

УДК 577.121:612

ХАРАКТЕР ИЗМЕНЕНИЯ АКТИВНОСТИ ОТДЕЛЬНЫХ ЭРИТРОЦИТАРНЫХ ФЕРМЕНТОВ В УСЛОВИЯХ МОДЕЛИРОВАНИЯ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА И ПРИ ПАТОЛОГИИ

Ёлкина Н.М.¹, Казакова В.В.², Коношенко С.В.³

¹*Крымский факультет Запорожского национального университета, Симферополь, Украина,
e-mail: nataleiolkina@gmail.com*

²*Крымский государственный медицинский университет им. С.И. Георгиевского, Симферополь,
Украина*

³*Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь, Украина*

Показано, что в условиях инициации окислительных реакций с участием активных форм кислорода (АФК) *in vitro* и при заболеваниях, сопровождающихся развитием окислительного стресса изменяется активность отдельных эритроцитарных ферментов. Характер изменения активности ферментов свидетельствует не только о повреждающем действии АФК, но и о возможности развития в эритроцитах компенсаторных процессов.

Ключевые слова: эритроциты, окислительный стресс, ферменты, патология.

ВВЕДЕНИЕ

Проблема окислительного стресса является одной из наиболее актуальных в современной биологии и медицине [1 – 3]. Развитие окислительного стресса происходит при участии активных форм кислорода (АФК) в результате нарушения прооксидантно-антиоксидантного гомеостаза и выявляется при многих заболеваниях и патологических состояниях организма человека [1, 2, 4]. АФК повреждают многие клеточные структуры, прежде всего мембраны, вызывают деструктивные изменения белков и нуклеиновых кислот [5, 6]. Имеющиеся в литературе данные относительно влияния АФК на белковые молекулы недостаточны, чтобы оценить характер повреждающего действия активных форм кислорода на разные по структуре и функции белки. Недостаточно изученными в этом аспекте остаются белки эритроцитов, в частности эритроцитарные ферменты. В связи с этим целью работы явилось изучение активности отдельных ферментов эритроцитов, находящихся в условиях генерирования АФК *in vitro* и при патологии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследований служили эритроциты доноров станции переливания крови (40 человек), а также больных жёлчнокаменной болезнью (35

человек) и циррозом печени (30 человек). С целью моделирования окислительного стресса *in vitro* эритроциты практически здоровых людей помещали в среду Фентона, генерирующую АФК (10 мМ FeSO₄·7H₂O и 3 мМ H₂O₂) [6]. Далее инкубировали при температуре 37°С в течение 2-х и 4-х часов. Гемолиз эритроцитов проводили по методу Дабкина [7]. Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, глутатионредуктазы и каталазы определяли спектрофотометрическими методами [8, 9].

Статистическую обработку экспериментальных данных выполняли с использованием *t* - критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как известно из литературы [10], в безъядерных эритроцитах, в частности, в эритроцитах человека, около 10 % глюкозы подвергается превращению в реакциях пентозофосфатного пути. Значение этого метаболического процесса связано прежде всего с образованием восстановленного НАДФ, который используется ферментом антиоксидантной системы глутатионредуктазой для поддержания оптимального уровня восстановительной формы глутатиона и восстановительного потенциала эритроцитов в целом.

Другим не менее важным ферментом антиоксидантной системы является каталаза, разрушающая перекись водорода, тем самым предупреждая активизацию свободно-радикальных реакций и генерирование АФК.

В наших исследованиях проводилось изучение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, катализирующей "пусковую" реакцию пентозофосфатного пути, глутатионредуктазы и каталазы в эритроцитах, находящихся в условиях генерирования АФК *in vitro*, а также при заболеваниях, сопровождающихся развитием окислительного стресса.

Как показали результаты исследований (табл. 1), через 2 часа инкубации эритроцитов практически здоровых людей в среде Фентона, генерирующей АФК, активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы возросла в 1,5 раза по сравнению с контролем. Через 4 часа инкубации активность фермента снижалась, но оставалась выше уровня контроля на 34 %. Аналогичный характер имели изменения активности глутатионредуктазы. Через 2 часа инкубации эритроцитов в среде Фентона активность фермента возросла в 1,5 раза по сравнению с контролем, тогда как через 4 часа инкубации отмечалось некоторое снижение активности фермента: на 10,2 % по сравнению с предыдущим значением показателя.

