

СОСТОЯНИЕ МЕТАБОЛИЗМА ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ У БОЛЬНЫХ ДИФФУЗНЫМ ТОКСИЧЕСКИМ ЗОБОМ В ПРОЦЕССЕ ЛЕЧЕНИЯ

С.Г. Шагарова¹, В.П. Мацынина², С.А. Догадин^{2,3}, А.А. Савченко^{1,3}, В.Т. Манчук^{1,3}

¹Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера Сибирского отделения РАМН (директор – член-корреспондент РАМН, доктор мед. наук, проф. В.Т. Манчук)

²Эндокринологический центр КГБУЗ “Краевая клиническая больница” (главный врач – заслуженный врач РФ Б.П. Маштаков)

³ГОУ ВПО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздравсоцразвития РФ (ректор – доктор мед. наук, профессор И.П. Артюхов)

С.Г. Шагарова – канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН; В.П. Мацынина – врач эндокринологического центра КГУЗ “Краевая клиническая больница”; С.А. Догадин – доктор мед. наук, заведующий эндокринологическим центром КГУЗ “Краевая клиническая больница”, профессор кафедры внутренних болезней №2 ГОУ ВПО КрасГМУ; А.А. Савченко – доктор. мед. наук, профессор, руководитель лаборатории молекулярно-клеточной физиологии и патологии НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН, заведующий кафедрой физиологии ГОУ ВПО КрасГМУ; В.Т. Манчук – доктор мед. наук, профессор, член-корреспондент РАМН, директор НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН, профессор кафедры поликлинической педиатрии ГОУ ВПО КрасГМУ

В статье представлены данные исследования метаболизма лимфоцитов крови 35 женщин с болезнью Грейвса. Определение содержания тиреоидных (св. Т₄ и св. Т₃) и тиреотропного гормонов, антител к тиреопероксидазе и активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ лимфоцитов крови проводилось до начала лечения и спустя 1 и 3 мес на фоне приема тиамазола. В течение 3 мес терапии больных болезнью Грейвса достигается нормализация функции ЩЖ. В процессе лечения женщин с БГ метаболизм лимфоцитов на протяжении всего периода наблюдения характеризуется повышенным уровнем макромолекулярного синтеза и антиоксидантной способности клеток, высокой эффективностью малат-аспаратной челночной системы, а также повышенным уровнем аминокислотного обмена. Также у больных болезнью Грейвса нарушена эндокринная регуляция метаболизма лимфоцитов, на что указывает уменьшение взаимосвязанности между концентрацией тиреоидных гормонов и ферментативными показателями.

Ключевые слова: диффузный токсический зоб, метаболизм, лимфоцит.

The state of blood lymphocyte metabolism in Graves' disease patients in the treatment course

S.G. Shagarova, V.P. Macinina, S.A. Dogadin, A.A. Savchenko, V.T. Manchuk

This article is about the research of the blood lymphocyte metabolism in 35 women with Graves' disease (GD). The definition of thyroid (fO₄, O₃), thyro-tropic hormones, antibodies against thyroid peroxidase and blood lymphocyte NAD(P)-dependent dehydrogenases was spent before the beginning of treatment and later 1 and 3 months reception of thiamazolc. The thyroid hormones concentration in GD patients is come to normal after 3 months of treatment. The lymphocyte metabolism is characterized by the increase level of macromolecular synthesis and antioxidant ability in cells, high efficiency malate-aspartate shuttle, and the increase level amino-acid exchange in GD patients throughout all period of re-search. Also in GD patients it is broken endocrine regulation of lymphocyte metabolism, one point the correlation reduction between thyroid hormones concentration and enzyme indicators.

Key words: Graves' disease, metabolism, lymphocyte.

Введение

Патогенез болезни Грейвса (БГ, диффузный токсический зоб) тесно связан с нарушениями иммунной системы [8, 15, 17]. Ключевая роль в развитии БГ принадлежит стимулирующим аутоантителам к рецептору ТТГ, которые выявляются у больных практически в 100% случаев [4, 10, 15]. Появление аутоантител определяется сниженной супрессорной активностью лимфоцитов [13]. Уже не вызывает сомнений тот факт, что в основе функциональных проявлений лимфоцитов лежат их метаболические реакции [2, 5]. Особенно высокой информативностью для исследования метаболизма лимфоцитов обладают окислительно-восстановительные ферменты. Это связано с тем, что, являясь основными переносчиками электронов в клетке, они осуществляют ключевые реакции клеточного метаболизма и координируют сопряженные метаболические пути [3, 6, 11]. Таким образом, целью работы явилось исследование динамики изменений активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ лимфоцитов крови больных БГ в процессе тиреостатической терапии.

