

2. Burnstock G. Historical review: ATP as a neurotransmitter // Trends Pharm. Sci. — 2006. — Vol. 27. — P. 166–176.
3. Galkin A.V., Giniatullin R.A., Mukhtarov M.R., Svandova I. ATP but not adenosine inhibits nonquantal acetylcholine release at the mouse neuromuscular junction // Eur. J. Neur. — 2001. — Vol. 13. — P. 2047–2053.
4. Grishin S., Teplov A., Galkin A. et al. Different effects of ATP on the contractile activity of mice diaphragmatic and skeletal muscles // Neurochem. Int. — 2006. — Vol. 49. — P. 756–763.
5. Ji W., Chen X., Zhengrong C. et al. Therapeutic effects of anti-B7-1 antibody in an ovalbumin-induced mouse asthma model // Int. Immunopharmacol. — 2008. — Vol. 8. — P. 1190–1195.
6. Kim S.H., Lee Y.C. Piperine inhibits eosinophil infiltration and airway hyperresponsiveness by suppressing T cell activity and Th2 cytokine production in the ovalbumin-induced asthma model // J. Pharmacol. — 2009. — Vol. 61. — P. 353–359.
7. Mariathasan S., Monack M. Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation // Nat. Rev. Immunol. — 2007. — Vol. 7. — P. 31–40.
8. Solle M., Labasi J., Perregaux D. et al. Altered cytokine production in mice lacking P2X(7) receptors // J. Biol. Chemist. — 2001. — Vol. 276. — P. 125–132.
9. Teplov A., Grishin S., Mukhamedyarov M. et al. Ovalbumin-induced sensitization affects non-quantal acetylcholine release from motor nerve terminals and alters contractility of skeletal muscles in mice // Experim. Physiol. — 2009. — Vol. 94. — P. 264–268.
10. Tsai T.L., Chang S.Y., Ho C.Y. et al. Role of ATP in the ROS-mediated laryngeal airway hyperreactivity induced by laryngeal acid-pepsin insult in anesthetized rats // J. Applied Physiol. — 2009. — Vol. 106. — P. 1584–1592.

УДК 616.441-008.64: 612.084: 612.015.11: [615.252+615.272]

Е3

АКТИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ И ПРОЦЕССЫ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ГИПОТИРЕОЗЕ И КОРРЕКЦИИ ТИРЕОИДНЫХ СДВИГОВ ЙОДИРОВАННЫМ ПОЛИСАХАРИДНЫМ КОМПЛЕКСОМ

Феликс Хусаинович Камилев¹, Александр Николаевич Мамцев², Валерий Николаевич Козлов²,
Гузель Маратовна Абдуллина¹, Ольга Владимировна Лобырева^{2*}

¹Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа,

²Московский государственный университет технологий и управления им. К.Г. Разумовского

Реферат

Цель. Определение активности антиокислительных ферментов в ткани печени крыс на фоне тиамазолового гипотиреоза, а также после его коррекции йодосодержащим органоминеральным комплексом.

Методы. Исследования проводили на крысах, которые были разделены на четыре группы: первая — контрольная, у животных второй, третьей и четвертой групп вызывали гипотиреоз ежедневным внутрижелудочным введением тиамазола в дозе 2,5 мг на 100 г массы тела в течение 3 нед. Начиная с 22-го дня эксперимента, животные четвертой группы в течение месяца получали биологически активную добавку в дозе, обеспечивающей суточную потребность крыс в йоде, а животные третьей группы находились на стандартной диете вивария. Активность супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы определяли с помощью реактивов набора «RANSOD Randox» фирмы «Laboratories Ltd.», активность каталазы оценивали по методу М.А. Королюк.

