

## Особенности детоксикации с участием ферментов микросомального окисления и глутатионзависимых ферментов при псевдотуберкулезе у детей

*Жаворонок Т.В., Носарева О.Л., Помогаева А.П., Бутусова В.Н., Стариков Ю.В., Климанова Е.М., Петина Г.В., Степовая Е.А.*

## The detoxication peculiarities by microsomal oxidation enzymes and glutathione dependent enzymes under pseudotuberculosis at children

*Zhavoronok T.V., Nosareva O.L., Pomogayeva A.P., Butusova V.N., Starikov Yu.V., Klimanova Ye.M., Petina G.V., Stepovaya Ye.A.*

Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

© Жаворонок Т.В., Носарева О.Л., Помогаева А.П. и др.

Проведена комплексная оценка детоксикационной функции по антипириновому тесту и активности глутатионзависимых ферментов у детей, больных комбинированной формой псевдотуберкулеза средней степени тяжести с острым гладким течением. Поражение печени устанавливали по клиническим и биохимическим данным. Особенности биохимических процессов детоксикации, наблюдаемых при инфицировании *Yersinia pseudotuberculosis*, необходимо принимать во внимание, определяя прогноз заболевания.

**Ключевые слова:** псевдотуберкулез, токсины, острое воспаление, перекисное окисление липидов, цитохром P<sub>450</sub>, глутатионзависимые ферменты.

There was evaluated detoxication function state by the antipyrine test and glutathione dependent enzymes activity among the children with combined form of middle-degree pseudotuberculosis of sharp smooth tendency. Liver disorder was proven by the clinical and biochemical approaches. Our results show that it is desirable to allow detoxication biochemical processes peculiarities under *Yersinia pseudotuberculosis* infection while determining disease prognosis.

**Key words:** pseudotuberculosis, toxins, acute inflammation, lipid peroxidation, cytochrome P<sub>450</sub>, glutathione dependent enzymes.

УДК 616.9-002:577.15

### Введение

Псевдотуберкулез (ПТ) как острое инфекционное заболевание характеризуется токсикоаллергической и полиочаговой симптоматикой, возникающей под влиянием спектра токсинов, связанных с *Yersinia pseudotuberculosis*: цитотоксина, термолabileного и термостабильного токсинов, энтеротоксина, экзотоксина, факторов, нарушающих проницаемость сосудов кожи, — PF-раннего и PF-позднего [4, 9, 10, 13].

Метаболизм бактериальных токсинов в организме сопряжен с активацией микросомального окисления

на уровне семейства цитохромов P<sub>450</sub> и мобилизацией ферментов второй фазы биотрансформации ксенобиотиков, в частности, глутатион-S-трансфераз. Восстановленный глутатион (GSH) принимает участие в многочисленных жизненно важных клеточных функциях [14, 17], а конъюгация с ним токсинов и ксенобиотиков в большинстве случаев рассматривается как реакция детоксикации [5]. Дегградация таких конъюгатов, инициируемая  $\gamma$ -глутамилтранспептидазой, и дальнейший гидролиз производных цистеинилглицина до составляющих его аминокислот происходит на поверхности мембран клеток печени, почек [15]. По-

вреждающая мембрана, токсины *Yersinia pseudotuberculosis* нарушают эти процессы, а также непосредственно воздействуют на систему цитохромов P<sub>450</sub> [10], ингибируя активность монооксигеназ, поэтому исследование детоксикационного потенциала организма при ПТ приобретает особую актуальность.

Целью исследования было выяснение участия микросомального окисления и глутатиондеградирующих ферментов в механизмах детоксикации у детей при остром псевдотуберкулезном воспалении.

