

УДК 577.121.-616-097\98-542.943-92'78

©Коллектив авторов

## ОСОБЕННОСТИ ВОЗДЕЙСТВИЯ АДЕНОЗИНА, АМР И ГИПЕРАДРЕНАЛИНЕМИИ НА ИММУННЫЙ СТАТУС, ФЕРМЕНТЫ МЕТАБОЛИЗМА ПУРИНОВЫХ НУКЛЕОТИДОВ И СИСТЕМУ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ

*С.О. Тапбергенов\*, Б.С. Советов, А.Т. Тапбергенов*

Кафедра биохимии и химических дисциплин Государственного медицинского университета г. Семей, г. Семей, ул. Абая 105, 071400 Казахстан; тел.: (8-7222)56-98-02; эл. почта: salavat-tap@mail.ru

Изучено состояние иммунного статуса, активность глутатионпероксидазы (ГПО), глутатионредуктазы (ГР), каталазы, аденозиндезаминазы (AD), АМР-дезаминазы (AMPD), 5'-нуклеотидазы (5'H), уровень малонового диальдегида (МДА) и диеновых конъюгатов (ДК) при введении животным адреналина АМР и аденозина. Адреналин вызывал увеличение общего числа лейкоцитов, лимфоцитов, снижение числа Т-супрессоров, РТМЛ и НСТ, увеличение уровня ДК. АМР и аденозин увеличивали общее число лейкоцитов, лимфоцитов, Т-лимфоцитов, Т-хелперов, снижали уровень МДА, РТМЛ и количество Т-супрессоров. Увеличивая соотношения активности AD/AMPD, адреналин, АМР и аденозин усиливают функциональную взаимосвязь Т- и В-звеньев иммунитета. Введение адреналина приводило к увеличению активности ГПО, каталазы, AD и AMPD в сердце и печени, а АМР и аденозина – к снижению активности ГР, ГПО, каталазы, уровня МДА и повышению активности AD и AMPD в сердце. Полученные результаты показывают, что при введении адреналина, АМР и аденозина происходит увеличение активности ферментов метаболизма пуриновых нуклеотидов (AD, АМР) и усиление функциональной взаимосвязи Т- и В-звеньев иммунитета. В отличие от адреналина, введение АМР и аденозина животным не вызывает стрессорной реакции организма.

**Ключевые слова:** аденозин, гипердреналинемия, иммунный статус, глутатионредуктаза, глутатионпероксидаза, аденозиндезаминаза, АМР-дезаминаза

DOI 10.18097/PBMC20166206645

### ВВЕДЕНИЕ

Известно, что аденозин как метаболит аденозинмонофосфата (АМР) обладает множеством функциональных и метаболических эффектов, направленных на поддержание гомеостаза. Обнаружено [1], что в стрессовых условиях, таких как ишемия, сепсис и тяжёлая травма длительное увеличение концентрации внеклеточного аденозина может усугублять течение патологического процесса [2-4].

Неоднородность эффектов аденозина связано с тем, что его действие реализуется через разные аденозиновые рецепторы [5]. Аденозин подавляет клеточный иммунный ответ, снижает уровень провоспалительных цитокинов, повышает уровень IL-10 и Т-клеток [6]. Этот эффект в какой-то мере объясняет защитную роль аденозина при ишемии и позволяет использовать аденозин для профилактики отторжения трансплантата [6].

Аденозин оказывает антиаритмическое действие на сердце [7], замедляет атриовентрикулярную проводимость индуцированную катехоламинами [8, 9]. Но как большинство антиаритмиков, аденозин обладает некоторым проаритмогенным действием [10]. Проаритмогенный эффект аденозина сопровождается увеличенным содержанием в сердце диеновых конъюгатов и малонового диальдегида [11]. Известно, что катаболизм аденозина и инозина в ксантиноксидазной реакции до мочевого кислоты, сопровождается накоплением токсичных форм

кислорода ( $H_2O_2$ ,  $O_2^*$ ,  $HO^*$ ), появление которых может вызвать процесс перекисного окисления липидов [12].