Активность каталазы в этих условиях закономерно снижалась: на 17 % через 2 часа инкубации эритроцитов и на 41,5 % через 4 часа инкубации по сравнению с контролем.

Полученные данные свидетельствуют о большей "чувствительности" молекул каталазы к действию АФК по сравнению с двумя другими ферментами.

Повышение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и глутатионредуктазы в первые 2 часа инкубации эритроцитов в среде Фентона может быть обусловлено высвобождением мембраносвязанных фракций ферментов. Не исключена также возможность активизирующего воздействия на ферменты некоторых полиненасыщенных жирных кислот, в частности представителей семейства ω₃,

ХАРАКТЕР ИЗМЕНЕНИЯ АКТИВНОСТИ ОТДЕЛЬНЫХ ЭРИТРОЦИТАРНЫХ

биоэффекторные функции которых обсуждаются в литературе последних лет [11]. Подавление активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и глутатионредуктазы при более длительной инкубации эритроцитов в среде Фентона отражает усиление в эритроцитах свободно-радикальных реакций и деструктивных процессов, связанных с действием АФК на белковые молекулы.

При заболеваниях, сопровождающихся развитием окислительного стресса, в эритроцитах больных наблюдается снижение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и глутатионредуктазы (табл. 2). Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы снижалась на 27,7 % при желчнокаменной болезни и на 42,6 % при циррозе печени. Активность глутатионредуктазы снижается на 26,3 % и на 39 % при желчнокаменной болезни и циррозе печени, соответственно. На фоне снижения активности данных ферментов прослеживается увеличение активности каталазы: в 3,0 раза при желчнокаменной болезни и в 3,5 раза при циррозе печени.

Таблица 1.

Показатели ферментативной активности эритроцитов в условиях инициации окислительных реакций *in vitro* ($\bar{x} \pm S\bar{x}$)

Ферменты	Контроль	Инкубация эритроцитов в среде Фентона в течение	
		2-х часов	4-х часов
Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, нмоль·мин ⁻¹ ·мл ⁻¹	0,047 ± 0,0015	0,070 ± 0,0024*	0,063 ± 0,0018*
Глутатионредуктаза, нмоль·мин ⁻¹ ·мл ⁻¹	0,590 ± 0,026	0,891 ± 0,030*	0,800 ± 0,017*
Каталаза, ммоль·л ⁻¹ ·с ⁻¹	0,065 ± 0,0056	0,054 ± 0,002*	0,038 ± 0,002*

Таблица 2.

Показатели ферментативной активности эритроцитов больных ($\bar{x} \pm S\bar{x}$)

Ферменты	Контрольная группа	Патология	
		Желчнокаменная болезнь	Цирроз печени
Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, нмоль·мин ⁻¹ ·мл ⁻¹	0,047 ± 0,0015	0,034 ± 0,0012*	0,027 ± 0,001*
Глутатионредуктаза, нмоль·мин ⁻¹ ·мл ⁻¹	0,590 ± 0,026	0,435 ± 0,025*	0,360 ± 0,022*
Каталаза, ммоль·л ⁻¹ ·с ⁻¹	0,065 ± 0,0056	0,198 ± 0,009*	0,228 ± 0,015*

* - достоверность различия по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$).

Отчётливо прослеживается реципрокный характер изменения активности каталазы в эритроцитах при моделировании окислительного стресса *in vitro* и в условиях

патологии. Можно предположить, что в условиях организма осуществляется компенсаторная перестройка внутриэритроцитарного метаболизма, направленная на предупреждение необратимого повреждения эритроцитов. Развитию компенсаторных реакций в эритроцитах в условиях патологии может способствовать их контакт с плазмой крови, которая содержит вещества, обладающие антиоксидантной активностью, и служит резервом веществ липидной природы, необходимых для обновления клеточных мембран, в том числе мембраны эритроцитов.

