



АКТИВНОСТЬ NAD- И NADP-ЗАВИСИМЫХ ДЕГИДРОГЕНАЗ В ЛИМФОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ БОЛЕЗНИ ГРЕЙВСА

© М.А. Дудина^{1,2}, А.А. Савченко³, С.А. Догадин^{1,2}, И.И. Гвоздев³

¹Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого, Красноярск, Россия

²Краевая клиническая больница, Красноярск, Россия

³Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», обособленное подразделение «НИИ медицинских проблем Севера», Красноярск, Россия

ОБОСНОВАНИЕ. Регулирующее действие тиреоидных гормонов на метаболизм клеток иммунной системы (активация окислительных процессов, разобщение окислительного фосфорилирования и усиление синтеза белка) зависит от их количества. Изменение активности внутриклеточных ферментов лимфоцитов при болезни Грейвса может нарушать регуляцию клеточного гомеостаза и предопределять механизмы поддержания аутоиммунного воспаления при рецидивирующем течении заболевания. Точная роль и место NAD(P)-зависимых дегидрогеназ в развитии и поддержании иммунной реакции при болезни Грейвса остаются недостаточно исследованными.

ЦЕЛЬ — изучить активность NAD- и NAD(P)-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах периферической крови у больных в дебюте и при рецидиве болезни Грейвса для уточнения механизмов развития и прогрессирования аутоиммунного процесса.

МЕТОДЫ. Проведено одноцентровое когортное проспективное сплошное наблюдательное открытое контролируемое исследование с оценкой активности NAD(P)-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах периферической крови у 151 женщины, средний возраст $43,36 \pm 11,06$ года, с верифицированным диагнозом болезни Грейвса и клинической картиной тиреотоксикоза, из них у 64 (42,38%) с впервые выявленной болезнью Грейвса и 87 (57,61%) — с рецидивирующим течением заболевания. Все пациентки находились под динамическим наблюдением в эндокринологическом центре КГБУЗ «Краевая клиническая больница» с 2016 по 2019 г. Методом биolumинесценции определялся уровень NAD(P)-зависимых дегидрогеназ. Контрольную группу составили 75 здоровых лиц. Активность внутриклеточных ферментов лимфоцитов характеризовалась в зависимости от клинического варианта течения заболевания.

РЕЗУЛЬТАТЫ. У больных с впервые выявленной болезнью Грейвса относительно контрольных значений и уровней, выявленных у больных с рецидивирующим течением заболевания, повышается активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ) и снижается — NADH-зависимой лактатдегидрогеназы. При рецидивирующем течении болезни Грейвса относительно контрольного диапазона в лимфоцитах крови снижается активность лактатдегидрогеназы и NAD(P)-зависимой изоцитратдегидрогеназы. В этой же группе больных относительно значений, установленных у пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса, понижается активность глицерол-3-фосфатдегидрогеназы (Г3ФДГ) и NADH-зависимой глутаматдегидрогеназы. У больных с впервые выявленной болезнью Грейвса выявляются две положительные связи: между уровнем свТ3 и активностью малатдегидрогеназы ($r=0,90$, $p=0,037$) и между уровнем свТ4 и активностью NAD(P)-зависимой изоцитратдегидрогеназы ($r=0,82$, $p=0,007$). У больных с рецидивом болезни Грейвса выявляются положительные взаимосвязи концентрации тиреотропного гормона с активностью лактатдегидрогеназы ($r=0,73$, $p=0,039$) и малатдегидрогеназы ($r=0,93$, $p=0,002$), а также в паре свТ4 и NAD-зависимой глутаматдегидрогеназы ($r=0,70$, $p=0,036$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Установленные отличия активности NAD(P)-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах периферической крови у больных в дебюте и при рецидиве болезни Грейвса могут отражать в первом случае реакцию клеток иммунной системы на функционально-регуляторный сигнал при развитии гипертиреоза, а во втором случае — адаптационные изменения при прогрессировании аутоиммунного процесса.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: болезнь Грейвса, иммунопатогенез, тиреостатическая терапия, лимфоциты, внутриклеточный метаболизм, NAD- и NAD(P)-зависимые дегидрогеназы.

THE ACTIVITY OF NAD- AND NAD(P)-DEPENDENT DEHYDROGENASES IN LYMPHOCYTES OF PERIPHERAL BLOOD IN GRAVES' DISEASE

© Margarita A. Dudina^{1,2}, Andrey A. Savchenko³, Sergey A. Dogadin^{1,2}, Ivan I. Gvozdev³

¹Krasnoyarsk State Medical University named after prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russia

²Krasnoyarsk Regional Clinical Hospital, Krasnoyarsk, Russia

³Institute for Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russia

BACKGROUND: The regulatory effect of thyroid hormones on the metabolism of the immune system cells (activation of oxidative processes, separation of oxidative phosphorylation and increased protein synthesis) depends on their number. Changes in the activity of intracellular enzymes in Graves' disease (GD) can determine the mechanisms of maintaining autoimmune inflammation in relapse of the disease. The exact role of NAD(P)-dependent dehydrogenases in the development and maintenance of immune response in GD is still poorly investigated.

AIMS: To study the activity of NAD(P)-dependent dehydrogenases in lymphocytes of peripheral blood in patients with manifestation and relapse of GD to clarify the mechanisms of development and progression of the autoimmune process.

METHODS: A single-center, cohort, prospective, continuous, observational, open-label, controlled trial was conducted to evaluate the lymphocytes NAD(P)-dependent activity in 151 women with GD and hyperthyroidism, mean age 40.7 ± 13.2 , 52 (37.14%), who were on follow-up at the endocrinology center of Krasnoyarsk Regional clinical hospital from 2016 to 2019. The NAD(P)-dependent dehydrogenases activity measured using biochemiluminescence method.

