

УДК 577.112:612

**ЗАВИСИМОСТЬ ИНТЕНСИВНОСТИ ГЛИКОЛИТИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ
В ЭРИТРОЦИТАХ ОТ СКОРОСТИ ГЕНЕРИРОВАНИЯ АКТИВНЫХ ФОРМ
КИСЛОРОДА ПРИ ОТДЕЛЬНЫХ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ
ЗАБОЛЕВАНИЯХ**

Елкина Н. М.¹, Коношенко С. В.², Казакова В. В.¹

¹*Медицинская академия (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского», Симферополь, Республика Крым, Россия*

²*Таврическая академия (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского», Симферополь, Республика Крым, Россия*
E-mail: nataleiolkina@gmail.com

Показано, что в эритроцитах больных дилатационной кардиомиопатией и ишемической болезнью сердца интенсифицируются гликолитические реакции и вместе с этим активизируется генерирование активных форм кислорода (супероксиданиона и гидроксил-радикала). Установлена тесная корреляционная взаимосвязь в изменении показателей гликолитических реакций и генерирования активных форм кислорода в эритроцитах при соответствующих патологиях.

Ключевые слова: эритроциты, гликолиз, гексокиназа, фосфоенолпируват, АТФ, генерирование супероксиданиона и гидроксил-радикала, сердечно-сосудистые заболевания.

ВВЕДЕНИЕ

Изучение биохимических изменений в организме человека при различных заболеваниях, сопровождающихся развитием окислительного стресса, является одной из задач современной биологии и медицины. Имеется ряд работ, свидетельствующих о том, что при многих заболеваниях такого характера в патологический процесс вовлекаются эритроциты, осуществляются изменения в их структурном и метаболическом состоянии [1–4].

Представляется важным понять, какие из этих изменений имеют необратимый характер и ведут к деструктивным процессам, а какие имеют адаптивное значение и направлены на поддержание функциональной активности эритроцитов.

Известно, что одним из основных видов метаболизма в эритроцитах является гликолиз – окисление глюкозы до лактата, что позволяет поддерживать определенный уровень АТФ, необходимый для обеспечения энергозависимых процессов [5]. Имеются также данные, свидетельствующие о том, что при некоторых заболеваниях в эритроцитах усиливается генерирование активных форм кислорода (АФК) радикальной природы [2].

В связи с этим представляет интерес изучение зависимости интенсивности гликолитических реакций в эритроцитах от скорости генерирования в них АФК в

условиях патологии, в частности при сердечно-сосудистых заболеваниях, что и составило цель настоящей работы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследований служили эритроциты практически здоровых людей (контрольная группа – 25 человек, средний возраст 39,0 лет), а также больных дилатационной кардиомиопатией (20 человек, средний возраст 45,0 лет) и ишемической болезнью сердца (25 человек, средний возраст 49,0 лет).

Кровь больных брали на базе 7-й городской больницы г. Симферополя, кровь практически здоровых людей – на базе ГБУЗ РК «Центр крови».

Кровь больных людей брали при поступлении в стационар, перед началом лечения, придерживаясь норм и принципов биоэтики.

Эритроциты гемолизировали, добавляя равный объем дистиллированной воды [6]. В гемолизатах эритроцитов определяли активность гексокиназы [7], содержание метаболита гликолиза фосфоенолпирувата (ФЕП) и АТФ [8]. По этим показателям оценивали интенсивность гликолитических реакций в эритроцитах. Наряду с этим в гемолизатах проводили определение скорости генерирования супероксиданиона ($O_2^{\bullet -}$) и гидроксил-радикала ($\bullet OH$) [9].

Во всех опытах использовались спектрофотометрические методы биохимического анализа.

Полученные данные обрабатывали статистически с применением t-критерия Стьюдента. Корреляционный анализ проводили с использованием метода, применяемого для малых выборок.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Одним из показателей интенсивности гликолитических реакций является активность гексокиназы – фермента, катализирующего первую «пусковую» реакцию гликолиза.

При изучении активности гексокиназы в эритроцитах больных и практически здоровых людей были получены данные, представленные в табл. 1. Из этих данных видно, что активность изученного фермента в эритроцитах больных ишемической болезнью сердца (ИБС) и дилатационной кардиомиопатией была достоверно выше по сравнению с контрольной группой. В обеих группах больных активность внутриэритроцитарной гексокиназы превышала показатель контрольной группы практически в 2,0 раза.