Материал и методы

В трехмесячное открытое проспективное исследование было включено 35 больных с верифицированным при гормональном анализе диагнозом Болезнь Грейвса до начала лечения тиреотоксикоза и в динамике через 1 и 3 мес на фоне лечения тиреостатиками. Все обследованные – женщины в возрасте от 18 до 55 лет. Критериями исключения служили: мужской пол, ремиссия БГ, наличие других аутоиммунных заболеваний (в том числе эндокринной офтальмопатии), а также сопутствующих заболеваний, требующих параллельного лечения, беременность, лактация, узловые образования в щитовидной железе (ЩЖ) по данным сонографии и/или с локальным усилением захвата ^{99m}Tc и подавлением перинодулярной паренхимы. Группу сравнения составили 100 практически здоровых женщин того же возрастного диапазона без нарушения функции ЩЖ. Критерии исключения: беременность, лактация, указания в анамнезе на заболевания ЩЖ, заболевания ЩЖ у кровных родственников и наличие зоба и/или структурных изменений в железе при обследовании. Обследование всех женщин репродуктивного возраста проводилось в 1-ю фазу менструального цикла.

Лечение выполнялось тиреостатическим препаратом группы тионамидов – тиамазолом (тирозол, производитель “Мерк КГаА”, Германия). Использовалась схема “Блокирую” [9]. Начальная доза препарата составляла 30 мг/сут, постепенно она снижалась до поддерживающей, при этом контролировались данные объективного статуса и гормонально-лабо-

раторных показателей. Критерием эффективности лечения являлись нормализация уровней св. T_4 и T_3 [9].

Концентрация тиреотропного (ТТГ) и тиреоидных (св. T_4 и T_3) гормонов в сыворотке крови определялись радиоиммунным методом (“Иммунотех”, Чешская Республика) при постановке диагноза, а также через 1 и 3 мес терапии. Уровень антител к тиреопероксидазе (АТ-ТПО) – иммуноферментным методом (“Мультитест”, Россия) до начала лечения и спустя 1 и 3 мес. на фоне приема тиамазола. Нормативные показатели для ТТГ 0,17–4,05 мЕд/л; T_3 – 1,2–2,8 нмоль/л; св. T_4 – 11,5–23 пмоль/л, АТ-ТПО – 0–30 мЕд/л.

Определение активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах проводили биолюминесцентными методами [7]. Определяли активность следующих ферментов: глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ), НАД⁺- и НАДН-зависимой лактатдегидрогеназы (ЛДГ), НАД⁺- и НАДН-зависимой малатдегидрогеназы (МДГ и НАДНМДГ), маликфермента (НАДФМДГ), НАДФ⁺- и НАДФН-зависимой глутаматдегидрогеназы (НАДФГДГ и НАДФНГДГ), НАД⁺- и НАДН-зависимой глутаматдегидрогеназы (НАДГДГ и НАДНГДГ), НАД⁺- и НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназы (НАДИЦДГ и НАДФИЦДГ) и глутатионредуктазы (ГР). Активность дегидрогеназ выражали в ферментативных единицах на 10⁴ клеток (1Е = 1 мкмоль/мин [1]).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью пакета программ Statistica 8.0 (StatSoft, USA). Нормальность распределений проверялась методом Колмогорова–Смирнова. Данные представлены в виде медианы (Ме), нижнего и верхнего квартилей (25; 75). Статистическая значимость различий независимых групп оценивали с помощью критериев Краскела–Уоллиса (H) и Манна–Уитни (U) с поправкой Бонферрони, связанных групп – Фридмана (S) и Вилкоксона (T) с поправкой Бонферрони. Проведена ранговая корреляция по Спирмену. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез в данном исследовании принимался равным 0,05.