Результаты. Экспериментальный гипотиреоз у крыс характеризовался снижением концентрации свободного тироксина, повышением содержания общего трийодтиронина и тиреотропного гормона. У животных, получавших тиамазол, активность супероксиддисмутазы составляла 85,6% уровня активности у контрольных животных, глутатионпероксидазы — 77,3% уровня интактных животных. Активность каталазы при гипотиреозе снижалась значительно — до 40% уровня контроля ($p \leq 0,001$). В гомогенате печени крыс, принимавших после воспроизведения гипотиреоза в течение 1 мес «йодбиополимер», активность супероксиддисмутазы почти достигла контрольных значений и составляла 95,5% активности интактных животных. Активность глутатионпероксидазы и каталазы даже несколько превышала контрольные значения, достигая соответственно 115,6 и 112,7% уровней активности в контроле ($p \leq 0,05$). В то же время у животных, находившихся на стандартном рационе, активность исследованных ферментов оставалась ниже контрольных значений, причём каталазы — значительно ниже (49,9% контроля, $p \leq 0,001$).

Вывод. Введение йодосодержащего биологически активного соединения на фоне гипотиреоза способствовало восстановлению активности тиреоидзависимых антиоксидантных ферментов, нормализации функционального состояния гипотизарно-тиреоидной системы и ингибированию процессов перекисного окисления липидов в печени животных.

Ключевые слова: экспериментальный гипотиреоз, тиреоидные гормоны, супероксиддисмутаза, глутатионпероксидаза, каталаза, хемилюминесценция, йодированный полисахаридный комплекс.

ACTIVITY OF ANTIOXIDANT ENZYMES AND PROCESSES OF FREE RADICAL OXIDATION IN EXPERIMENTAL HYPOTHYROIDISM AND CORRECTION OF THYROID SHIFTS WITH IODIZED POLYSACCHARIDE COMPLEXES
F.Kh. Kamilov¹, A.N. Mamtsev², V.N. Kozlov², G.M. Abdullina¹, O.V. Lobyreva². ¹Bashkir State Medical University, Ufa city, ²Moscow State University of Technologies and Management named after K.G. Razumovsky. **Aim.** To determine the activity of antioxidant enzymes in rat liver tissue on the background of thiamazole hypothyroidism, and also after its correction with iodine-containing organo-mineral complexes. **Methods.** Studies were conducted on rats, which were divided into four groups: the first group — the control, in animals of the second, third and fourth groups hypothyroidism was induced by daily intragastric administration of thiamazole at a dose 2.5 mg per 100 g body weight for the duration of 3 weeks. Beginning

from the 22-day of the experiment the animals of the fourth group for the duration of a month received a biologically active additive in a dose that provides the daily requirement of iodine in rats, while the animals of the third group were on the standard diet of the vivarium. The activity of superoxide dismutase and glutathione peroxidase was determined using a set of reagents «RANSOD Randox» manufactured by «Laboratories Ltd.», the catalase activity was determined by the method of M.A. Korolyuk. **Results.** Experimental hypothyroidism in rats was characterized by a decrease in the concentrations of free thyroxine, an increase in the content of total triiodothyronine and thyroid-stimulating hormone. In animals treated with tiamazol, the superoxide dismutase activity was 85.6% of the activity level of the control animals, glutathione activity – 77.3% of the level of intact animals. The catalase activity in hypothyroidism decreased significantly – down to 40% of the control level ($p < 0.001$). In the liver homogenate of rats, treated for 1 month with «iodine biopolymer» after hypothyroidism induction, the superoxide dismutase activity almost reached the control values and accounted for 95.5% of the activity of intact animals. The activity of glutathione peroxidase and catalase, was even slightly higher than the control values, reaching 115.6 and 112.7% of levels of activity in the control group, respectively ($p < 0.05$). At the same time in the animals, which were on a standard diet, the activity of the studied enzymes remained below the control values, with the catalase activity – significantly lower (49.9% of the control, $p < 0.001$). **Conclusion.** The introduction of an iodine-containing biologically active compound on the background of hypothyroidism made it possible to restore the activity of thyroid-dependant antioxidant enzymes, to normalize the functional state of the pituitary-thyroid system and to inhibit the processes of lipid peroxidation in the liver of the animals. **Keywords:** experimental hypothyroidism, thyroid hormones, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase, chemiluminescence, iodinated polysaccharide complex.