RESULTS: In patients with newly diagnosed of GD, relative to the control values and levels detected in relapse group we observe the increase of G6PDH and decrease of NADH-LDH. In GD relapse group compare to the control range in blood lymphocytes decreases the activity of LDH and NAD(P)-ICDH. In patients with newly diagnosed GD, two positive correlation were found: between fT3 level and MDG activity ($r=0.90$, $p=0.037$), and between fT4 level and NAD(P)-ICDH activity ($r=0.82$, $p=0.007$). In patients with relapse of GD positive relationships between the concentration of TSH and the activity of LDH ($r=0.73$, $p=0.039$), and MDH ($r=0.93$, $p=0.002$), as well as in a pair of fT4 and NADGDH ($r=0.70$, $p=0.036$) were revealed.

CONCLUSION: The established differences in the activity of NAD(P)-dependent dehydrogenases in peripheral blood lymphocytes in patients with manifestation and relapse of GD can reflect in the first case the response of immune cells to a functional-regulatory signal with the development of hyperthyroidism, and in the second case, adaptive changes with the progression of autoimmune process.

KEYWORDS: Graves' disease, immunopathogenesis, thyrostatic therapy, lymphocytes, intracellular metabolism, NAD - and NAD(P)-dependent dehydrogenases.

ОБОСНОВАНИЕ

Болезнь Грейвса является аутоиммунным заболеванием щитовидной железы, в основе которого лежит образование иммуноглобулинов класса G (TRAb), которые связываются и стимулируют рецептор тиреотропного гормона. Механизмы стимуляции иммунной системы при развитии гипертиреоза аутоиммунного генеза на фоне манифестации болезни Грейвса до сих пор изучены не полностью, но считается, что они носят мультифакторный генез с воздействием как эндогенных, так и экзогенных факторов у генетически предрасположенных индивидуумов [1]. Доказано влияние тиреоидных гормонов и тиреотропного гормона на клетки иммунной системы лимфоидного ряда через их специфические мембранные и ядерные рецепторы [2, 3]. Внутрядерный механизм действия тиреоидных гормонов основан на их способности изменять экспрессию ряда генов, которые определяют различные биохимические процессы и клеточные функции, включая глюконеогенез, липогенез, проведение внутриклеточных сигналов, пролиферацию и апоптоз [4]. Негеномные эффекты тиреоидных гормонов осуществляются без участия ядерных рецепторов и включают транспорт аминокислот, глюкозы, катионов через плазматическую мембрану клетки; презентацию на клеточной поверхности молекул, принимающих участие в метаболизме и ключевых биохимических процессах, протекающих в цитоплазме [1, 4]. В целом воздействие тиреоидных гормонов стимулирует функцию лимфоцитов, в том числе и при реализации аутоиммунных процессов. Известно, что тиреоидные гормоны активируют аэробное дыхание и внутриклеточный белковый обмен, а также разобщают процесс окислительного фосфорилирования [2, 5]. Учитывая неоднозначность воз-

действия тиреоидных гормонов на клетки иммунной системы, изменение внутриклеточного метаболизма при болезни Грейвса может предопределять механизмы поддержания аутоиммунного процесса, колебания от гипер- к гипотиреозу или развитие стойкого медикаментозного гипотиреоза в процессе тиреостатической терапии, а также спонтанных иммунологических ремиссий [1, 3]. По данным многих авторов, вероятность рецидива тиреотоксикоза при болезни Грейвса после отмены тиреостатических препаратов достигает 60–70% [1, 6, 7], в связи с чем наиболее важным является получение новых данных о механизмах развития и прогрессирования аутоиммунного процесса при болезни Грейвса, а также выявление клинико-иммунологических маркеров для мониторинга и прогнозирования длительной тиреостатической терапии. В качестве исследуемых показателей внутриклеточного обмена лимфоцитов выбраны уровни активности никотинамидадениндинуклеотид- (nicotinamide adenine dinucleotide, NAD) и никотинамидадениндинуклеотидфосфат-зависимых (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NAD(P)) дегидрогеназ в связи с тем, что данный класс ферментов осуществляет распределение субстратных потоков по основным метаболическим путям клеток, поддерживая энергетические и пластические процессы [2, 4]. Кроме того, известно, что активность некоторых дегидрогеназ находится под контролем тиреоидных гормонов [8]. Необходимо отметить, что изменение активности основных метаболических процессов (гликолиз, пентозофосфатный цикл, цикл трикарбоновых кислот и др.) в клетках определяется типом функционально-регуляторного сигнала и не зависит от популяционного и субпопуляционного состава лимфоцитов [9]. Это определяется тем, что изменение энергетических и пластических процессов является базовым

как в восприятии сигнала, так и в реализации функциональной активности клеток.

ЦЕЛЬ

Изучить активность NAD- и NAD(P)-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах периферической крови у больных в дебюте и при рецидиве болезни Грейвса для уточнения механизмов развития и прогрессирования аутоиммунного процесса.

МЕТОДЫ

Дизайн исследования

Проведено одноцентровое когортное проспективное сплошное наблюдательное открытое контролируемое исследование с участием пациентов с лабораторно подтвержденной болезнью Грейвса.

Критерии соответствия

Критерии включения. В исследование были включены женщины с впервые выявленной болезнью Грейвса и рецидивом заболевания, которые находились под динамическим наблюдением в эндокринологическом центре КГБУЗ «Краевая клиническая больница» с 2016 по 2019 г. Диагноз болезни Грейвса был выставлен на основании клинических, лабораторных и инструментальных данных [6]. Все пациенты были классифицированы по степени выраженности клинических проявлений и гормональных нарушений, соответствующих субклиническому, манифестному или осложненному тиреотоксикозу, а также положительному титру антител к рецептору тиреотропного гормона (референсный интервал $\leq 1,75$ МЕ/л). Рецидив болезни Грейвса подтверждался клинико-анамнестическими данными о достигнутом медикаментозном эутиреозе, подтвержденными нормальным уровнем тиреотропного гормона, свободного тироксина (свТ4) и свободного трийодтиронина (свТ3), продолжительностью не менее 2 мес в сочетании с возобновлением клинической картины тиреотоксикоза на фоне приема поддерживающей дозы тиреостатика.