## Материал и методы

Обследовано 63 ребенка в возрасте от 5 до 15 лет, находившихся в стационаре с диагнозом ПТ средней степени тяжести с острым гладким течением. Диагноз был поставлен согласно классификации А.А. Колтыпина [3], верифицирован с помощью бактериологического анализа и реакции непрямой гемагглютинации (РНГА), диагностический титр 1:200. Всех детей этой группы обследовали в острую фазу ПТ и в период ранней реконвалесценции [12]. Группу сравнения составили 26 детей группы здоровья II-A, сопоставимых по возрасту. Показатели антипиринового теста (период полувыведения T<sub>1/2</sub>, общий клиренс Cl<sub>r</sub> препарата) в слюне рассчитывали по методу В.В. Brodie и соавт. (1949) [6], основанному на спектрофотометрической регистрации 4-нитрозантипирина при длине волны, равной 350 нм. Исследования компонентов системы глутатиона в эритроцитах проводили с использованием базовых реактивов фирмы «MP Biomedicals» (США); определяли активность глутатионзависимых ферментов [8]: глутатион-S-трансферазы (КФ 2.5.1.18) по скорости ферментативного преобразования 2,4-динитробензена, глутатионпероксидазы (КФ 1.11.1.9) по способности катализировать реакцию взаимодействия восстановленного глутатиона с гидроперекисью *m*-бутила, глутатионредуктазы (КФ 1.6.4.2) по зависимому от НАДФ Н-преобразованию окисленной формы глутатиона в восстановленную, содержание восстановленного глутатиона по способности кислоторастворимых тиоловых группировок взаимодействовать с 5,5'-дитио-бис(2-нитробензойной кислотой). Содержание белка в гемолизате эритроцитов определяли унифицированным биуретовым методом. В сыворотке крови определяли активность  $\gamma$ -глутамилтранспептидазы (КФ 2.3.2.2), аминотрансфераз (АсАТ (КФ 2.6.1.1) и АлАТ (КФ 2.6.1.2)),

5'-нуклеотидазы (КФ 3.1.3.5), содержание билирубина унифицированными методами. Полученные данные представлены в виде  $X \pm m$ , где  $X$  — среднее значение;  $m$  — ошибка среднего. Проверка полученных данных в группах на принадлежность к закону распределения Гаусса была осуществлена путем вычисления асимметрии  $As$  и эксцесса  $Es$ . Для проверки статистических гипотез о различии между исследуемыми группами использовали непараметрический критерий Манна—Уитни — для попарно не связанных и Вилкоксона — для попарно связанных выборок при их несоответствии нормальному распределению.

## Результаты и обсуждение

При клиническом обследовании у детей с разными нозологическими формами ПТ наряду с типичной симптоматикой (общей инфекционный синдром, катаральные явления, артралгии, экзантемы, диспепсический синдром, боли в животе — схваткообразные или тупые, болезненность при пальпации в илеоцекальном углу и т.д.) отмечались признаки гепато- и спленомегалии. Гепатомегалия, характеризующаяся превышением размеров печени от 1 до 4 см относительно возрастной нормы, выявлялась на 4—10-й день болезни у 78% больных. О повреждении мембран гепатоцитов и нарушении функции гепатобилиарной системы у детей в разгар ПТ свидетельствовало повышение в крови активности АлАТ в 1,5—3,0 раза (41% больных), 5'-нуклеотидазы — в 1,4—3,6 раза (99% больных), уровня общего билирубина — до 2,53 раза. Цитолиз сохранялся в течение 10—14 сут. Желтушное окрашивание кожи и склер держалось 5—7 сут (17% больных). Развитие токсического повреждения печени является особенностью формирования всех клинических форм ПТ у детей [11], что также отмечено ранее в исследованиях [1].

Повреждения структуры гепатоцитов сопровождалось изменением детоксикационного потенциала печени, сопряженного с активностью ферментов биотрансформации ксенобиотиков. Используя антипириновый тест, учитывали, что метаболизм препарата-анализатора осуществляется главным образом в печени и отчасти в почках гидрокселированием в 4-й позиции, окислением метильной группы в 3-й позиции, а также посредством N-деметиляции. Скорость протекания этих реакций зависит от активности цитохром P<sub>450</sub>-зависимых монооксигеназ, локализованных

в микросомальной фракции гепатоцитов [16]. В группе здоровых детей период полувыведения антипирина составил  $(4,79 \pm 0,25)$  ч, общий клиренс препарата —  $(5,40 \pm 0,61)$  мл/мин (табл. 1), что находится в пределах референтных значений. При псевдотуберкулезе  $T_{1/2}$  антипирина на пике заболевания был повышен в 3,38 раза, а Clг снижен в 3,70 раза по сравнению с группой здоровых детей. При клиническом выздоровлении пациентов регистрировался менее выраженный дисбаланс значений  $T_{1/2}$  и Clг — отличия от контрольных величин составили 1,80 и 1,73 раза соответственно. Следовательно, в период ранней реконвалесценции функциональное напряжение системы микросомального окисления было недостаточным для полной нейтрализации токсинов, обуславливающих проявления болезни.