В настоящее время в литературе встречаются лишь единичные указания на изменения антиоксидантного статуса организма при заболеваниях щитовидной железы. Существующие данные о вовлечении тиреоидных гормонов в процессы регуляции свободнорадикального окисления (СРО) весьма противоречивы [6]. Антиокислительная активность тироксина (T_4), не уступающая активности α -токоферола и превосходящая антиоксидантную активность кортизола и эстрогенов, отмечена в микросомах и митохондриях. Антиоксидантную активность тиреоидных гормонов связывают с наличием в их структуре фенольного фрагмента [1]. Показано, что T_4 в концентрации 10^{-7} М ингибирует развитие хемилюминесценции, вызванной действием свободных радикалов в суспензии митохондрий печени крыс, причём антиоксидантная активность гормона на 1-2 порядка превышает действие эстрогенных стероидных гормонов [3].

Увеличение концентрации активных форм кислорода и продуктов перекисного окисления липидов, белков и других соединений вносит вклад в клиническую картину как гипо-, так и гипертиреоза [4, 9]. По одним источникам, интенсификация СРО при гипотиреозе сопровождается активацией, а по другим – ингибированием ферментов антиоксидантной защиты [7]. Большой интерес представляет изучение биологически активных веществ, обладающих антиоксидантным действием и способных активировать антиоксидантную систему организма [6].

Целью настоящего исследования стало определение активности антиокислительных ферментов (супероксиддисмутазы, каталазы и глутатионпероксидазы) в ткани печени (одной из главных мишеней тиреоидных гормонов) на фоне тиамазолового гипотиреоза, а также после его коррекции йодосодержащим органоминеральным комплексом. Анализируемая биологически активная добавка содержит йод в органической связи с полисахаридами растительного генеза, в частности с пектином, в соответствии с формулой изобретения по патенту №2265377 «Биологически активная добавка к пище для профилактики йодной недостаточности и спо-

соб её получения» [5]. Йодосодержащее органоминеральное соединение имеет следующий химический состав: пектин – 23,1–25,0 мас. %; йод кристаллический (I_2) – 5,0–10,25 мас. %; йодид калия (KI) – 10,0–20,5 мас. %; вода дистиллированная – остальное.

Исследования проводили на крысах-самцах массой 180–220 г. Животные были разделены на четыре группы: первая – контрольная, у животных второй, третьей и четвёртой групп вызывали гипотиреоз ежедневным внутрижелудочным введением тиамазола в дозе 2,5 мг на 100 г массы тела в течение 3 нед. После воспроизведения модели гипотиреоза, начиная с 22-го дня эксперимента, животные четвёртой группы в течение 30 дней получали йодосодержащую биологически активную добавку в дозе, обеспечивающей суточную потребность крыс в йоде (от 2 до 3 мкг на 100 г массы тела), животные третьей группы находились на стандартной диете вивария. Крыс второй группы забивали на 22-е сутки эксперимента с целью оценки функционального состояния тиреоидной системы, активности антиоксидантных ферментов и интенсивности процессов СРО в печени при гипотиреозе. Забой осуществляли декапитацией под эфирным наркозом. Гомогенат печени готовили в фосфатном буфере ($pH=7,45$) с помощью механического гомогенизатора Поттера (тефлон-стекло). Для удаления частично разрушенных клеток и ядер гомогенаты центрифугировали 10 мин при 1000 g. Все процедуры по приготовлению гомогената и выделению субклеточных фракций проводили при температуре от 0 до +4 °C.