ВЫВОДЫ

1. В условиях инициации окислительных реакций *in vitro* в эритроцитах человека изменяется активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и глутатионредуктазы в направлении стабилизации их восстановительного потенциала. Вместе с этим, снижается активность внутриэритроцитарной каталазы.
2. При заболеваниях, сопровождающихся развитием окислительного стресса (жёлчнокаменная болезнь и цирроз печени) наблюдается реципрокный характер изменения изученных ферментов: снижается активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и глутатионредуктазы и повышается активность каталазы, что может иметь компенсаторное значение.
3. Изменения активности изученных ферментов в эритроцитах больных жёлчнокаменной болезнью и циррозом печени являются однонаправленными, но в большей степени выражены при циррозе печени, что, прежде всего, отражает общую стратегию биохимической перестройки эритроцитов при данных заболеваниях, а также указывает на связь уровня отмеченных изменений с видом патологии.

Список литературы

1. Турпаев К.Т. Активные формы кислорода и регуляция экспрессии генов // Биохимия. – 2002. – Т. 67, № 3. – С. 339-352.
2. Владимиров Ю.А. Активные формы кислорода и азота: значение для диагностики, профилактики и терапии // Биохимия. – 2004. – Т. 69, вып. 1. – С. 5-7.
3. Плетюшкина О.Ю., Фетисова Е.К., Лямзаев К.Г. и др. Пероксид водорода, образуемый внутри митохондрий, участвует в передаче апоптозного сигнала от клетки к клетке // Биохимия. – 2006. – Т. 71, № 1. – С. 75-84.
4. Меньщиков Е.Б., Зенков Н.К. Окислительный стресс при воспалении // Усп. совр. биол. – 1997. – Т. 117, № 2. – С. 155-169.
5. Пескин А.В. Взаимодействие активного кислорода с ДНК // Биохимия. – 1997. – Т. 62, № 12. – С. 1571-1578.
6. Дубинина Е.Е., Гавровская С.В., Кузьмич Е.В. и др. Окислительная модификация белков: окисление триптофана и образование битирозина в очищенных белках с использованием системы Фентона // Биохимия. – 2002. – Т. 67, вып. 3. – С. 413-421.
7. Drabkin D. A simplified technique for large scale crystallization of myoglobin and haemoglobin in the crystalline // Arch. Biochem. – 1949. – V. 21. – P. 224-226.
8. Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии / Кочетов Г.А. – М.: Высшая школа, 1980. – 271 с. – (Методы изучения ферментов).
9. Королук М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. – 1988, № 1. – С. 16-19.

10. Мак-Мюррей У. Обмен веществ у человека /Мак-Мюррей У. – М.: Мир, 1980. – 366 с. – (Метаболизм веществ в различных тканях организма человека).
11. Коржов В.И., Жадан В.Н. Влияние ω_3 – полинасыщенных жирных кислот на активность глутатионзависимых ферментов в цитозоле печени и эритроцитах крови крыс в норме и при экспериментальном хроническом бронхите // Укр. біохім. журн. – 2003. – Т.75, № 4. – С. 115-119.

Йолкіна Н.М. Характер змін активності окремих еритроцитарних ферментів за умов моделювання оксидативного стресу та й за патології / Н.М. Йолкіна, В.В. Казакова, С.В. Коношенко // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В. І. Вернадського. Серія: Біологія, хімія. - 2009. - Т. 22 (61). – № 3. – С. 35-39.

Показано, що за умов ініціації окиснювальних реакцій за участю активних форм кисню (АФК) *in vitro* та при захворюваннях, що супроводжуються розвитком окиснювального стресу змінюється активність окремих еритроцитарних ферментів. Характер зміни активності ферментів свідчить не тільки про ушкоджуючу дію АФК, але й про можливість розвитку в еритроцитах компенсаторних процесів.

Ключові слова: еритроцити, окиснювальний стрес, ферменти, патологія.

Yolkina N.M. Character of changes of some erythrocytes enzymes activity under model oxydative stress and pathology / N.M. Yolkina, V.V. Kazakova, S.V. Konoshenko // Scientific Notes of Taurida V.Vernadsky National University. Series: Biology, chemistry. - 2009. - Vol. 22 (61). – № 3. – P. 35-39.

It has been shown, that under initiation of oxidative reactions with the share of oxygen active forms (OAF) *in vitro* and under illnesses with oxidative stress the activity of some erythrocytes enzymes is changed. The character of enzymes activity changes testify about damage action of OAF and possibility of development of compensatoric processes in erythrocytes.

Key words: erythrocytes, oxidative stress, enzymes, pathology.

Поступила в редакцію 20.10.2009 г.