Эндотоксины *Yersinia pseudotuberculosis* способны нарушать строение гладкого эндоплазматического ретикулума клеток печени и угнетать активность микросомальных ферментов, в частности, повреждать структуру цитохромов  $P_{450}$ , потенцируя их переход в неактивную форму  $P_{420}$  [10]. К тому же в центре псевдотуберкулезных гранул уменьшается количество функциональных клеток (гепатоцитов, нефроцитов), обеспечивающих работу микросомального звена системы детоксикации. *Yersinia pseudotuberculosis* и их токсины вызывают генерализованное воспаление с повреждением всех органов и тканей, а также способны снижать скорость кровотока, способствуя тканевой гипоксии и нарушению окислительного метаболизма

клеток с возникновением дисбаланса восстановленных форм НАДФ и НАД, необходимых для стабильной работы микросомальной гидроксидирующей системы.

Необходимо отметить, что метаболизм ксенобиотиков и токсинов в детском возрасте иной, чем у взрослых. Многие ферментные системы детоксикации созревают постепенно в процессе развития ребенка, что сказывается на течении болезней. Это касается системы микросомального окисления, в частности изоформ цитохрома  $P_{450}$ , а также ферментных систем глутатион-S-трансфераз, УДФ-глюкуронилтрансфераз печени, почек и др.

Активность глутатион-S-трансферазы эритроцитов детей в динамике ПТ изменялась согласованно с показателями антипиринового теста. На пике инфекционного процесса активность энзима была в 3,99 раза выше по сравнению со здоровыми детьми. Это могло быть вызвано экспрессией фермента в ответ на выброс токсинов псевдотуберкулезного микроба и образование токсичных продуктов перекисидации и липопероксидации клеточных структур (табл. 2). В стадию ранней реконвалесценции активность глутатион-S-трансферазы повышалась менее значительно — в 1,73 раза относительно контрольных величин — и была при этом в 2,30 раза ниже активности фермента в острый период псевдотуберкулеза. По-видимому, уровень экзогенных и эндогенных токсинов у детей оставался достаточно высоким и в стадию клинического выздоровления.

Т а б л и ц а 1

Показатели антипиринового теста в слюне и активность  $\gamma$ -глутамилтранспептидазы в сыворотке крови детей при псевдотуберкулезе ( $X \pm m$ )

Группа пациентов	Период полувыведения антипирина, ч	Общий клиренс антипирина, мл/мин	$\gamma$ -глутамилтранспептидаза, мккат/л
Здоровые дети (контроль)	$4,79 \pm 0,25$	$5,40 \pm 0,61$	$0,34 \pm 0,02$
Псевдотуберкулез (острый период)	$16,21 \pm 1,50$ $p_1 < 0,001$	$1,46 \pm 0,47$ $p_1 < 0,001$	$1,88 \pm 0,19$ $p_1 < 0,01$
Псевдотуберкулез (период ранней реконвалесценции)	$8,63 \pm 0,74$ $p_1 < 0,001; p_2 < 0,01$	$3,12 \pm 0,56$ $p_1 < 0,01; p_2 < 0,05$	$0,51 \pm 0,05$ $p_1 < 0,01; p_2 < 0,01$

Примечание. Здесь и в табл. 2:  $p_1$  — уровень значимости различий между группами, рассчитанный относительно контрольных величин;  $p_2$  — уровень значимости различий в группе, рассчитанный относительно данных острого периода болезни.

Т а б л и ц а 2

Содержание восстановленного глутатиона и активность глутатионзависимых ферментов в эритроцитах детей при псевдотуберкулезе ( $X \pm m$ )

Группа пациентов	Глутатион восстановленный, мкмоль/(мин · г)	Глутатион-пероксидаза, мкмоль/(мин · г)	Глутатион-редуктаза, мкмоль/(мин · г)	Глутатион-S-трансфераза, мкмоль/(мин · г)

Здоровые дети (контроль)	1,84 ± 0,09	0,62 ± 0,07	2,44 ± 0,25	1,80 ± 0,25
Псевдотуберкулез (острый период)	0,82 ± 0,06 $p_1 < 0,01$	0,41 ± 0,09 $p_1 < 0,05$	4,44 ± 0,21 $p_1 < 0,01$	7,18 ± 1,80 $p_1 < 0,01$
Псевдотуберкулез (период ранней реконвалесценции)	1,05 ± 0,07 $p_1 < 0,01$	0,88 ± 0,07 $p_1 < 0,01; p_2 < 0,01$	3,37 ± 0,33 $p_1 < 0,01; p_2 < 0,01$	3,12 ± 0,37 $p_1 < 0,01; p_2 < 0,01$