Критерии не включения. В исследование не были включены пациенты мужского пола; женщины с узловым/многоузловым токсическим зобом, беременные или кормящие грудью в период проведения обследования; случаи сочетания болезни Грейвса с эндокринной офтальмопатией, рецидива болезни Грейвса после лечения радиоактивным йодом, а также пациенты с наличием на момент скрининга и обследования инфекционных и аллергических заболеваний, с диагностированными новообразованиями, системными заболеваниями соединительной ткани, другими эндокринопатиями, установленной гемоглобинопатией.

Критериями не включения в контрольную группу являлись беременность и период лактации, а также заболевания острыми респираторными вирусными инфекциями и введение профилактических прививок в течение 2 мес, предшествующих иммунологическому и гормональному анализу.

Критерии исключения. Отказ пациента от дальнейшего участия в исследовании (отказ от подписания информированного согласия).

Условия проведения

Все клинические, гормональные и инструментальные манипуляции были проведены на базе эндокринологического центра КГБУЗ «Краевая клиническая больница» (Красноярск). Биolumинесцентное определение NAD- и NAD(P)-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах осуществлялось в лаборатории молекулярно-клеточной физиологии и патологии ФГБНУ Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», обособленное подразделение НИИ медицинских проблем Севера (Красноярск).

Продолжительность исследования

Исследование проводилось с 2016 по 2019 гг. В исследовании использовалась медицинская документация (амбулаторные карты, форма № 025/у-04; истории болезни стационарного больного, форма № 003/у) пациентов с впервые выявленной или рецидивирующей болезнью Грейвса.

Описание медицинского вмешательства

Материалом для данного исследования являлась венозная кровь из локтевой вены, которую забирали между 8 и 9 ч утра натощак после предварительного голодания в течение не менее 8 и не более 12 ч. Выделение лимфоцитов производили центрифугированием в градиенте плотности фиколл-урографина ($\rho = 1,077$ г/см³) по методу А. Воуит (1968) в модификации Дж.Б. Натвига (1980). Количество выделенных лимфоцитов подсчитывали в камере Горяева. При контроле морфологического состава лейкоцитарных взвесей определялась чистота выхода лимфоцитов, которая составляла не менее 97%. Исследование активности NAD(P)-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах проведено с помощью биolumинесцентного анализа [10].

Исходы исследования

Основной исход исследования. Основной конечной точкой исследования было установление особенностей активности NAD- и NAD(P)-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах периферической крови в зависимости от клинических вариантов течения болезни Грейвса (впервые выявленная или рецидив).

Дополнительные исходы исследования. В рамках исследования был проанализирован метаболизм лимфоцитов у больных с рецидивирующим течением болезни Грейвса в аспекте длительного лечения тиреостатическими препаратами.

Методы регистрации исходов

С помощью биolumинесцентного анализа в лимфоцитах периферической крови определяли активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ), глицерол-3-фосфатдегидрогеназы (Г3ФДГ), NAD(P)-зависимой декарбоксилирующей малатдегидрогеназы, NAD- и NADH-зависимой реакции лактатдегидрогеназы, NAD- и NADH-зависимой реакции малатдегидрогеназы, NAD(P)- и NAD(P)H-зависимой глутаматдегидрогеназы, NAD- и NADH-зависимой глутаматдегидрогеназы, NAD- и NAD(P)-зависимых изоцитратдегидрогеназы и глутатионредуктазы. Активность исследуемых дегидрогеназ выражали в ферментатив-

ных единицах ($1E = 1$ мкмоль/мин на 10^4 клеток). Исследование проводили на ферментативном препарате NAD(P) — FMN оксидоредуктаза-люцифераза из *leognathi* (получен в Институте биофизики СО РАН, Красноярск). Измерение активности ферментов осуществляли на 36-канальном биохемилюминесцентном анализаторе «БЛМ-3607» («МедБиоТех», Россия). Определение содержания тиреоидных гормонов осуществлялось методом иммунорадиометрического анализа с помощью стандартных тест-наборов производства Immunotech a.s. (Чехия) для тиреотропного гормона (референсные показатели 0,17–4,05 мЕд/л), свТ4 (11,5–23,0 пмоль/л), свТ3 (2,0–5,7 пмоль/л). Уровень аутоантител к рецептору тиреотропного гормона (референсный интервал $\leq 1,75$ МЕ/л) оценивался иммуноферментным методом («Хема-Медика», Россия). Определение размеров, объема и структуры щитовидной железы проводилось на основании ультразвукового исследования на аппарате Aloka 3500 (Hitachi, Япония) с использованием линейного датчика с частотой 7,5 МГц. Объем щитовидной железы рассчитывался по формуле J. Brunn (1981): $[(L \cdot W \cdot T)_{\text{прав}} + (L \cdot W \cdot T)_{\text{лев}}] \cdot 0,479$, где L, W, T — длина, ширина и толщина (мм) правой и левой долей щитовидной железы; 0,479 — коэффициент эллипсоидности.

Анализ в подгруппах

В ходе исследования участники были разделены на две группы в зависимости от клинического варианта течения болезни Грейвса (впервые выявленная и рецидив). Определение активности NAD(P)-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах периферической крови у больных с впервые выявленной болезнью Грейвса было выполнено до начала медикаментозного лечения тиреостатическими препаратами.

Этическая экспертиза

Проведение исследования одобрено Локальным этическим комитетом КГБУЗ «Краевая клиническая больница» от 07 апреля 2016 г. (выписка из протокола № 124) и ФБОУ ВО «КрасГМУ» от 09 ноября 2016 г. (выписка из протокола № 72/2016).