Показано, что при увеличении концентрации катехоламинов в периферической крови имеет место повышение продукции интерлейкина-6 (IL-6), функциональной активности Т-хелперов, содержание IgM, на фоне снижения уровня IgA и ингибирования продукции противовоспалительного цитокина IL-10 [13].

Широко известно, что при тахикардиях и при ишемии миокарда имеет место острая симпатическая гиперактивация и, как следствие, ускоренное образование продуктов неферментативного окисления адреналина, в частности адренохрома с накоплением  $H_2O_2$ . При этом, адреналин, ускоряя использование клетками АТФ, способствует увеличению уровня АМР и аденозина. АМР под воздействием 5'-нуклеотидазы разрушается до аденозина и фосфорной кислоты, а под воздействием АМР-дезаминазы дезаминируется до инозинмонофосфата (ИМР). Далее ИМР дефосфорилируется с образованием инозина. Инозин (фармакопейный препарат рибоксин), как и аденозин применяется в клинической практике как антигипоксическое и антиаритмическое действие.

Целью настоящей работы было изучение влияния АМР и аденозина и симпатической гиперактивации, вызванной введением животным адреналина на иммунный статус, на активность АМР-дезаминазы (AMPD), аденозиндезаминазы (AD), 5'-нуклеотидазы (5'H), каталазы, глутатионредуктазы (ГР) и глутатионпероксидазы (ГПО) и на уровень МДА и ДК.

\* - адресат для переписки

# МЕТОДИКА

Исследования проведены на 65 беспородных белых крысах в возрасте 3-3,5 месяца массой тела 160-180 г. В исследованиях руководствовались “Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных”. Животные были поделены на 4 группы: контрольная группа, группа животных, которым вводили адреналин, группа животных, которым вводили аденозинмонофосфат (АМР) и группа с введением аденозина. Симпатическую гиперактивацию (гиперадреналинемию) создавали внутрибрюшинным введением адреналина в дозе 4 мг/кг за 60 мин до исследования. АМР и аденозин (“Merck”, Германия) вводили подкожно по 0,1 мг в день в течение 10 дней (суммарная доза 1 мг). После декапитации брали кровь, сердце и печень животных. Сердце и печень животных промывали физиологическим раствором и гомогенизировали тефлоновым пестиком в среде, содержащей 0,25 М сахарозы. Гомогенат фильтровали через 2 слоя марли и центрифугировали в течение 10 мин (0°–2°С) при 600 g для удаления обломков клеток и ядерной фракции. Полученный супернатант использовали для исследования.

Активность глутатионредуктазы (ГР) и глутатионпероксидазы (ГПО) определяли как описано Власовой и соавторами [14]. Активность ферментов – AD, АМР, АМРD определяли по методике Тапбергена [15] и выражали в нмоль аммиака на мг белка в минуту. Об активности 5'-нуклеотидазы (5'N) судили по скорости гидролиза АМР до аденозина и фосфорной кислоты и выражали в количестве

мкмоль  $H_3PO_4$  на мг белка в минуту. Количество белка определяли общепринятым методом Лоури. Активность каталазы изучали по методу Королюк и соавторов [16].

Определение количества МДА проводили по методу Uchiyama и Mihara [17], диеновых конъюгатов по методу Гаврилова и соавторов [18]. Для оценки иммунологического статуса в периферической крови подсчитывали общее количество лейкоцитов и лимфоцитов. Количество Т-лимфоцитов с преимущественно хелперной и супрессорной активностью определяли по методу Limatibul и др. [19]. Количество Т- и В-лимфоцитов определяли розетко-образующими тестами [20]. Количество В-лимфоцитов определяли по наличию рецептора к С3-компоненту комплемента [21]. Реакцию торможения миграции лейкоцитов (РТМЛ) определяли по методу Clausen [22]. НСТ-тест проводили по методу Нагоева и Шубич [23]. Результаты исследования обрабатывали при помощи t-критерия Стьюдента. В работе приведены среднеарифметические величины  $\pm$  ошибка средних. Различия считали достоверными при  $p < 0,05$ .

# РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Симпатическая гиперактивация, вызванная введением адреналина в дозе 4 мг/кг за 60 мин исследования (табл. 1), сопровождается увеличением общего числа лейкоцитов, лимфоцитов, снижением числа Т-супрессоров, РТМЛ и НСТ, повышением уровня ДК, а также увеличением коэффициента “В” (соотношение активности AD/АМРD) за счёт возрастания активности аденозиндезаминазы (AD).

Таблица 1. Влияние введения адреналина, АМФ и аденозина на иммунный статус

Показатель	Контроль n=20	Адреналин n=15	АМР n=15	Аденозин n=15
Лейкоциты ( $10^9$ /л) общ. число	7,20 $\pm$ 0,48	9,35 $\pm$ 0,62*	8,91 $\pm$ 0,29*	8,45 $\pm$ 0,49*
Лимфоциты %	41,40 $\pm$ 2,39	40,93 $\pm$ 3,02	42,07 $\pm$ 1,41	41,80 $\pm$ 2,08
Лимфоциты, абс. содержание $10^9$ /л	2,79 $\pm$ 0,46	3,77 $\pm$ 0,14*	3,73 $\pm$ 0,16*	3,51 $\pm$ 0,24*
Т-лимфоциты %	38,47 $\pm$ 1,67	36,73 $\pm$ 1,94	39,60 $\pm$ 1,63	42,40 $\pm$ 1,65
Т-лимфоциты абс. содержание в $10^9$ /л	1,12 $\pm$ 0,12	1,38 $\pm$ 0,10	1,48 $\pm$ 0,07*	1,49 $\pm$ 0,11*
Т-хелперы %	22,47 $\pm$ 3,04	20,07 $\pm$ 1,32	23,40 $\pm$ 1,27	20,93 $\pm$ 1,42
Т-хелперы абс. содержание в $10^9$ /л	0,66 $\pm$ 0,07	0,76 $\pm$ 0,05	0,87 $\pm$ 0,05*	0,83 $\pm$ 0,05*
Т-супрессоры %	14,53 $\pm$ 2,54	15,47 $\pm$ 1,92	14,53 $\pm$ 1,50	13,53 $\pm$ 1,35
Т-супрессоры абс. содержание в $10^9$ /л	0,77 $\pm$ 0,40	0,55 $\pm$ 0,08*	0,54 $\pm$ 0,06*	0,48 $\pm$ 0,06*
В лимфоциты %	21,0 $\pm$ 2,09	20,53 $\pm$ 1,87	19,93 $\pm$ 1,47	20,93 $\pm$ 1,29
В-лимфоциты абс. содержание в $10^9$ /л	0,63 $\pm$ 0,13	0,77 $\pm$ 0,08	0,74 $\pm$ 0,07	0,74 $\pm$ 0,07
РТМЛ ФГА %	21,0 $\pm$ 2,01	15,47 $\pm$ 1,87**	16,33 $\pm$ 1,87*	16,27 $\pm$ 1,33*
НСТ-тест	7,53 $\pm$ 1,08	4,40 $\pm$ 1,62*	5,53 $\pm$ 1,83	5,27 $\pm$ 1,46
Коэффициент «А» (5'N/АМРD)	0,06 $\pm$ 0,02	0,07 $\pm$ 0,05	0,04 $\pm$ 0,02	0,06 $\pm$ 0,02
Коэффициент «В» (AD/АМРD)	1,26 $\pm$ 0,27	2,34 $\pm$ 0,40*	1,23 $\pm$ 0,02	3,69 $\pm$ 0,18**
МДА нмоль/л	0,73 $\pm$ 0,11	0,63 $\pm$ 0,05	0,44 $\pm$ 0,02*	0,46 $\pm$ 0,05*
ДК уд.един./мл	1,18 $\pm$ 0,23	1,60 $\pm$ 0,13*	1,35 $\pm$ 0,12	1,14 $\pm$ 0,13

Примечание. Здесь и в таблицах 2 и 3: \*-  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$  в сравнении с контролем.

При введении животным как АМР, так и аденозина возрастает общее число лейкоцитов, лимфоцитов, Т-лимфоцитов, Т-хелперов, снижается уровень МДА, РТМЛ и общее число Т-супрессоров (табл. 1). Как при введении адреналина, так и при введении аденозина увеличивается коэффициент "В".

