутатионовой редокс-системы и усиленное использование восстановленной формы глутатиона в реакциях, катализируемых ГПО. Об этом явлении свидетельствует и снижение соотношения GSH/GSSG при одновременном увеличении уровня общего глутатиона и уровня восстановленной формы глутатиона.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Проведёнными исследованиями установлено, что при гипотиреозе имеют место значительные

изменения иммунного статуса: увеличение числа лейкоцитов, лимфоцитов, Т-хелперов, Т-супрессоров, возрастает число В-лимфоцитов. Одновременно в крови при гипотиреозе снижается активность AD, AMPD и  $5'H$ , но увеличивается соотношение активности ферментов AD/AMPD (коэффициент В). Увеличение этого коэффициента, указывает на то, что при гипотиреозе имеет место ускорение катаболизма аденозина и снижение его уровня в крови, что приводит к стимуляции кооперативных функциональных взаимоотношений Т- и В-звеньев иммунитета, как адаптационной реакции организма на гипотиреоз. Эти изменения в иммунном статусе сопровождаются увеличением активности ГР, снижением в крови активности СОД, ГР и соотношения ГР/ГПО. На фоне увеличения количества общего, окисленного и восстановленного глутатиона, снижается соотношение GSH/GSSG.

В печени при гипотиреозе активация СОД сопровождается активацией ГПО, снижением активности ГР и снижением соотношения ГР/ГПО. Одновременно, на фоне увеличения количества общего, окисленного и восстановленного глутатиона, снижается соотношение GSH/GSSG, снижается активность ферментов метаболизма пуриновых нуклеотидов и соотношение  $5'H/AD+AMPD$ , что приводит в итоге к снижению уровня аденозина.

Известно, что дезаминирование аденозина в печени приводит к образованию инозина, который через серию последовательных реакций разрушается до гипоксантина и далее до мочевой кислоты [12]. Этот процесс сопровождается активацией ксантиноксидазной реакции и образованием пероксида водорода, появление которого и приводит к активации системы антиоксидантной защиты, наблюдаемой нами при гипотиреозе.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о функциональной взаимосвязи глутатионовой редокс-системы не только с ферментами антиоксидантной защиты, но и с активностью ферментов метаболизма пуриновых нуклеотидов и иммунным статусом.

Таблица 4. Активность ферментов метаболизма пуриновых нуклеотидов и антиоксидантной системы и глутатионовая редокс-система в печени крыс при гипотиреозе.

Показатель	Контроль (n = 15)	Гипотиреоз (n = 20)
$5'$ -нуклеотидаза (мкмоль/мг в мин) ( $5'H$ )	$0,03 \pm 0,004$	$0,01 \pm 0,001^*$
Аденозиндезаминаза (мкмоль/мг в мин) (AD)	$0,71 \pm 0,08$	$0,41 \pm 0,03^*$
АМФ-дезаминаза (мкмоль/мг в мин) (AMPD)	$0,50 \pm 0,08$	$0,22 \pm 0,01^*$
Соотношение $5'H/AD+AMPD$	$2,47 \pm 0,05$	$1,58 \pm 0,02^*$
Супероксиддисмутаза (СОД) у.е./г в мин	$244,83 \pm 27,28$	$481,67 \pm 29,34^*$
Глутатионпероксидаза (ГПО) мкмоль окис. глутатион/г в мин	$120,0 \pm 13,37$	$442,94 \pm 25,07^*$
Глутатионредуктаза (ГР) мкмоль НАДФН/г в мин	$229,6 \pm 11,14$	$141,1 \pm 7,34^*$
Соотношение ГР/ГПО	$1,91 \pm 0,03$	$0,31 \pm 0,01^*$
Общий глутатион (мкмоль/г)	$9,24 \pm 0,29$	$12,80 \pm 0,23^*$
Окисленный глутатион (GSSG) (мкмоль/г)	$0,45 \pm 0,03$	$1,12 \pm 0,04^*$
Восстановленный глутатион (GSH) (мкмоль/г)	$8,79 \pm 0,26$	$11,68 \pm 0,34^*$
Соотношение GSH/ GSSG	$19,53 \pm 0,06$	$10,35 \pm 0,04^*$



1. При гипотиреозе в крови на фоне усиления кооперативных функциональных взаимоотношений Т- и В-звеньев иммунитета и увеличения соотношений активности ферментов AD/AMPD, снижается соотношение ГР/ГПО и GSH/GSSG, то есть имеет место функциональный сдвиг колебаний тиол-дисульфидного баланса в сторону усиленного расхода восстановленной формы глутатиона в реакциях, катализируемых ГПО.