Статистический анализ

Статистический анализ осуществляли в пакете прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., 2007). Описание выборки производили с помощью подсчета медианы (Me) и интерквартильного размаха в виде 1-го и 3-го квартилей ($Q_{25}-Q_{75}$), а также в виде среднего арифметического значения и стандартного отклонения от среднего ($M \pm SD$) в случае нормального распределения признака. Достоверность различий между показателями независимых выборок оценивали по непараметрическому критерию Манна–Уитни (Mann–Whitney U-test). Анализ связи признаков проводился с использованием коэффициента ранговой корреляции Спирмена (r). Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Объекты (участники) исследования

В исследование была включена 151 женщина с верифицированным диагнозом болезни Грейвса и клиническими симптомами тиреотоксикоза, средний возраст $43,36 \pm 11,06$ года, из них 64 (42,38%) — с впервые выявленной болезнью Грейвса и 87 (57,61%) — с рецидивом заболевания. Клинико-гормональная характеристика обследуемых лиц представлена в табл. 1. У 16 (10,59%) обследуемых пациентов диагностирован тиреотоксикоз, осложненный пароксизмальной формой фибрилляции предсердий.

Таблица 1. Клинико-гормональная характеристика больных болезнью Грейвса по группам, Me ($Q_{25}-Q_{75}$)

Показатели	Контроль n=75	Впервые выявленная болезнь Грейвса n=64	Рецидив болезни Грейвса n=87
	1	2	3
Возраст, лет ($M \pm SD$)	41,52±11,01	43,98±14,22	43,26±12,02
Тиреотропный гормон, мЕд/л	1,18 (0,85–1,61)	0,02 (0,002–0,21) $p=0,001$	0,09 (0,01–0,99) $p=0,001$
свТ4, пмоль/л	15,11 (13,76–15,58)	17,81 (12,53–36,77)	15,81 (10,81–27,11)
свТ3, пмоль/л	1,8 (1,49–2,18)	5,01 (3,83–6,81) $p=0,01$	5,91 (3,65–7,31) $p=0,01$
Антитела к рТТГ, МЕ/л	0,21 (0,0–0,49)	9,51 (5,07–29,11) $p=0,001$	10,31 (7,51–16,81) $p=0,001$
Объем щитовидной железы, мл	7,36 (6,01–9,12)	21,01 (18,72–40,91) $p=0,001$	32,34 (20,71–53,11) $p=0,001$

Примечание. p — статистически достоверные различия с контрольными величинами; свТ4 — свободный тироксин; свТ3 — свободный трийодтиронин; рТТГ — рецептор тиреотропного гормона.

На момент включения в исследование все пациенты с рецидивирующим течением заболевания получали медикаментозное лечение тиамазолом. Минимальная поддерживающая доза препарата при развитии симптоматики тиреотоксикоза и подтвержденного лабораторно рецидива болезни Грейвса — 5 мг, максимальная — 15 мг. Медиана продолжительности медикаментозного лечения в группе больных с рецидивом болезни Грейвса составила 9 (8–11) мес.

В качестве контроля обследовано 75 неродственных, практически здоровых женщин в возрасте от 18 до 50 лет, без отягощенного личного и семейного анамнеза по заболеваниям щитовидной железы, без нарушения функции и с отсутствием структурных изменений щи-

товидной железы при ультразвуковом исследовании на момент включения в исследование.

Основные результаты исследования

При исследовании активности NAD(P)-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах периферической крови у пациенток с болезнью Грейвса выявлены отличия как относительно контрольного диапазона, так и в зависимости от состояния манифестации или рецидива гипертиреоза аутоиммунного генеза. Установлено, что только у больных с впервые выявленной болезнью Грейвса относительно контрольных значений и уровней группы с рецидивом заболевания повышается активность Г6ФДГ и снижается — NADH-зависимой реакции лактатдегидрогеназы (табл. 2).

Таблица 2. Активность NAD- и NAD(P)-зависимых дегидрогеназ (мкЕ) в лимфоцитах крови у больных с впервые выявленной болезнью Грейвса и рецидивом заболевания, Me (Q_{25} – Q_{75})

Показатели	Контроль n=75		Впервые выявленная БГ n=64		Рецидив БГ n=87	
	1		2		3	
Г6ФДГ	4,93	(1,11–9,32)	19,39	(12,56–52,21)	3,15	(0,50–10,12)
	-		$p_1 < 0,001$		$p_2 < 0,001$	
ГЗФДГ	0,38	(0,02–1,96)	0,56	(0,08–2,42)	0,28	(0,01–0,91)
	-		-		$p_2 = 0,035$	
ЛДГ	36,78	(11,68–93,37)	17,31	(4,63–73,85)	9,44	(1,00–35,29)
	-		-		$p_1 = 0,028$	
NAD(P)-МДГ	2,71	(0,56–12,92)	7,49	(1,81–17,86)	3,71	(0,28–10,71)
NAD(P)-ГДГ	0,77	(0,14–3,33)	6,56	(1,11–17,22)	4,87	(1,53–14,16)
	-		$p_1 = 0,019$		$p_1 = 0,024$	
NAD(P)-ИЦДГ	23,60	(7,90–50,18)	19,82	(9,07–31,82)	9,02	(6,30–22,01)
	-		-		$p_1 = 0,043$	
МДГ	73,42	(20,45–128,34)	22,56	(11,47–51,46)	12,78	(2,02–20,65)
	-		$p_1 = 0,038$		$p_1 = 0,012$	
NAD-ГДГ	5,03	(0,18–15,15)	3,26	(0,11–22,75)	3,26	(0,12–4,81)
NAD-ИЦДГ	4,12	(0,68–13,98)	2,39	(0,65–13,60)	0,31	(0,01–1,81)
	-		-		$p_1 = 0,009$ $p_2 = 0,014$	
NADH-ЛДГ	56,86	(11,28–162,49)	14,01	(1,76–47,95)	59,37	(29,16–100,81)
	-		$p_1 = 0,037$		$p_2 = 0,046$	
NADH-МДГ	118,83	(32,37–278,51)	64,25	(40,21–70,01)	57,69	(16,76–88,46)
	-		$p_1 = 0,030$		$p_1 = 0,032$	
ГР	9,63	(2,01–33,15)	3,03	(0,33–16,75)	5,37	(1,15–16,28)
NADH-ГДГ	34,75	(2,12–104,82)	69,38	(36,13–78,92)	27,32	(12,90–69,63)
	-		-		$p_2 = 0,043$	
NAD(P)H-ГДГ	49,96	(23,32–126,59)	7,90	(3,02–13,25)	8,36	(3,62–29,18)
	-		$p_1 < 0,001$		$p_1 < 0,001$	