Результаты и их обсуждение

На момент первичного обследования у больных БГ значительно повышен уровень тиреоидных гормонов (табл.). Так, концентрации св. T_4 и T_3 изначально увеличены, после одномесячного лечения они снижались до нормального диапазона. По механизму отрицательной обратной связи уровень секреции ТТГ гипофизом повышается через 1 мес и достигает диапазона нормы через 3 мес. При первичном обследовании женщины находятся в состоянии ги-

Таблица. Концентрация тиреоидных, тиреотропного гормонов и АТ-ТПО в сыворотке крови больных БГ [Ме, (25; 75)]

Показатель	Контроль n = 38	До лечения n = 35	Через 1 мес лечения n = 33	Через 3 мес лечения n = 25
T ₃ , нмоль/л	1,8 (1,5; 2,2)	5,8 (4,0; 7,6) <i>p₁ < 0,001</i>	2,53 (1,82; 3,18) <i>p₁ = 0,0002</i> <i>p₂ < 0,001</i>	2,4 (2,0; 2,6) <i>p₁ = 0,0003</i> <i>p₂ < 0,001</i>
св. T ₄ , пмоль/л	14,95 (13,8; 15,6)	49,4 (39,70; 67,75) <i>p₁ < 0,001</i>	18,10 (9,04; 23,89) <i>p₂ < 0,001</i>	12,3 (10,23; 15,02) <i>p₁ = 0,0092</i> <i>p₂ < 0,001</i>
ТТГ, мкЕД/мл	1,19 (0,86; 1,56)	0,09 (0,06; 0,11) <i>p₁ < 0,001</i>	0,11 (0,08; 0,15) <i>p₁ < 0,001</i>	0,61 (0,11; 3,68) <i>p₂ = 0,0002</i>
АТ-ТПО, Ед	1,0 (0,0; 3,0)	79,0 (17,0; 286,0) <i>p₁ < 0,001</i>	78,0 (15,0; 306,0) <i>p₁ < 0,001</i>	40,0 (5,0; 219,0) <i>p₁ < 0,001</i>

пертиреоза. Через 1 мес после начала лечения у пациентов с БГ нормализовалось содержание тиреоидных гормонов, что отражает переход гипертиреоза в эутиреоз. На протяжении всего периода исследования уровень АТ-ТПО оставался значительно повышенным.

Исследование состояния метаболизма лимфоцитов выявило значительные изменения у больных БГ до начала лечения: повышена активность Г6ФДГ, НАДГДГ, НАДФГДГ, НАДНГДГ, НАДФНГДГ, НАДНМДГ и ГР при снижении – НАДФИЦДГ (рис. 1, 2). Через 1 мес после начала лечения в лимфоцитах больных БГ повышена активность Г6ФДГ, НАДНМДГ, ГР, НАД⁺- и НАДФ⁺-, НАДН- и НАДФН-зависимых глутаматдегидрогеназ. При обследовании через 3 мес обнаружены следующие особенности метаболизма лимфоцитов больных БГ: увеличена активность Г6ФДГ, ЛДГ, НАДНМДГ, ГР, НАДФГДГ, НАД⁺- и НАДФ⁺-, НАДФН-зависимых глутаматдегидрогеназ относительно контроля. Причем активность ЛДГ выше, а НАДНГДГ ниже при последнем исследовании относительно группы женщин с БГ до лечения. Кроме того, в лимфоцитах женщин с БГ через 3 мес после начала лечения обнаружено снижение активности НАДНГДГ относительно данных исследования как до, так и через 1 мес после начала лечения.

Исследование метаболизма лимфоцитов выявило рост изначально повышенной активности Г6ФДГ в процессе лечения (см. рис. 1). Повышение активности Г6ФДГ (инициирующего и лимитирующего фермента пентозофосфатного пути окисления углеводов) отражает повышение уровня синтеза пентозофосфатов (рибозофосфата и дезоксирибозофосфата), являющихся субстратом для образования нуклеиновых кислот, а также НАДФН. Как известно, Г6ФДГ и ГР тесно взаимосвязаны как пространственно, так и общим кофактором: восстановление глутатиона происходит за счет окисления НАДФН, который восстанавливается в Г6ФДГ-реакции [16].