2. В печени при гипотиреозе на фоне ускорения метаболизма аденозина, активации СОД и снижения соотношения GSH/GSSG, имеет место увеличение активности ГПО и функциональный сдвиг тиол-дисульфидного баланса в сторону повышенного использования восстановленной формы глутатиона для антиоксидантной защиты.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Гаврилин Ю.И., Хрущ В.Т., Погодин Р.И. (1996) Щитовидная железа у детей: последствия Чернобыля. Минск, 14-65.
2. Соколовский В.В. (2004) Вестник СПб Гос. Мед. Акад. им. Мечникова, **4**(5), 97-100.
3. Соколовский В.В. (2006) Сборник избранных трудов IV Международного Конгресса "Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине", сс. 121-131.
4. Moran L., Gutteridge J., Quinlan G. (2001) Curr. Med. Chem., **8**(7), 763-772.
5. Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. (2009) Биохимия, **55**(4), 365-379.
6. Tapbergenov S.O., Tapbergenov T.S. (2014) Stress, Adaptation and Adrenal-Thyroid Dysfunction Syndrome. ISBN:978-3-8465-2689-7, Saarbrücken, Germany, pp. 1-190.
7. Таббергенов С.О., Таббергенова Т.С. (2005) Биомед. химия, **51**, 199-205.
8. Hirschhorn R. (1986) Clin. Immunol. Immunopathol., **40**, 157-165.
9. Eckle T., Koeppen M., Eltzhig H.K. (2009) Physiology, **24**(5), 298-306.
10. Aherne C.M., Kewley E.M., Eltzhig H. (2011) Biochim. Biophys. Acta, **5**, 1329-1339.
11. Koeppen M., Eckle T., Eltzhig H.K. (2011) Adv. Pharm., **61**, 145-186.
12. Таббергенов С.О., Таббергенова Т.С. (2004) Медицинская и клиническая биохимия. ISBN:9965-652-77-5, Павлодар, сс. 188-190.
13. Травина С.В. (1955) Руководство по биохимическим исследованиям. М. Медгиз, сс. 253-255.
14. Колесникова Л.И., Вантеева О.А., Курашова Н.А., Власов Б.Я. (2013) Вестник РАМН, №7, 119-120.
15. Власова С.Н., Шабунина Е.И., Переслегина И.А. (1990) Лабор. дело, №8, 19-22.
16. Дубинина Е.Е., Сальникова Л.А., Ефимова Л.В. (1983) Лабор. дело, №10, 30-33.
17. Таббергенов С.О., Таббергенова Т.С. (1984) Лабор. дело. №2, 104-107.
18. Limatibul S., Shore A., Dosch H.M., Gelfand W. (1978) J. Clin. Exp. Immunol., **33**(3), 503-510.
19. Jondal M., Holm G., Wigzell H. (1972) J. Exp. Med., **136**, 207-209.
20. Ehlenberger A.G., McWilliams M., Phillips-Quagliata J.M. (1976) J. Clin. Invest., **57**(1), 53-56.

Поступила: 11. 01. 2015.

## GLUTATHIONE REDOX SYSTEM, IMMUNE STATUS, ANTIOXIDANT ENZYMES AND METABOLISM OF PURINE NUCLEOTIDES IN HYPOTHYROIDISM

S.O. Tapbergenov, B.S. Sovetov, R.B. Bekbosynova, S.M. Bolysbekova

Semey State Medical University,  
105 Abaya str., Semey, 071400 Kazakhstan; tel.: (8-7222)56-98-02; e-mail: salavat-tap@mail.ru

The immune status, components of the glutathione redox system, the activity of antioxidant enzymes and metabolism of purine nucleotides have been investigated in animals with experimental hypothyroidism.

On day 8 after an increase in the number of leukocytes, lymphocytes, T-helpers and T-suppressors as well as increased number of B-lymphocytes was found in blood of thyroidectomized rats. This was accompanied by decreased activity of adenosine deaminase (AD), AMP-deaminase (AMPD), and 5'-nucleotidase (5'N) in blood, but the ratio of enzyme activity AD/AMPD increased. These changes in the activity of enzymes, involved in purine catabolism can be regarded as increased functional relationships between T and B lymphocytes in hypothyroidism. The functional changes of immune system cells were accompanied by increased activity of glutathione peroxidase (GPx), a decrease in the activity of superoxide dismutase (SOD), glutathione reductase (GR) and the ratio GH/GPx. Thyroidectomized rats had increased amounts of total, oxidized (GSSG) and reduced glutathione (GSH), but the ratio GSH/GSSG decreased as compared with control animals.

In the liver, hypothyroidism resulted in activation of SOD, GPx, decreased activity of GR and decreased ratio GR/GPx. At the same time, the levels of total, oxidized, and reduced glutathione increased, but the ratio GSH/GSSG as well as activities of enzymes involved in purine nucleotide metabolism ratio (and their ratio 5'N/AD + AMPD) decreased.

All these data suggest a functional relationship of the glutathione redox system not only with antioxidant enzymes, but also activity of enzymes involved purine nucleotide metabolism and immune status.

**Key words:** hypothyroidism, glutathione, glutathione reductase, enzymes of purine metabolism