Примечание. p_1 — статистически достоверные различия с контрольными величинами; p_2 — статистически достоверные различия с показателями больных с впервые выявленной болезнью Грейвса; БГ — болезнь Грейвса; Г6ФДГ — глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа; ГЗФДГ — глицерол-3-фосфатдегидрогеназа; ЛДГ — лактатдегидрогеназа; NAD(P)-МДГ — NAD(P)-зависимая декарбоксилирующая малатдегидрогеназа; NAD(P)-ГДГ — NAD(P)-зависимая глутаматдегидрогеназа; NAD(P)-ИЦДГ — NAD(P)-зависимая изоцитратдегидрогеназа; NADH-ЛДГ — NADH-зависимая реакция лактатдегидрогеназы; NADH-МДГ — NADH-зависимая реакция малатдегидрогеназы; ГР — глутатионредуктаза; NADH-ГДГ — NADH-зависимая реакция глутаматдегидрогеназы; NAD(P)H-ГДГ — NAD(P)H-зависимая глутаматдегидрогеназа.

У больных с рецидивом болезни Грейвса в лимфоцитах периферической крови в 4 раза снижен уровень лактатдегидрогеназы и NAD(P)-зависимых изоцитратдегидрогеназ относительно показателей активности соответствующих ферментов в контрольной группе. При сравнительном анализе активности NAD(P)-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах крови у больных с впервые выявленной болезнью Грейвса и рецидивом заболевания было установлено, что только в случае рецидива болезни Грейвса понижается уровень активности ГЗФДГ и NADH-зависимой глутаматдегидрогеназы. При этом активность NAD-зависимых изоцитратдегидрогеназ в лимфоцитах крови у больных с рецидивом заболевания снижена как относительно контрольных значений, так и уровней, обнаруженных у пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса. Независимо от клинического варианта течения заболевания в лимфоцитах крови при болезни Грейвса понижается активность малатдегидрогеназы, NADH-зависимой реакции малатдегидрогеназы и NAD(P)H-зависимой глутаматдегидрогеназы, а также повышается активность NAD(P)-зависимой глутаматдегидрогеназы.

При проведении корреляционного анализа были установлены взаимосвязи между уровнями тиреоидных гормонов и показателями активности NAD(P)-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах крови. В контрольной группе данные взаимосвязи не прослеживались. У больных с впервые выявленной болезнью Грейвса выявлены две положительные корреляции: между уровнем свТ3 и показателем активности малатдегидрогеназы ($r=0,90$, $p=0,037$) и уровнем свТ4 и активностью NAD(P)-зависимой изоцитратдегидрогеназы ($r=0,82$, $p=0,007$). У больных с рецидивом болезни Грейвса выявляются положительные взаимосвязи концентрации тиреотропного гормона с активностью лактатдегидрогеназы ($r=0,73$, $p=0,039$) и малатдегидрогеназы ($r=0,93$, $p=0,002$), а также между уровнем свТ4 и активностью NAD-зависимой глутаматдегидрогеназы ($r=0,70$, $p=0,036$). Кроме того, в этой группе больных также выявляется сильная отрицательная связь сывороточной концентрации свТ4 с активностью ГЗФДГ ($r=-0,98$, $p<0,001$).

ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе данного сравнительного исследования было показано, что больные с впервые выявленной болезнью Грейвса и рецидивом заболевания на момент диагностики субклинического и манифестного гипертиреоза имеют сопоставимые изменения клинико-гормональных показателей, в том числе и по уровню антител к рецептору тиреотропного гормона. В настоящее время антитела к рецептору тиреотропного гормона являются единственным лабораторным маркером, которому отводится ведущая роль не только в патогенезе болезни Грейвса, но и в прогнозе ремиссии заболевания [1, 6, 7]. Однако в результате проведенного нами исследования было установлено, что уровень аутоантител к рецептору тиреотропного гормона в сыворотке крови больных с рецидивирующим течением заболевания оставался достоверно выше показателей здоровых лиц, несмотря на длительное консервативное лечение тионамидами. Полученные данные свидетельствуют о существовании

более значимых нарушений в системе иммунорегуляции при болезни Грейвса, отражающихся на внутриклеточном метаболизме клеток иммунной системы и, соответственно, готовности лимфоцитов вступать в реакции аутоиммунного ответа, поддерживая механизмы потери толерантности к аутоантигенам щитовидной железы, которые в свою очередь, определяют тяжесть клинического течения заболевания и развитие осложнений тиреотоксикоза.