Глутатион-S-трансферазы функционируют на второй линии защиты клетки от экзогенных (микробные метаболиты, ксенобиотики и др.) и эндогенных (продукты перекисидации и др.) токсинов, нейтрализуя их посредством восстановления, присоединения к субстрату молекулы GSH или нуклеофильного замещения гидрофобных групп. Эти ферменты конъюгируют с глутатионом токсичные продукты перекисного окисления липидов (ноненилы, деценилы, холестерин- $\alpha$ -оксид), чем способствуют их выведению из организма. Преобладающее количество веществ при связывании с GSH образует соответствующие тиоэферы. Кроме того, семейство глутатион-S-трансфераз использует восстановленный глутатион для прямой регенерации липоперекисей в мембранах, снижая последствия окислительного стресса, неизбежно возникающего при остром воспалении [5].

Анализ полученных данных (см. табл. 2) указывает на активный расход восстановленного глутатиона в реакциях нейтрализации токсинов и утилизации продуктов перекисления в эритроцитах детей при ПТ. Концентрация GSH в клетках красной крови была сниженной на пике заболевания в 2,24 раза, в период ранней реконвалесценции — в 1,75 раза по сравнению с группой контроля, что сопровождало дисбаланс в работе глутатионзависимых ферментов на всех сроках исследования. Необходимо также отметить, что восстановленный глутатион интенсивно расходуется вследствие ряда окислительно-восстановительных реакций как поставщик SH-групп, защищающих клетку от ОН-радикала и других активных форм кислорода.

Используя GSH, глутатион-S-трансфераза способна в физиологических условиях восстанавливать гидропероксигруппы окисленных фосфолипидов непосредственно в мембранах без предварительного фосфолипазного гидролиза [2]. Известно, что продукты такого гидролиза — свободные жирные кислоты — ингибируют глутатион-S-трансферазу, а глутатионпероксидаза резистентна к их действию [7]. При остром инфекционном воспалении вследствие развития ацидоза, выхода ионов  $Ca^{2+}$  потенцируется активность фосфолипазы  $A_2$ , угнетающей способность глутатион-

S-трансферазы к детоксикации липопероксидов. Однако глутатион-S-трансфераза при этом интенсивно экспрессируется, и ее первоочередной задачей, вероятно, становится нейтрализация микробных токсинов, а основные антиоксидантные эффекты по нейтрализации продуктов перекисного окисления липидов в мембранах осуществляются глутатионпероксидазой. Действительно, вследствие большой нагрузки на глутатионпероксидазу в реакциях элиминации токсичных метаболитов перекисного окисления липидов на пике болезни активность фермента падала в 1,51 раза, однако в период ранней реконвалесценции его функциональные возможности стабилизировались, возрастая в 1,42 раза относительно контрольных величин.

Снижение уровня GSH, связанное с процессами детоксикации и антиоксидантной защиты, сопровождалось повышением активности  $\gamma$ -глутамилтранспептидазы (см. табл. 1). Активность фермента возрастала по сравнению со значениями группы здоровых детей в 5,53 раза на пике болезни, в 1,50 раза в период ранней реконвалесценции, стимулируя отщепление  $\gamma$ -глутамильного остатка и начало деградации глутатиона, его конъюгатов и их дальнейшую элиминацию. Наряду с этим повышение активности  $\gamma$ -глутамилтранспептидазы — дополнительное свидетельство повреждения ткани печени и гепатобилиарного тракта, поскольку рост активности данного фермента обычно сопровождается синдромами цитолиза, холестаза, процессы интоксикации организма.

Вследствие высокого расхода GSH при элиминации токсинов *Yersinia pseudotuberculosis* и нейтрализации проявлений окислительного стресса реципрокно увеличивалась активность глутатионредуктазы эритроцитов как в разгар заболевания, так и в период ранней реконвалесценции. Скорость НАДФ Н-зависимого процесса ферментативной регенерации GSH намного превосходит возможности синтеза глутатиона в тканях *de novo*, однако на пике болезни ее недостаточно для поддержания оптимальных концентраций этого трипептида.