На протяжении всего периода исследования активность ГР остается повышенной, что отражает высокую антиоксидантную и пролиферативную способность клеток (см. рис. 1).

Энергетические реакции лимфоцитов определяются интенсивностью как анаэробных, так и аэробных процессов [5, 12]. Повышение активности аэробной реакции ЛДГ характеризует подавление терминальных реакций гликолиза лимфоцитов у женщин с БГ через 3 мес после начала лечения (см. рис. 1). По сравнению с периодом до лечения через 3 мес лечения у больных БГ повышение аэробной активности ЛДГ в лимфоцитах приводит к увеличению концентрации пирувата, являющегося источником ацетил-коэнзима А – основного субстрата ЦТК в митохондриях. Однако никаких изменений в динамике лечения активности ни ключевых, ни вспомогательного ферментов цикла Кребса в лимфоцитах крови больных БГ обнаружено не было.

Основной механизм, связующий анаэробное и аэробное окисление, – это малат-аспартатный шунт. Он осуществляет транспорт восстановленного в гликолизе НАДН в митохондрии для окисления в цепи дыхательных ферментов и обратно окисленный НАД⁺ в цитоплазму для непрерывного протекания реакций гликолиза, таким образом поддерживая соотношение НАД⁺/НАДН [14]. Увеличение активности ключевого фермента малат-аспартатного шунта – НАДНМДГ указывает на его активацию (см. рис. 1). Активность данного фермента изначально повышенная, в процессе лечения, как через 1, так и через 3 мес, остается выше контрольного значения, что характеризует интенсификацию окислительно-восстановительных процессов в цитоплазме, которая, возможно, вызвана недостатком АТФ в лимфоцитах больных БГ, так как высокие дозы тиреоидных гормонов вызывают разобщение окислительного фосфорилирования.

Также нами в лимфоцитах крови больных в процессе лечения обнаружено повышение активности