Исследуемые NAD(P)-зависимые дегидрогеназы локализируются в основных метаболических путях и циклах, тем самым регулируют энергетические и пластические процессы в лимфоцитах. ГЗФДГ является ключевым и инициализирующим ферментом пентозофосфатного цикла, от активности которого зависит уровень синтеза нуклеиновых кислот и NAD(P)H [11]. В свою очередь, NAD(P)H используется во многих реакциях макромолекулярного синтеза и поддержания внутриклеточной антиоксидантной активности [12, 13]. Следовательно, у пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса в лимфоцитах крови повышается интенсивность пентозофосфатного цикла и, соответственно, реакций пластического обмена. Отток субстратов на пентозофосфатный цикл может привести к понижению интенсивности субстратного потока по гликолизу, что у больных с впервые выявленной болезнью Грейвса определяется в виде снижения активности NADH-зависимой реакции лактатдегидрогеназы. У больных с рецидивом болезни Грейвса уровни активности данных ферментов соответствуют контрольному диапазону. В то же время к особенностям метаболизма лимфоцитов у больных с рецидивирующим течением заболевания относится, в частности, понижение активности лактатдегидрогеназы. Активность аэробной реакции лактатдегидрогеназы определяет уровень синтеза пирувата, который может затем транспортироваться в митохондриальный компартмент, где он полностью окисляется в цикле трикарбоновых кислот в процессе аэробного дыхания клеток [2, 14]. В связи с этим у пациентов с рецидивом болезни Грейвса, во-первых, может возрастать уровень лактата, что приводит к изменению функциональной активности клеток [15], и, во-вторых, снижение активности аэробного дыхания также приведет к изменению реактивности лимфоцитов [4]. При этом ингибирование ГЗФДГ также вносит отрицательный вклад в поддержание интенсивности субстратного потока по гликолизу, так как данный фермент осуществляет перенос продуктов липидного катаболизма на окислительно-восстановительные реакции гликолиза [2]. Снижение интенсивности субстратного потока по циклу трикарбоновых кислот в лимфоцитах больных с рецидивом болезни Грейвса подтверждается понижением активности NAD-зависимой изоцитратдегидрогеназы — лимитирующего фермента цикла трикарбоновых кислот [2, 16]. При этом снижение активности NAD-зависимой изоцитратдегидрогеназы проявляется совместно с понижением активности NAD(P)-зависимой изоцитратдегидрогеназы — фермента, который частично локализуется в митохондриальном компартменте и поддерживает субстратный поток по циклу трикарбоновых кислот при ингибировании NAD-зависимых оксидоредуктазных реакций [2, 17]. Кроме того, к снижению субстратного потока по циклу трикарбоновых кислот в лимфоцитах больных

с рецидивом болезни Грейвса может привести и низкая активность NADH-зависимой глутаматдегидрогеназы. Данная ферментативная реакция осуществляет перенос продуктов аминокислотного обмена на реакции цикла трикарбоновых кислот [2].

Общим для двух обследованных групп пациентов с болезнью Грейвса было снижение активности малатдегидрогеназы и NADH-зависимой реакции малатдегидрогеназы, а также разнонаправленное изменение уровней активности NAD(P)- и NAD(P)H-зависимой глутаматдегидрогеназы. Понижение активности NAD- и NADH-зависимых реакций малатдегидрогеназы отражает снижение активности аэробного дыхания [2, 18]. Метаболическая значимость NAD(P)- и NAD(P)H-зависимых реакций глутаматдегидрогеназы определяется субстратным обменом между циклом трикарбоновых кислот и ферментативными процессами аминокислотного обмена. При этом ингибирование NAD(P)H- и повышение активности NAD(P)-зависимой глутаматдегидрогеназы (выявляемое в лимфоцитах при болезни Грейвса) направлено на сохранение интенсивности субстратного потока по циклу трикарбоновых кислот. Необходимо отметить, что имеются исследования, подтверждающие влияние внутриклеточного обмена глутамата на функциональную активность лимфоцитов [19].

Состояние метаболизма во многом определяет функциональную активность лимфоцитов, в том числе и в реализации аутоиммунных реакций при болезни Грейвса. В то же время сам внутриклеточный обмен лимфоцитов крови находится под гуморальным контролем. Отсутствие взаимосвязей между показателями тиреоидного статуса и активностью NAD(P)-зависимых дегидрогеназ у лиц контрольной группы определяется сбалансированностью внутриклеточных процессов и функционированием гипоталамо-гипофизарно-тиреоидной системы. При болезни Грейвса происходит смещение в направлении регуляторного влияния гормонов щитовидной железы, вследствие чего и появляются взаимосвязи между уровнями их концентрации и активностью внутриклеточных ферментов лимфоцитов. Так, у больных с впервые выявленной болезнью Грейвса выявляются только положительные связи тиреоидных гормонов с уровнями активности малатдегидрогеназы и NAD(P)-зависимой изоцитратдегидрогеназы, что характеризует стимуляцию преимущественно аэробного дыхания лимфоцитов крови у данной группы пациентов. У больных с ремиссией болезни Грейвса выявляются взаимосвязи уровня тиреотропного гормона с показателем активности NADH-зависимых реакций лактатдегидрогеназы и малатдегидрогеназы, а также свТ4 с активностью Г6ФДГ и NADH-зависимой глутаматдегидрогеназы.

Известно, что лимфоциты экспрессируют рецепторы к тиреотропному гормону, поэтому регуляторное влияние на их метаболизм может оказывать и сам тиреотропный гормон, но в то же время выделяют его опосредованное воздействие через гормоны щитовидной железы [19, 20]. Соответственно, у больных с рецидивом болезни Грейвса регуляторное влияние тиреотропного гормона на лимфоциты реализуется в индукции анаэробного гликолиза, что, по-видимому, и проявляется стимуляцией активности анаэробной реакции лактатдегидрогеназы у данной группы пациентов. В клинко-эксперименталь-