Ранее было установлено [24], что увеличение коэффициента "В" в крови свидетельствует об усилении функциональной взаимосвязи Т- и В-звеньев иммунитета. Проведёнными исследованиями обнаружено, что усиление функциональной взаимосвязи Т- и В-звеньев иммунитета имеет место и после введения адреналина, и аденозина. Но в большей степени усиление взаимосвязи происходит после введения животным аденозина.

Введение аденозина приводило к активации ферментов антиоксидантной защиты (ГПО и каталазы) в сердце (табл. 2). Адреналин также активировал АД и АМРД, вызывая резкое увеличение соотношения активности ферментов АД+АМРД/5'Н.

Введение АМР и аденозина приводит в сердце фактически к однотипным изменениям: снижается активность ГР, ГПО, каталазы, снижается уровень МДА, повышается активность АД и АМРД. Соотношение активности ферментов АД+АМРД/5'Н увеличивается в меньшей степени, чем при введении адреналина.

При введении животным АМР и аденозин происходит снижение как процесса пероксидации в сердце, так и активности ферментов антиоксидантной защиты.

В печени введение адреналина (табл. 3) вызывает активацию ГПО, каталазы, активацию ферментов метаболизма пуринов АД и АМРД. Эти данные свидетельствуют о том, что и в печени животных происходят сдвиги, приближенные к состоянию окислительного стресса. Введение АМР и аденозина животным вызывает в печени снижение активности ГР, ГПО и уровня МДА, повышает активность АД и АМРД, увеличивая соотношение активности ферментов АД+АМРД/5'Н.

Таким образом, в печени АМР и аденозин также уменьшают как процесс пероксидации, так и адекватно активность ферментов антиоксидантной защиты (ГР, ГПО).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Проведёнными исследованиями установлено, что при симпатической гиперактивации, вызванной введением адреналина в дозе 4 мг/кг за 60 мин до исследования, увеличивается общее число лейкоцитов, лимфоцитов, снижается число

Таблица 2. Влияние адреналина, АМР и аденозина на активность ферментов антиоксидантной системы и метаболизма пуриновых нуклеотидов в сердце

Показатель	Контроль n=20	Адреналин n=15	АМР n=15	Аденозин n=15
ГР мкмоль NADPH/г в мин	32,13±1,78	35,31±1,39	17,36±1,03*	18,83±1,85*
ГПО мкмоль окис. глутатион/г в мин	2,69±0,30	3,12±0,21*	1,25±0,05*	1,74±0,25*
Каталаза моль/г в мин	69,85±2,28	81,58±3,08**	52,66±2,19*	57,77±3,40*
МДА нмоль/г	0,04±0,01	0,05±0,01	0,01±0,01*	0,01±0,01*
ДК уд.един./г	0,02±0,01	0,02±0,01	0,01±0,01	0,01±0,01
АД мкмоль/мг в мин	0,19±0,01	0,26 ±0,02*	0,26 ±0,03*	0,31 ±0,03*
АМРД мкмоль/мг в мин	0,09±0,01	0,13±0,01*	0,23±0,01*	0,11±0,01*
5'Н мкмоль/мг в мин	0,02±0,001	0,01±0,01	0,02±0,001	0,02±0,001
АД+АМРД/5'Н	14,0±0,15	39,02±0,21**	23,50±0,15*	22,0±0,12*

Таблица 3. Влияние адреналина, АМФ и аденозина на активность ферментов антиоксидантной системы и метаболизма пуриновых нуклеотидов в печени

Показатель	Контроль n=20	Адреналин n=15	АМФ n=15	Аденозин n=15
ГР мкмоль NADPH/г в мин	24,69±2,16	22,01±1,01	18,59±0,54*	20,80±0,89*
ГПО мкмоль окис. глутатион/г в мин	2,86±0,37	3,37±0,26*	1,31±0,14*	1,75±0,26*
Каталаза моль/г в мин	60,57±7,58	81,61±4,68**	52,89±2,87	57,08±2,88
МДА нмоль/г	0,04±0,001	0,05±0,01	0,01±0,01*	0,01±0,01*
ДК уд.един./г	0,02±0,001	0,03±0,01	0,01±0,01	0,01±0,01
АД мкмоль/мг в мин	0,29±0,21	0,40±0,02*	0,46±0,02*	0,47±0,06*
АМРД мкмоль/мг в мин	0,20±0,01	0,27±0,01*	0,29±0,01*	0,24±0,01*
5'Н мкмоль/мг в мин	0,04±0,001	0,05±0,01	0,05±0,01	0,04±0,001
АД+АМРД/5'Н	12,25±0,38	13,4±0,5	15,0±0,3*	20,25±0,56**