Активности супероксиддисмутазы (КФ 1.15.1.1) и глутатионпероксидазы (КФ 1.11.1.9) оценивали с помощью реактивов набора «RANSOD Randox» фирмы «Laboratories Ltd.». Активность каталазы оценивали по методу М.А. Королюк, основанному на определении не разрушенного каталазой пероксида водорода в реакции с молибдатом при 410 нм. Белок в субклеточных фракциях определяли по Лоури. Статистическую обработку результатов производили, рассчитывая среднее арифметическое значение, стандартные отклонения и ошибки средних по группам животных.

Активность ферментов антиоксидантной системы печени крыс с экспериментальным гипотиреозом и после его коррекции йодосодержащим органоминеральным комплексом ($M \pm m$, $n=12$)

Активность ферментов	Группа животных	Первая, контроль	Вторая, экспериментальный гипотиреоз	Третья, экспериментальный гипотиреоз + стандартная диета	Четвёртая, экспериментальный гипотиреоз + «Йодбиополимер»
			22-е сутки от начала эксперимента	30-е сутки после воспроизведения гипотиреоза	
Супероксиддисмутаза, ЕД/мг белка;		21,73 $\pm$ 1,16	18,60 $\pm$ 2,23	19,43 $\pm$ 2,56	20,75 $\pm$ 1,22
в % к контролю		—	85,6	89,4	95,5 (106,8)*
Глутатионпероксидаза, ЕД/мг белка;		655,33 $\pm$ 53,59	506,28 $\pm$ 61,48	545,68 $\pm$ 39,55	757,84 $\pm$ 51,72*
в % к контролю		—	77,3	83,3	115,6 (138,9)*
Каталаза, мкмоль/г белка;		3150,62 $\pm$ 78,55	1269,65 $\pm$ 198,48**	1573,3 $\pm$ 38,81**	3551,42 $\pm$ 128,31* **
в % к контролю		—	40,3	49,9	112,7 (135,7)*

Примечания: *в скобках указан процент от активности в третьей группе; *различие с третьей группой статистически значимо ($p \leq 0,01$); *различие с контролем статистически значимо ($p \leq 0,05$); **различие с контролем статистически значимо ($p \leq 0,001$); **различие с третьей группой статистически значимо ($p \leq 0,001$).

Достоверность различий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

С целью определения функционального состояния щитовидной железы в сыворотке крови подопытных крыс определяли уровень гормонов щитовидной железы — свободного T_4 , общего $3,5,3'$ -трийодтиронина (T_3) и тиреотропного гормона (ТТГ) — методом иммуноферментного анализа с использованием стандартных тест-систем: «ТиройдИФА-свободный T_4 », «ТиройдИФА-трийодтиронин-01», «ТиройдИФА-ТТГ-1» (ЗАО «Алкор Био», Россия) с помощью иммуноферментного автоматического анализатора «УНИПЛАН» (Россия).

Изучение процессов СРО в гомогенатах печени крыс проводили на хемилюминометре ХЛ-003, предназначенном для автоматизированного измерения и регистрации спонтанного индуцированного свечения (хемилюминесценции), сопровождающего процессы СРО. Гомогенаты готовили в фосфатном буфере ($pH=7,45$) с помощью механического гомогенизатора Поттера (тефлон-стекло).

Используемая схема введения тиреостатика вызывала сдвиги, которые можно охарактеризовать как начальную стадию тиреоидной недостаточности. У крыс, получавших тиамазол (животные второй, третьей и четвёртой групп), отмечено выраженное снижение концентрации свободной формы основного тиреоидного гормона — T_4 ($4,33 \pm 0,29$ пмоль/л против $10,48 \pm 0,69$ пмоль/л в контроле, $p < 0,001$). В то же время содержание общего T_3 несколько повышалось ($2,61 \pm 0,19$ нмоль/л при концентрации в контроле $2,30 \pm 0,14$ нмоль/л), что можно считать компенсаторной реакцией, осуществляемой за счёт стиму-

ляции щитовидной железы ТТГ, количество которого также повышалось ($0,035 \pm 0,005$ мкМЕ/мл при $0,022 \pm 0,003$ мкМЕ/мл у интактных животных, $p < 0,05$), а также активации периферического дейодирования T_4 .