ной работе U. Czyzewska и соавт. [8] показано, что введение трийодтиронина (0,5 мг на кг массы тела ежедневно в течение 10 дней) крысам вызывает увеличение активности Г6ФДГ. Подобный эффект выявляется в группе больных с впервые выявленной болезнью Грейвса. Однако у больных с рецидивом болезни Грейвса обнаружена отрицательная взаимосвязь гормонов щитовидной железы с активностью Г6ФДГ при соответствии его уровня контрольному диапазону, что позволяет предположить нарушение механизмов тиреоидной регуляции метаболизма лимфоцитов. Положительная корреляция между уровнем свТ4 и активностью NADH-зависимой глутаматдегидрогеназы также подтверждает регуляторные нарушения, так как характеризует стимуляцию субстратного оттока с циклом трикарбоновых кислот на реакции аминокислотного обмена, что может привести к ингибированию процессов аэробного дыхания лимфоцитов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обследование пациентов с болезнью Грейвса проведено на фоне впервые выявленного заболевания и его рецидива. В обоих случаях охарактеризовано состояние метаболизма лимфоцитов при выраженной активации аутоиммунного процесса. Различие в двух вариантах течения болезни Грейвса заключается в том, что при впервые выявленной болезни Грейвса формируется «классический» органозависимый аутоиммунный процесс, а при рецидиве — вторично активированный процесс, достигнутый при медикаментозном лечении. Вероятно, что при сопоставимом титре аутоантител к рецептору тиреотропного гормона у больных с обоими вариантами течения болезни одного только их присутствия недостаточно для развития и поддержания персистирующих механизмов аутоиммунного воспаления. В то же время в зависимости от характера течения болезни Грейвса выявляются различия в состоянии метаболизма лимфоцитов и его тиреоидной регуляции. Например, такая особенность метаболизма лимфоцитов при впервые выявленной болезнью Грейвса, как повышение интенсивности пластического обмена за счет активации Г6ФДГ, обнаруживается только на фоне ингибирования анаэробного гликолиза. Регуляторное влияние повышенного уровня тиреоидных гормонов у данной группы больных направлено на стимуляцию субстратного потока по циклу трикарбоновых кислот. У больных с рецидивом болезни Грейвса метаболизм лимфоцитов характеризуется сохранением интенсивности пластических процессов и анаэробного гликолиза на уровне контрольного диапазона, но с более выраженной недостаточностью субстратного потока по циклу трикарбоновых кислот, чем у лиц с впервые выявленной болезнью Грейвса. В процессы гуморальной регуляции внутриклеточного обмена веществ при рецидиве болезни Грейвса, кроме тиреоидных гормонов, вовлечен и тиреотропный гормон, регуляторное влияние которого направлено на стимуляцию анаэробного гликолиза лимфоцитов. В то же время регуляторное влияние свТ4 на метаболизм лимфоцитов у больных с рецидивом болезни Грейвса нарушено и направлено на ингибирование пластических и аэробных процессов. Установленные отличия активности NAD(P)-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах периферической крови

у больных в дебюте и при рецидиве болезни Грейвса могут отражать в первом случае реакцию клеток иммунной системы на функционально-регуляторный сигнал при развитии гипертиреоза, а во втором — адаптационные изменения при прогрессировании аутоиммунного процесса.

Полученные данные могут служить основой для дальнейших иммунологических исследований с целью анализа взаимосвязи потери аутоотолерантности с функциональными и метаболическими характеристиками клеток иммунной системы при болезни Грейвса и их роли в прогнозе ремиссии при длительной тиреостатической терапии.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Согласие пациентов. Все исследования выполнены с информированного согласия испытуемых и в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения на-

учных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2013 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266. Пациенты добровольно подписали информированное согласие на публикацию персональной медицинской информации в обезличенной форме в журнале «Проблемы эндокринологии».

Источник финансирования. Исследование и подготовка статьи осуществлены на личные средства авторского коллектива.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Участие авторов. Концепция и дизайн исследования — С.А. Догадин, А.А. Савченко; сбор и обработка материала — М.А. Дудина, И.И. Гвоздев; биолюминесцентное исследование — И.И. Гвоздев; обсуждение и анализ результатов — М.А. Дудина, А.А. Савченко; статистическая обработка данных — А.А. Савченко; написание текста — М.А. Дудина; редактирование — А.А. Савченко, С.А. Догадин. Все авторы внесли значимый вклад в проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию статьи перед публикацией.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