Т-супрессоров, РТМЛ и НСТ, повышается уровень ДК. За счёт возрастания активности АД, увеличивается коэффициент "В" (соотношение активности АД/АМРД), что свидетельствует об усилении функциональной взаимосвязи Т- и В-звеньев иммунитета [24].

При введении животным АМР и аденозина увеличивается общее число лейкоцитов, лимфоцитов, Т-лимфоцитов, Т-хелперов, снижается уровень МДА, РТМЛ и количество Т-супрессоров, увеличивается соотношение активности АД/АМРД усиление функциональной взаимосвязи Т- и В-звеньев иммунитета. В сердце и печени введение адреналина вызывает активацию ГПО, каталазы, ферментов метаболизма пуриновых нуклеотидов АД и АМРД. Все эти данные подтверждает положение о том, что в организме имеет место функциональная взаимозависимость системы антиоксидантной защиты с ферментами метаболизма пуриновых нуклеотидов и иммунным статусом [25].

С учётом того, что окислительный стресс есть состояние дисбаланса между наличием в биологической системе оксидантов и антиоксидантов в сторону преобладания оксидантов, можно считать, что после введения адреналина в сердце и в печени животных возникает состояние близкое к окислительному стрессу.

Введение АМР и аденозина здоровым животным приводит в сердце к однотипным изменениям: снижается активность ГР, ГПО, каталазы, снижается уровень МДА, повышается активность АД и АМРД. В печени введение АМР и аденозина также приводит к снижению активности ГР, ГПО, к ослаблению процесса образования МДА, к повышению активности АД и АМРД. Таким образом, в сердце и в печени при введении аденозина и АМР процесс пероксидации ослабевает и адекватно этому снижается активность ферментов антиоксидантной защиты.

Полученные данные вскрывают особенности эффектов симпатической гиперактивации, воздействия аденозина и АМР на иммунный статус, систему антиоксидантной защиты и ферменты метаболизма пуриновых нуклеотидов:

1. При симпатической гиперактивации, вызванной введением адреналина и при введении АМР и аденозина имеет место активация ферментов метаболизма пуриновых нуклеотидов и усиление функциональной взаимосвязи Т- и В-звеньев иммунитета.