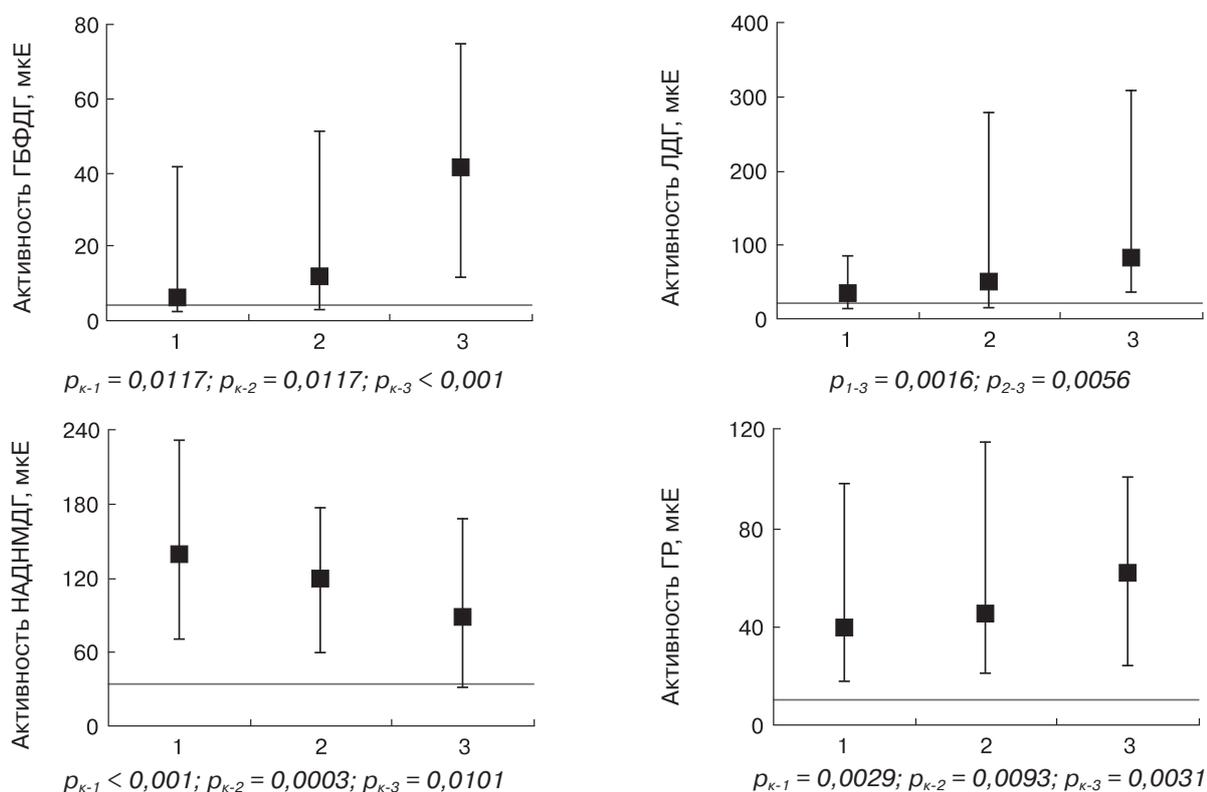


Рис. 1. Активность Г6ФДГ, ЛДГ, НАДНМДГ и ГР в лимфоцитах крови у больных БГ в процессе лечения.

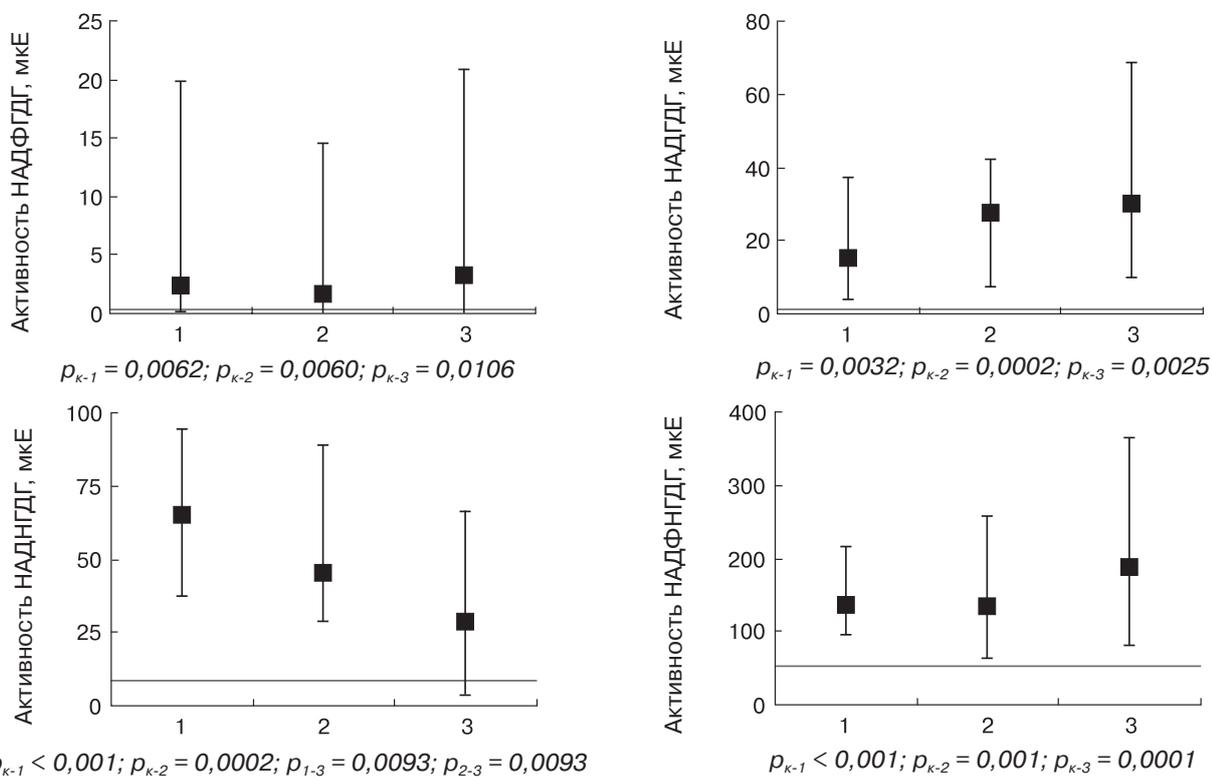


Рис. 2. Активность глутаматдегидрогеназ в лимфоцитах крови у больных БГ в период лечения.