Обнаруженные сдвиги не могут не сказаться на тиреоидзависимых звеньях метаболизма в тканях-мишенях тиреоидных гормонов. Исследование активности основных антиоксидантных ферментов в гомогенате печени крыс, получавших тиамазол, представлены в табл. 1. Наименьшим изменениям подверглась активность супероксиддисмутазы. В гомогенате печени животных, получавших тиамазол, активность данного фермента составляла 85,6% уровня активности аналогичного показателя у животных контрольной группы. Активность глутатионпероксидазы в печени гипотиреоидных животных составила 77,3% уровня интактных животных. Полученные результаты согласуются с данными других авторов, также обнаруживших снижение активности антиоксидантных ферментов при гипотиреозе [2].

Активность гемсодержащего фермента каталазы в использованной модели гипотиреоза снижалась значительно и статистически достоверно — до 40% уровня контроля ($p < 0,001$). Возможно, столь существенное снижение активности каталазы обусловлено своеобразным двойным тиреоидным влиянием на концентрацию как апофермента, так и кофермента, поскольку индукцию δ -аминолевулинатсинтетазы, лимитирующей скорость биосинтеза гема, считают одним из специфических эффектов тиреоидных гормонов [8].

Закономерное следствие снижения активности антиоксидантных ферментов — активация

процессов СРО, что подтверждается обнаруженным увеличением светосуммы хемилюминесценции гомогенатов печени крыс, получавших тиамазол. Так, если показатель светосуммы свечения у интактных крыс составил $14,90 \pm 0,63$ у.е., то у крыс, получавших тиреостатик, — $26,48 \pm 0,99$ у.е. ($p \leq 0,001$).

Использованная модель тиамазолового гипотиреоза сопровождалась снижением активности ферментов антиоксидантной защиты, что является ведущим фактором, приводящим к интенсификации процессов СРО при гипотиреозе. Избыточным образованием активных форм кислорода, в частности супероксидного аниона, вероятно, обусловлен высокий по сравнению с другими исследованными ферментами уровень активности супероксиддисмутазы. Показано, что существенное значение в регуляции активности этого фермента играет концентрация супероксидного аниона, активирующего и индуцирующего фермент [4]. Наряду с выявленными изменениями суммарной внутриклеточной активности супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы в дальнейшем целесообразным представляется предпринять изучение реакции на гипотиреоз их цитоплазматических и митохондриальных изоферментов, поскольку они могут отличаться степенью тиреоидной чувствительности.

Следующим этапом стало исследование эффективности йодированного полисахаридного комплекса в коррекции обнаруженных сдвигов. У животных четвертой группы, которые после 3-недельного введения тиреостатика в течение 1 мес получали органоминеральный комплекс, концентрация ТТГ составила $0,006 \pm 0,001$ мкМЕ/мл, свободного T_4 — $24,05 \pm 0,60$ пмоль/л против $0,022 \pm 0,003$ мкМЕ/мл и $10,48 \pm 0,69$ пмоль/л соответственно в контроле ($p \leq 0,001$), что свидетельствует о стимулирующем воздействии исследуемого соединения на функциональную активность щитовидной железы. Введение гипотиреоидным животным «Йодбиополимера» способствовало также восстановлению активности антиоксидантных ферментов. Так, в гомогенате печени крыс, прошедших после воспроизведения гипотиреоза месячный курс терапии йодосодержащим полисахаридным комплексом (четвертая группа), активность супероксиддисмутазы почти достигала контрольных значений и составляла 95,5% активности интактных животных. Активность глутатионпероксидазы и каталазы даже несколько превышала контрольные значения, достигая соответственно 115,6% ($p \leq 0,05$) и 112,7% уровня активности в контроле. В то же время у животных, находившихся на стандартном рационе (третья группа), через 1 мес после отмены тиамазола активность исследованных ферментов оставалась ниже контрольных значений, причём каталазы — значительно ниже (49,9% контроля, $p \leq 0,001$).