- de Leo S, Lee SY, Braverman LE. Hyperthyroidism. *Lancet*. 2016;388(10047):906–918. doi: 10.1016/S0140-6736(16)00278-6.
- Чиркин А.А., Данченко Е.О. Биохимия. — М.: Медицинская литература, 2010. — 610 с. [Chirkin AA, Danchenko EO. *Biohimia*. Moscow: Medicinskaya literatura; 2010. 610 p. (In Russ).]
- Jara EL, Muñoz-Durango N, Llanos C, et al. Modulating the function of the immune system by thyroid hormones and thyrotropin. *Immunol Lett*. 2017;184:76–83. doi: 10.1016/j.imlet.2017.02.010.
- Alack K, Krüger K, Weiss A, et al. Aerobic endurance training status affects lymphocyte apoptosis sensitivity by induction of molecular genetic adaptations. *Brain Behav Immun*. 2019;75:251–257. doi: 10.1016/j.bbi.2018.10.001.
- Csaba G, Pállinger E. Thyrotropic hormone (TSH) regulation of triiodothyronine (T(3)) concentration in immune cells. *Inflamm Res*. 2009;58(3):151–154. doi: 10.1007/s00011-008-8076-8.
- Трошина Е.А., Свириденко Н.Ю., Ванушко В.Э., и др. Федеральные клинические рекомендации Российской ассоциации эндокринологов по диагностике и лечению токсического зоба // *Клиническая и экспериментальная тиреоидология*. — 2014. — Т.10. — №3. — С. 8–19. [Troshina EA, Sviridenko NY, Vanushko VE, et al. Russian Association of endocrinologists clinical practice guidelines for thyrotoxicosis diagnosis and treatment. *Clinical and experimental thyroidology*. 2014;10(3):8–19. (In Russ).] doi: 10.14341/ket201438-19.
- Liu L, Lu H, Liu Y, et al. Predicting relapse of Graves' disease following treatment with antithyroid drugs. *Exp Ther Med*. 2016;11(4):1453–1458. doi: 10.3892/etm.2016.3058.
- Czyzewska U, Tylicki A, Siemieniuk M, Strumilo S. Changes of activity and kinetics of certain liver and heart enzymes of hypothyroid and T(3)-treated rats. *J Physiol Biochem*. 2012;68(3):345–351. doi: 10.1007/s13105-012-0146-2.
- Arts RJ, Joosten LA, Netea MG. Immunometabolic circuits in trained immunity. *Semin Immunol*. 2016;28(5):425–430. doi: 10.1016/j.smim.2016.09.002.
- Савченко А.А. Определение активности NAD(P)-зависимых дегидрогеназ в нейтрофильных гранулоцитах биолюминесцентным методом // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. — 2015. — Т.159. — №5. — С. 656–660. [Savchenko AA. Evaluation of NAD(P)-dependent dehydrogenase activities in neutrophilic granulocytes by the bioluminescent method. *Bulletin of experimental biology and medicine*. 2015;159(5):656–660. (In Russ).]
- Peters AL, van Noorden CJ. Single cell cytochemistry illustrated by the demonstration of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in erythrocytes. *Methods Mol Biol*. 2017;1560:3–13. doi: 10.1007/978-1-4939-6788-9_1.
- Bolin AP, Guerra BA, Nascimento SJ, Otton R. Changes in lymphocyte oxidant/antioxidant parameters after carbonyl and antioxidant exposure. *Int Immunopharmacol*. 2012;14(4):690–697. doi: 10.1016/j.intimp.2012.10.003.
- Georgakouli K, Fatouros IG, Draganidis D, et al. Exercise in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: harmful or harmless? A narrative review. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019:8060193. doi: 10.1155/2019/8060193.
- Koukourakis MI, Giatromanolaki A. Warburg effect, lactate dehydrogenase, and radio/chemo-therapy efficacy. *Int J Radiat Biol*. 2019;95(4):408–426. doi: 10.1080/09553002.2018.1490041.
- Bedoyan JK, Hecht L, Zhang S, et al. A novel null mutation in the pyruvate dehydrogenase phosphatase catalytic subunit gene (PDP1) causing pyruvate dehydrogenase complex deficiency. *JIMD Rep*. 2019;48(1):26–35. doi: https://doi.org/10.1002/jmd2.12054.
- Laurenti G, Tennant DA. Isocitrate dehydrogenase (IDH), succinate dehydrogenase (SDH), fumarate hydratase (FH): three players for one phenotype in cancer? *Biochem Soc Trans*. 2016;44(4):1111–1116. doi: 10.1042/bst20160099.
- Pan JH, Tang J, Redding MC, et al. Hepatic transcriptomics reveals that lipogenesis is a key signaling pathway in isocitrate dehydrogenase 2 deficient mice. *Genes (Basel)*. 2019;10(9). pii: E728. doi: 10.3390/genes10090728.
- Eleftheriadis T, Pissas G, Antoniadis G, et al. Malate dehydrogenase-2 inhibitor LW6 promotes metabolic adaptations and reduces proliferation and apoptosis in activated human T-cells. *Exp Ther Med*. 2015;10(5):1959–1966. doi: 10.3892/etm.2015.2763.
- Navarro F, Bacurau AV, Pereira GB, et al. Moderate exercise increases the metabolism and immune function of lymphocytes in rats. *Eur J Appl Physiol*. 2013;113(5):1343–1352. doi: 10.1007/s00421-012-2554-y.
- Xu R, Huang F, Zhang S, et al. Thyroid function, body mass index, and metabolic risk markers in euthyroid adults: a cohort study. *BMC Endocr Disord*. 2019;19(1):58. doi: 10.1186/s12902-019-0383-2.

Рукопись получена: 13.02.2020. Одобрена к публикации: 11.04.2020. Опубликовано online: 26.04.2020.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ [AUTHORS INFO]

Дудина Маргарита Андреевна, к.м.н. [**Margarita A. Dudina**, MD, PhD]; адрес: 660022, Россия, Красноярск, ул. Партизана Железняка, д. 1 [address: 1 P. Zeleznyaka street, 660022 Krasnoyarsk, Russia]; e-mail: margo85_@bk.ru, SPIN-код: 4854-1926, ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-2776-927X>

Савченко Андрей Анатольевич, д.м.н., профессор [Andrey A. Savchenko, MD, PhD, Professor]; e-mail: aasavchenko@yandex.ru, SPIN-код: 3132-8260, ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-5829-672X>

Догadin Сергей Анатольевич, д.м.н., профессор [Sergey A. Dogadin, MD, PhD, Professor]; e-mail: sadogadin@gmail.com, SPIN-код: 4803-3756, ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-1709-466X>

Гвоздев Иван Игоревич [Ivan I. Gvozdev, MD]; e-mail: leshman-mult@mail.ru, SPIN-код: 6203-4651, ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-1041-9871>

ЦИТИРОВАТЬ:

Дудина М.А., Савченко А.А., Догadin С.А., Гвоздев И.И. Активность NAD- и NADP-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах периферической крови при болезни Грейвса // *Проблемы эндокринологии*. — 2020. — Т.66. — №2. — С. 33–41. doi: <https://doi.org/10.14341/probl12310>

TO CITE THIS ARTICLE:

Dudina MA, Savchenko AA, Dogadin SA, Gvozdev II. The Activity of NAD- and NAD(P)-Dependent Dehydrogenases in Lymphocytes of Peripheral Blood in Graves' Disease. *Problems of Endocrinology*. 2020;66(2):33–41. doi: <https://doi.org/10.14341/probl12310>