Примечание к рисункам. Группы больных (БГ). 1 – до лечения, 2 – через 1 мес после начала терапии, 3 – через 3 мес после начала терапии, сплошная – контроль (Me). Статистически значимые различия показателей: контрольной группы с группами больных до лечения, через 1 и 3 мес терапии (p_{k-1}, p_{k-2} и p_{k-3}); групп больных до лечения и через 1 мес лечения (p_{1-2}), до лечения и через 3 мес лечения (p_{1-3}), через 1 и 3 мес лечения (p_{2-3}).

регуляторного фермента – глутаматдегидрогеназы, что отражает активацию аминокислотного и, следовательно, белкового обменов (см. рис. 2). Необходимо отметить, что на протяжении всего периода наблюдения больных женщин уровни активность НАД⁺-, НАДФ⁺-, НАДН- и НАДФН-зависимых глутаматдегидрогеназ остаются повышенными, кроме НАДНГДГ, активность которой к 3-му мес лечения снижается до нормального уровня.

Таким образом, в процессе лечения женщин с БГ метаболизм лимфоцитов претерпевает значительные изменения при сохранении некоторых тенденций, проявляющихся на протяжении всего периода наблюдения: сохраняется повышенным уровень макромолекулярного синтеза и антиоксидантной способности клеток, поддерживается высокая эффективность малат-аспартатной челночной системы, а также повышенный уровень аминокислотного обмена. В ходе обследования выявлена активация энергетических процессов. При этом в лимфоцитах крови больных БГ уровень активности аэробной реакции ЛДГ увеличивается через 3 мес после начала лечения.

Тиреоидные гормоны оказывают регулирующее действие на метаболизм клеток всех органов и систем, в том числе и на лимфоциты. Это множественное и неоднозначное действие зависит от концентрации данных гормонов. Однако доказаны такие эффекты их воздействия на метаболизм клеток, как активация окислительных процессов, разобщение окислительного фосфорилирования и интенсификация синтеза белка [18]. Механизм действия тиреоидных гормонов основан на их способности изменять экспрессию ряда генов. К ним относятся гены, определяющие различные биохимические процессы и клеточные функции, включая глюконеогенез, липогенез, проведение внутриклеточных сигналов, пролиферацию и апоптоз.

Для определения “точек воздействия” тиреоидных гормонов на метаболизм лимфоцитов через уровни активности исследованных нами ферментов проведен корреляционный анализ.

В группе здоровых женщин обнаружены положительные корреляции между концентрацией Т₃ и активностью Г6ФДГ ($r = 0,59; p < 0,001$), Г3ФДГ ($r = 0,59; p < 0,001$), ЛДГ ($r = 0,40; p = 0,013$), ГР ($r = 0,35; p = 0,032$); содержания св.Т₄ и активностью НАДФДГ ($r = 0,34; p = 0,374$) и НАДНЛДГ ($r = 0,44; p = 0,006$). Трансляция генов некоторых ферментов может регулироваться непосредственно Т₃, а других – белками, синтез которых зависит от тиронинов [6, 18]. Это позволяет тиреоидным гормонам регулировать обмен веществ в клетках.

У больных БГ в условиях аутоиммунной агрессии, сопровождающейся гипертиреозом, не только метаболизм лимфоцитов претерпевает значительные перестройки, но и нарушаются иммуоэндокринные взаимоотношения. Проявлением этого является уменьшение взаимосвязанности между концентрацией тиреоидных гормонов и ферментативными показателями лимфоцитов. В процессе терапевтического достижения нормального тиреоидного фона сохраняется тенденция, аналогичная обнаруженной в группе женщин с БГ до лечения.

Это может быть объяснено тем, что лимфоциту присуще свойство автономности, которое обеспечивает достижение гомеостаза клетки. В условиях гипертиреоза, по-видимому, для предотвращения влияния чрезмерной тиреоидной регуляции в лимфоцитах уменьшается количество рецепторов, а также изменяется их аффинность. Вероятно, что в рецепторном аппарате лимфоцитов больных БГ в условиях гипертиреоза преобладают низкоаффинные рецепторы.

Выводы

1. До начала лечения у больных БГ в лимфоцитах крови активированы ферменты, определяющие процессы макромолекулярного синтеза и аминокислотного обмена.