## Заключение

Таким образом, при ПТ обнаружено нарушение процессов детоксикации на уровне ферментов микросомального окисления, более выраженное на пике болезни. В острую фазу инфекционного воспаления выявлено снижение концентрации GSH и функциональной активности глутатионпероксидазы при повышении активности глутатион-S-трансферазы и глутатионредуктазы. Токсины ПТ весьма агрессивны для организма, что требует в разгар инфекционного воспаления преимущественной активации компонентов системы глутатиона, обладающих детоксикационной направленностью. В период ранней реконвалесценции функциональная активность компонентов системы глутатиона ориентирована на элиминацию последствий окислительного стресса.

Изучение состояния системы глутатионзависимых ферментов может быть полезным при прогнозировании течения псевдотуберкулеза, поскольку отражает уровень процессов детоксикации в организме и стабилизации клеточных мембран.

#### Литература

1. Жаворонок Т.В., Носарева О.Л., Помогаева А.П., Климанова Е.М. Состояние микросомального окисления и окислительного метаболизма мембран у детей при псевдотуберкулезе // Сиб. журн. гастроэнтерологии и гепатологии. 2003. № 16—17. С. 191—194.
2. Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньщикова Е.Б. Окислительный стресс: Биохимический и патофизиологический аспекты. М.: Наука — Интерпериодика, 2001. 343 с.
3. Инфекционные болезни у детей / Под ред. проф. В.Н. Тимченко и проф. Л.В. Быстряковой. СПб.: Спецлит, 2001. 560 с.
4. Исачкова Л.М., Прокопенкова А.П., Плехова Н.Г., Горликова Р.П. К вопросу о биологическом действии эндотоксина *Yersinia pseudotuberculosis* // Журн. микробиологии. 1990. № 10. С. 7—11.
5. Колесниченко Л.С., Кулинский В.И. Глутатионтрансферазы // Успехи соврем. биологии. 1989. Т. 107. Вып. 2. С. 179—194.
6. Краковский М.Э., Аширметов А.Х. Методы оценки активности монооксигеназной ферментной системы // Лаб. дело. 1990. № 3. С. 130—133.
7. Ланкин В.З., Бондарь Т.Н., Тихазе А.К. Влияние свобод-

- ных жирных кислот на липопероксидазную активность антиоксидантных ферментов — Se-содержащей глутатионпероксидазы и неселеновой глутатион-S-трансферазы // Докл. АН СССР. 1997. Т. 357. Вып. 5. С. 828—831.
8. Медицинские лабораторные технологии / Под ред. А.И. Карпищенко. СПб., 1999. Т. 2. 656 с.
9. Недашкова Е.П., Алихацкая Г.Н., Тимченко Н.Ф. Изучение биохимических свойств и порообразующей активности термостабильного токсина *Yersinia pseudotuberculosis* // Инфекционная патология в Приморском крае. Владивосток, 1994. С. 16—17.
10. Разник С.Д. Характеристика биологического действия токсина *Yersinia pseudotuberculosis*: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Владивосток, 1999. 12 с.
11. Рудакова Р.И., Носкова Ф.В., Мордовец В.И. и др. Клинико-эпидемиологические особенности псевдотуберкулеза у детей // Острые инфекционные заболевания. Киров, 1994. С. 44—46.
12. Руководство по инфекционным болезням / Под ред. проф. В.Ф. Учайкина. М.: ГЭОТАР, Медицина, 1998. С. 621—630.
13. Carnoy C., Simonet M. *Yersinia pseudotuberculosis* superantigenic toxins // Bacterial protein toxins: a comprehensive sourcebook. London: Academic Press, 1999. P. 611—622.
14. Hayes J.D., McLellan L.I. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress // Free Rad. Res. 1999. V. 31. P. 273—300.
15. Kozak E.M., Tate S.S. Glutathione-degrading enzymes of microvillus membranes // J. Biol. Chem. 1982. V. 257. № 11. P. 6322—6327.
16. Parke D.V., Ioannides C., Lewis D.F.V. The role of the cytochromes P-450 in the detoxication and activation of drugs and other chemicals // Can. J. Physiol. and Pharmacol. 1991. V. 69. № 5. P. 537—540.
17. Wang W., Ballatori N. Endogenous glutathione conjugates: occurrence and biological functions // Pharmacol. Reviews. 1998. V. 50. № 3. P. 335—355.

Поступила в редакцию 04.07.2005 г.