Методом хемилюминесцентного анализа было установлено корригирующее влияние «Йодбиополимера» на функциональное состояние системы окислительного гомеостаза в печени.

Светосумма хемилюминесценции у крыс четвертой группы снижалась до $16,11 \pm 0,52$ у.е. против $26,48 \pm 0,99$ у.е. (вторая группа) ($p \leq 0,001$). Аналогичный показатель у животных третьей группы составил $22,62 \pm 0,84$ у.е. ($p \leq 0,01$).

ВЫВОДЫ

1. Использованная модель тиамазолового гипотиреоза (3-недельное введение тиреостатика в дозе 2,5 мг на 100 г массы тела) сопровождалась снижением в ткани печени крыс активности антиоксидантных ферментов супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы, а также особенно выраженным снижением активности гемсодержащего фермента каталазы. Обнаруженные сдвиги позволяют отнести ферменты антиоксидантной системы к тиреоидзависимым звеньям метаболизма.

2. Введение на фоне гипотиреоза йодосодержащего органоминерального комплекса способствует восстановлению активности антиоксидантных ферментов, нормализации скорости и интенсивности реакций СРО в щитовидной железе, что свидетельствует об эффективности исследуемого «Йодбиополимера» в коррекции метаболических нарушений при гипотиреозе и указывает на целесообразность дальнейшего изучения его тиреотропных свойств.

ЛИТЕРАТУРА

1. Антелава Н.А., Саникидзе Т.В., Антелава А.В., Шубладзе И.Ш. Нарушение окислительного метаболизма при экспериментальном гипотиреозе у кроликов // Мед. новост. Груз. — 2001. — №4. — С. 7–9.
2. Горбань Е.Н., Небожжина М.В., Топольникова Н.В. Реакция щитовидной железы и системы свободнорадикального окисления у взрослых и старых крыс с гипотиреозом на действие ионизирующего облучения // Вестн. гиг. эпидем. — 2001. — Т. 5, №1. — С. 83–86.
3. Дижее Г.П., Дятлов Р.В., Дижее А.А. и др. Тиреоидные гормоны и мелатонин как средства антиоксидантной терапии // Анастез. реаним. — 2001. — №4. — С. 43–46.
4. Коган А.Х., Грачёв С.В., Елисеева С.В. Модулирующая роль CO_2 в действии активных форм кислорода. — М.: ГЭОТАР-Медиа. — 2006. — 224 с.
5. Мамцев А.Н., Бондарева И.А., Козлов В.Н. и др. Пат. RU 2265377 C1 A 23 L 1/30, 1/304. Биологически активная добавка к пище для профилактики йодной недостаточности и способ её получения // Бюлл. открыт. изобрет. — 2005. — №34.
6. Попов С.С., Пашков А.Н., Попова Т.Н. и др. Влияние мелатонина на свободнорадикальный гомеостаз в тканях крыс при тиреотоксикозе // Биомед. хим. — 2008. — Т. 54, №1. — С. 114–120.
7. Тапбергенев С.О., Тапбергенев Т.С., Прозор И.И., Олжаева Р.Р. Сравнительная оценка влияния радиации, гипотиреоза и ртутной интоксикации на активность ферментов обмена пуриновых нуклеотидов, антиоксидантной системы и иммунный статус // Успех. соврем. естествозн. — 2009. — №6. — С. 39–44.
8. Тертугова О.В. Эндокринологические аспекты проблемы пищевых дисэлементозов и других пищевых дисбалансов: Учебное пособие. — Ярославль: Александр Рутман, 2001. — С. 37–38.
9. Хавинсон В.Х., Баринев В.А., Арутюнян А.В., Малинин В.В. Свободнорадикальное окисление и старение. — СПб.: Наука, 2003. — 327 с.