2. В течение 3 мес тиреостатической терапии в лимфоцитах сохраняется повышенный уровень макромолекулярного синтеза и антиоксидантной активности, активирован малат-аспартатный челнок, а также реакции аминокислотного обмена.

3. У больных БГ значительно нарушена эндокринная регуляция метаболизма лимфоцитов, что отражает перестройку иммуоэндокринных взаимоотношений.

Список литературы

1. Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф. Биологическая химия. М.: Медицина, 1998.
2. Захарова Л.Б., Манчук В.Т., Нагирная Л.А. Метаболизм иммунокомпетентных клеток жителей Севера в онтогенезе. Новосибирск, 1999.
3. Иванищев В.В., Курганов Б.И. Ферменты метаболизма малата: характеристика, регуляция активности и биологическая роль // Биохимия. 1992. Т. 57. Вып. 5. С.6 53–662.
4. Колода Д.Е., Фадеев В.В. Антитела к рецептору тиреотропного гормона в диагностике и лечении болезни Грейвса–Базедова // Пробл. эндокринологии. 2005. №2. С. 8–14.
5. Робинсон М.В., Торопова Л.Б., Труфакин В.А. Морфология и метаболизм лимфоцитов. Новосибирск: Наука, 1986.
6. Савченко А.А., Кадричева С.Г., Догалин С.А., Бураков А.Ю. Информативность показателей активности ферментов лимфоцитов у больных аутоиммунными заболеваниями щитовид-

- ной железы // Пробл. эндокринологии. 2003. Т. 49. №3. С. 18–22.
7. Савченко А.А., Сунцова Л.Н. Высокочувствительное определение активности дегидрогеназ в лимфоцитах периферической крови человека биолюминесцентным методом // Лаб. дело. 1989. №11. С. 23–25.
 8. Фадеев В.В. Болезнь Грейвса // Рус. мед. жур. 2002. Т. 10. №27. С. 1262–1265.
 9. Эндокринология. Национальное руководство / Под ред. Дедова И.И. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008.
 10. Alnaqdy A., Al-Maskari M. Determination of the levels of anti-thyroid-stimulating hormone receptor antibody with thyroid peroxidase antibody in Omani patients with Graves' disease // Med. Princ. Pract. 2005. V. 14. N4. P. 209–212.
 11. Board M., Humm S., Newsholme E.A. Maximum activities of key enzymes of glycolysis, glutaminolysis, pentose phosphate pathway and tricarboxylic acid cycle in normal, neoplastic and suppressed cells // Biochem J. 1990. V. 265. N2. P. 503–509.
 12. Bortell R., Moss J., McKenna R.C. et al. Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) and its metabolites inhibit T lymphocyte proliferation: role of cell surface NAD glycohydrolase and pyrophosphatase activities // J. Immunol. 2001. V. 167. N4. P. 2049–2059.
 13. Dogan R.N.E., Vasu C., Holterman M.J., Prabhakar B.S. Absence of IL-4, and Not Suppression of the Th2 Response, Prevents Development of Experimental Autoimmune Graves' Disease // J. Immunol. 2003. V. 170. P. 2195–2204.
 14. Hwang K., Jeong D.W., Lee J.W. et al. Alteration of the NAD⁺/NADH ratio in CHO cells by stable transfection with human cytosolic glycerol-3-phosphate dehydrogenase: resistance to oxidative stress // Mol. Cells. 1999. V. 9. N4. P. 429–435.
 15. Rapoport B., McLachlan S.M. Thyroid autoimmunity // J. Clin. Invest. 2001. V. 108. N9. P. 1253–1259.
 16. Tarrío N., García-Leiro A., Cerdán M.E. et al. The role of glutathione reductase in the interplay between oxidative stress response and turnover of cytosolic NADPH in *Kluyveromyces fragilis* // FEMS Yeast Res. 2008. V. 8. N4. P. 597–606.
 17. Volpe R. Autoimmune diseases of the endocrine system / CRC. Boca Raton, 1999. P. 51–72.
 18. Yamauchi M., Kambe F., Cao X. et al. Thyroid hormone activates adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase via intracellular calcium mobilization and activation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta // Mol. Endocrinol. 2008. V. 22. N4. P.893–903.