

УДК 577.121:547

ХАРАКТЕРИСТИКА ОТДЕЛЬНЫХ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ЭРИТРОЦИТОВ В УСЛОВИЯХ ИНИЦИИ ОКИСЛИТЕЛЬНЫХ РЕАКЦИЙ IN VITRO В ПРИСУТСТВИИ ГЛЮКОЗЫ РАЗНОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ

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

¹*Крымский факультет Запорожского национального университета, Симферополь, Украина*

²*Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь, Украина*

³*Крымский государственный медицинский университет им. С.И. Георгиевского, Симферополь, Украина*

В условиях инициации окислительных реакций *in vitro* в эритроцитах человека снижается интенсивность гликолитического пути утилизации глюкозы. Присутствие в среде, генерирующей активные формы кислорода, 5 мМ и 10 мМ глюкозы способствует усилению гликолитических реакций в эритроцитах.

Ключевые слова: эритроциты человека, среда Фентона, активные формы кислорода, глюкоза, гликолитические реакции.

ВВЕДЕНИЕ

Проблема окислительного стресса является одной из наиболее актуальных в современной биологии и медицине [1 – 3]. Известно, что развитие окислительного стресса осуществляется в результате усиленного генерирования в клетках активных форм кислорода (АФК) и азота или снижения активности антиоксидантных систем, действие которых направлено на поддержание прооксидантно-антиоксидантного равновесия [4]. В связи с проблемой окислительного стресса важно понять не только механизмы гиперпродукции свободных радикалов в клетках разного типа, но и характер регуляции в них метаболизма в экстремальных условиях, формирования защитных реакций, направленных на нейтрализацию повреждающего фактора и активизацию тех метаболических путей, которые ведут к восстановлению гомеостаза.

Ранее было показано, что в условиях инициации окислительных реакций с участием АФК в эритроцитах существенно снижается уровень глюкозы и этот процесс сопровождается метаболической перестройкой эритроцитов, а также изменениями в состоянии их антиоксидантной системы [5, 6].

Учитывая это, целью настоящей работы явилось изучение отдельных метаболических показателей эритроцитов, находящихся в среде, генерирующей АФК, в условиях притока глюкозы извне (система Фентона, содержащая глюкозу разной концентрации).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследований служили эритроциты доноров станции переливания крови г. Симферополя.

С целью инициации окислительных реакций эритроциты помещали в среду Фентона, генерирующую АФК (10 мМ FeSO₄ · 7H₂O и 3 мМ H₂O₂) [7]. Наряду с этим эритроциты инкубировали в среде Фентона в присутствии 5 мМ и 10 мМ глюкозы. Инкубацию проводили при температуре 37°С в течение 4-х часов. Гемолиз эритроцитов осуществляли с использованием метода Драбкина [8]. В гемолизатах эритроцитов определяли содержание фосфоенолпирувата (макроэргического метаболита гликолиза) и АТФ [9]. Статистическую обработку экспериментальных данных выполняли с использованием t-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как показали результаты исследований (табл.), при инкубации эритроцитов в среде Фентона, генерирующей АФК, в эритроцитах снижается содержание фосфоенолпирувата (ФЕП) и АТФ: в 1,86 и 2,18 раза, соответственно, по сравнению с контролем (эритроциты, не инкубированные в среде Фентона). Изменение этих показателей свидетельствует о снижении интенсивности гликолитических реакций утилизации глюкозы, играющих важную роль в энергообеспечении эритроцитов и их функционировании [10].

Таблица.

Содержание ФЕП и АТФ в эритроцитах в условиях инициации окислительных реакций *in vitro* в присутствии в среде инкубации глюкозы разной концентрации ($\bar{x} \pm S\bar{x}$)

Объект исследования	ФЕП, ммоль Фн·л ⁻¹	АТФ, ммоль Фн·л ⁻¹
Контроль 1 (эритроциты без инкубации в среде Фентона)	0,130 ± 0,005	0,144 ± 0,003
Контроль 2 (эритроциты, инкубированные в среде Фентона в течение 4-х часов)	0,070 ± 0,005*	0,066 ± 0,003*
Эритроциты, инкубированные в среде Фентона в присутствии 5 мМ глюкозы (4 часа инкубации)	0,088 ± 0,006* ^{***}	0,085 ± 0,007* ^{***}
Эритроциты, инкубированные в среде Фентона в присутствии 10 мМ глюкозы (4 часа инкубации)	0,105 ± 0,008* ^{***}	0,102 ± 0,007* ^{***}

Примечание: * - достоверность различия по сравнению с контролем 1; ** - достоверность различия по сравнению с контролем 2 (p < 0,05).

При инкубации эритроцитов в среде Фентона в присутствии 5 мМ глюкозы наблюдалось незначительное, но достоверное увеличение содержания ФЕП и АТФ. Так, содержание ФЕП в этих условиях возросло на 25,7 %, а содержание АТФ на

28,8 % по сравнению с контролем 2 (эритроциты, инкубированные в среде Фентона в отсутствии глюкозы).

Присутствие в среде инкубации 10 мМ глюкозы приводило к дальнейшему увеличению данных показателей: содержание ФЕП возрастало на 50,0 %, содержание АТФ – на 54,5 % по сравнению с контролем 2.

Однако, по сравнению с нативными эритроцитами (не инкубированными в системе Фентона) уровень ФЕП и АТФ в инкубированных эритроцитах в присутствии 5 мМ и 10 мМ глюкозы был значительно ниже.