2. Введение АМР и аденозина здоровым животным, в отличие от адреналина, не вызывает стрессорной реакции. Эффекты АМР и аденозина в сердце и печени направлены на сохранение системы антиоксидантной защиты и обеспечения равновесия системы окислительного гомеостаза.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Козловский В.И., Зинчук В.В., Станкевич П.Б., Хлопицкий С. (2007) Журнал Гродненского Государственного Медицинского Университета, **1**(17), 49-53.
2. Eckle T., Koeppen M., Eltzhig H.K. (2009) Physiology., **24**(5), 298-306.
3. Brown R.A., Clarke G.W., Ledbetter C.L. et al. (2008) Eur. Respir J., **31**, 311-319
4. Esther C.R. Jr., Lazaar A.L., Bordonali E., Qaqish B., Boucher R.C. (2011) T Chest., **140**(4), 954-960.
5. Ralevic V., Burnstock G. (1998) Pharmacol Rev., **50**(3), 413-492.
6. Naamani O., Chaimovitz C., Douvdevani A. (2014) Int. Immunopharmacol., **20**(1), 205-212
7. Lerman B.B., Belardinelli L. (1991) Circulation. **83**, 1499-1509.
8. Belardinelli L., Giles W.R. (1988) J. Physiol., **405**, 615-633.
9. Pelleg A., Mitsuoka T., Mazgalev T., Michelson E.L. (1987) Prog. Clin. Biol. Res., **230**, 375-384.
10. Елисеев В.В., Лосев Н.А., Сапронов Н.С., Селизарова Н.О., Евдокимова Н.Р., Крылова И.Б., Торкунов П.А. (1999) Экспер. клин. фармакол., **62**(2), 25-27.
11. Селизарова Н.О., Елисеев В.В., Крылова И.Б. (1994) Патол. физиол. экспер. тер., №4, 11-13.
12. Кулинский В.И. (1999) Соросовский образовательный журнал, №1, 2-7
13. Репина В.П. (2008) Экология человека. Архангельск. №2, с.30-33.
14. Власова С.Н., Шабунина Е.И., Переслгина И.А. (1990) Лабор. дело, №8, 19-22.
15. Тапберженов С.О., Тапберженова С.М. (1984) Лабор. Дело, №2, 104-107.
16. Королюк М.А., Иванова Л.И. и др. (1988) Лабор. дело, №1, 16-19.
17. Uchiyama M., Mihara M. (1978) Analyt. Biochem., **86**, 271-278.
18. Гаврилов В.Б., Гаврилов А.Р., Хмара А.Ф. (1988) Лабор. Дело, №2, 60-64.
19. Limatibul S., Shore A., Dosch H.M., Gelfand W. (1978) J. Clin. Exp. Immunol., **33**, 503-510.
20. Jondal M., Holm G., Wigzell H. (1972) J. Exp. Med., **136**, 207-209.
21. Ehlenberger A.G., McWilliams M., Phillips-Quagliata J.M. (1976) J. Clin. Invest., **57**(1), 53-56.
22. Clausen J.E. (1971) Acta Allergol., **26**(1), 56-80.
23. Нагоев Б.С., Шубич М.Г. (1981) Лабор. Дело, №4, 195-198.
24. Тапберженов С.О., Тапберженов Т.С. (2005) Биомед. химия, **51**(2), 199-205.
25. Тапберженов С.О., Советов Б.С., Бекбосынова Р.Б., Болысбекова С.М. (2015) Биомед. химия, **61**(6), 737-741. DOI: 10.18097/PBMC20156106737

Поступила: 23. 12. 2015.  
Принята к печати: 14. 11. 2016.

**FEATURES OF INFLUENCE OF ADENOSINE, AMP AND HYPERADRENALINEMIA  
ON THE IMMUNE STATUS, METABOLIC ENZYMES OF PURINE NUCLEOTIDES  
AND THE ANTIOXIDANT DEFENSE SYSTEM**

*S.O. Tapbergenov, B.S. Sovetov, A.T. Tapbergenov*

Department of Biochemistry and Chemical disciplines, Semey State Medical University,  
105 Abaya str., Semey, 071400 Kazakhstan; e-mail: salavat-tap@mail.ru

Administration of a large dose of adrenaline (4 mg/kg 60 min before analysis) increased blood levels of total leukocytes, lymphocytes, decreased T-cell suppressors, leukocyte migration inhibition reaction (LMIR) and NBT test, but increased the level of conjugated dienes (CD). Administration of AMP and adenosine increased levels of total leukocytes, lymphocytes, T- lymphocytes, T-helpers, decreased the level of malondialdehyde (MDA), LMIR, and T-cell suppressors. Sympathetic hyperactivation induced by administration of a large dose of adrenaline (4 mg/kg 60 min before analysis) was accompanied by an increase in heart and liver activities of glutathione peroxidase (GPx), catalase, AMP deaminase (AMPD), and adenosine deaminase (AD). Administration of AMP or adenosine caused a decrease in activities of glutathione reductase (GR), GPx, catalase, a decrease in the MDA level and an increase in activities of AMPD and AD in the heart. In the liver AMP and adenosine also caused a decrease in activities of glutathione reductase (GR), GPx, a decrease in the MDA level and an increase in activities of AMPD and AD. The data obtained suggest that administration of adrenaline, AMP, and adenosine influences activity of enzymes involved in purine nucleotide metabolism. However, in contrast to adrenaline, administration of AMP or adenosine does not provoke stress reaction.

**Key words:** adenosine, AMP, hyperadrenalinemia, immune status, glutathione reductase, glutathione peroxidase, adenosine deaminase, AMP deaminase