Как было показано ранее [5], инкубация эритроцитов в среде Фентона приводит к резкому снижению содержания в них глюкозы. Через 4 часа инкубации в этих условиях содержание глюкозы в эритроцитах снижается в 1,66 раза, что, очевидно, связано не только с утилизацией глюкозы в качестве энергетического субстрата, но и с её разрушением под действием АФК. Вместе с этим, известно, что метаболизм глюкозы в эритроцитах занимает важное место не только в энергообмене, но и в генерировании восстановительных эквивалентов (НАДН и НАДФН), а также 2,3-дифосфоглицерата, действие которого связано с повышением эффективности кислородо-транспортной функции гемоглобина [10].

Представленные в настоящей работе данные свидетельствуют о том, что в условиях притока глюкозы извне в эритроцитах усиливаются гликолитические реакции, интенсивность которых возрастает с увеличением концентрации глюкозы в среде Фентона.

Результаты исследований позволяют также сделать заключение, что уровень глюкозы является важным звеном в биохимическом статусе эритроцитов, обеспечивающим поддержание их метаболической активности и защиту от разрушительного действия АФК.

ВЫВОДЫ

1. В условиях генерирования активных форм кислорода *in vitro* (среда Фентона) в эритроцитах человека снижается интенсивность гликолитического пути утилизации глюкозы.
2. Присутствие в среде, генерирующей АФК, 5 мМ и 10 мМ глюкозы способствует активизации гликолитических реакций в эритроцитах.
3. Интенсивность гликолитических реакций возрастает с увеличением концентрации глюкозы в среде инкубации эритроцитов.

Список литературы

1. Турпаев К.Т. Активные формы кислорода и регуляция экспрессии генов / К.Т. Турпаев // Биохимия. – 2002. – Т. 76, вып. 3. – С. 339–352.
2. Владимиров Ю.А. Активные формы кислорода и азота: значение для диагностики, профилактики и терапии / Ю.А. Владимиров // Биохимия. – 2004. – Т. 69, вып. 1. – С. 5–7.
3. Пероксид водорода, образуемый внутри митохондрий, участвует в передаче апоптозного сигнала от клетки к клетке / О.Ю. Плетюшкина, Е.К. Фетисова, К.Г. Лямзаев [и др.] // Биохимия. – 2006. – Т. 71, вып. 1. – С. 75–84.
4. Меньщиков Е.Б. Окислительный стресс при воспалении / Е.Б. Меньщиков, Н.К. Зенков // Усп. совр. биол. – 1997. – Т. 117, № 2. – С. 155–169.

5. Ёлкина Н.М. Изменения отдельных биохимических показателей эритроцитов человека в условиях генерирования активных форм кислорода *in vitro* / Н.М. Ёлкина // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия: Биология, химия. – 2005. – Т. 18(57), № 3. – С. 31–34.
6. Ёлкина Н.М. Характеристика окремих показників внутрішньоеритроцитарного метаболізму за умов генерування активних форм кисню *in vitro* / Н.М. Ёлкина, В.В. Казакова, С.В. Коношенко // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. – 2005, № 3. – С. 50–54.
7. Окислительная модификация белков: окисление триптофана и образование битирозина в очищенных белках с использованием системы Фентона / Е.Е. Дубинина, С.В. Гавровская, Е.В. Кузьмич [и др.] // Биохимия. – 2002. – Т. 67, вып. 3. – С. 413–421.
8. Drabkin D.A simplified technique for large scale crystallization of myoglobin and haemoglobin in the crystalline / D. Drabkin // Arch. Biochem. – 1949. – V. 21 – P. 224–226.
9. Алейникова Т.А. Руководство к практическим занятиям по биологической химии / Т.А. Алейникова, Г.В. Рубцова– М.: Высшая школа, 1988. – 223 с. (Методическое пособие для студ. высш. учебн. завед.).
10. Мак-Мюррей У. Обмен веществ человека / Мак-Мюррей У. – М.: Мир, 1980. – 366 с. (Метаболизм веществ в различных тканях организма человека).

Ёлкина Н.М. Характеристика окремих метаболічних показників за умов ініціації окиснювальних реакцій *in vitro* у присутності глюкози різної концентрації / Н.М. Ёлкина, С.В. Коношенко, О.В. Плотнікова, В.В. Казакова // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2009. – Т. 22 (61). – № 4. – С. 50-53.

За умов ініціації окиснювальних реакцій *in vitro* в еритроцитах людини знижується інтенсивність гліколітичного шляху утилізації глюкози. Присутність у середовищі, що генерує активні форми кисню, 5 мМ та 10 мМ глюкози сприяє посиленню гліколітичних реакцій в еритроцитах.

Ключові слова: еритроцити людини, середовище Фентона, активні форми кисню, глюкоза, гліколітичні реакції.

Yolkina N.M. The character of some erythrocytes metabolic indexes under initiation of oxidative reactions *in vitro* with different concentrations of glucose / N.M. Yolkina, S.V. Konoshenko, E.V. Plotnikova, V.V. Kazakova // Scientific Notes of Taurida V.Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2009. – V.22 (61). – № 4. – P. 50-53.

Under initiation of oxidative reactions *in vitro* the intensivity of glycolytic reactions in human erythrocytes is lowered. The presence in the system, generated the active oxygen forms, 5 mM and 10 mM glucose promote the intensification of glycolytic reactions in erythrocytes.

Keywords: erythrocytes of human, Fenton's system, active oxygen forms, glucose, glycolitic reactions.

Поступила в редакцію 04.12.2009 г.