Изучение количественного содержания в эритроцитах фосфоенолпирувата (макроэргического метаболита гликолиза) показало, что уровень ФЕП в гемолизатах эритроцитов больных был также существенно выше по сравнению с контрольной группой: в 2,3 раза у больных ИБС и в 1,8 раза – у больных кардиомиопатией. В большей степени изменения данного показателя прослеживаются в эритроцитах больных ишемической болезнью сердца.

Наряду с этим были выявлены существенные изменения в количественном содержании АТФ. Содержание АТФ в эритроцитах больных превышало показатель

контрольной группы: в 2,5 раза при ишемической болезни сердца и в 2,4 раза – при дилатационной кардиомиопатии.

В целом, из всех этих данных следует, что при ишемической болезни сердца и дилатационной кардиомиопатии в эритроцитах усиливаются гликолитические реакции и, следовательно, возрастает продукция АТФ. Не исключено, что при этом возрастает образование побочного продукта гликолиза 2,3-дифосфоглицерата (2,3-ДФГ) – аллостерического эффектора гемоглобина, регулирующего средство дыхательного белка к кислороду [10]. Изменения такого рода в эритроцитах могут иметь определенное адаптивно-компенсаторное значение.

Таблица 1
Содержание ФЕП и АТФ и активность гексокиназы в гемолизате эритроцитов больных ИБС и дилатационной кардиомиопатией (M ± m)

Обследованные группы	Активность гексокиназы, нмоль·мин ⁻¹ ·мл ⁻¹	Содержание ФЕП, мг % Фн	Содержание АТФ, мг % Фн
Контрольная группа	0,66 ± 0,03	0,43 ± 0,02	0,48 ± 0,01
Больные ИБС	1,36 ± 0,03*	0,99 ± 0,03*	1,2 ± 0,1*
Больные дилатационной кардиомиопатией	1,28 ± 0,12*	0,77 ± 0,07*	1,16 ± 0,05*

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

Таблица 2
Скорость генерирования супероксиданиона и •ОН-радикала в гемолизате эритроцитов больных ИБС и дилатационной кардиомиопатией (M ± m)

Обследованные группы	Скорость генерирования супероксиданиона, усл. ед.·мин ⁻¹ ·мгНв ⁻¹	Скорость генерирования •ОН-радикала, усл. ед.·мин ⁻¹ ·мгНв ⁻¹
Контрольная группа	2,90 ± 0,15	16,50 ± 0,84
Больные ИБС	4,95 ± 0,26*	54,35 ± 2,95*
Больные дилатационной кардиомиопатией	4,35 ± 0,21*	45,40 ± 2,70*

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

Учитывая то обстоятельство, что при ишемической болезни сердца и дилатационной кардиомиопатии в эритроцитах интенсифицируются реакции перекисного окисления липидов [11], тем самым свидетельствуя о развитии окислительного стресса, представляло интерес определить уровень образования активных форм кислорода в эритроцитах при соответствующих заболеваниях и выяснить вопрос о возможности связи наблюдаемых изменений в показателях гликолитических реакций с процессом генерирования АФК.

При изучении скорости генерирования супероксиданиона и гидроксил-радикала в эритроцитах практически здоровых людей и больных были получены данные, представленные в табл. 2. Как показали результаты исследований, скорость генерирования супероксиданиона в эритроцитах больных была достоверно выше по сравнению с контрольной группой: в 1,7 раза при ишемической болезни сердца и в 1,5 раза – при кардиомиопатии. При этом более выраженными оказались изменения скорости генерирования $\bullet\text{OH}$ -радикала. В эритроцитах больных ИБС скорость генерирования гидроксил-радикала превышала показатель контрольной группы в 3,3 раза, у больных дилатационной кардиомиопатией – в 2,75 раза.

Для установления тесноты взаимосвязи интенсивности гликолитических реакций и генерирования АФК был проведен корреляционный анализ между изученными показателями в следующем порядке: активность гексокиназы – скорость генерирования $\text{O}_2^{\bullet-}$; активность гексокиназы – скорость генерирования $\bullet\text{OH}$; содержание ФЕП – скорость генерирования $\text{O}_2^{\bullet-}$; содержание ФЕП – скорость генерирования $\bullet\text{OH}$; содержание АТФ – скорость генерирования $\text{O}_2^{\bullet-}$; содержание АТФ – скорость генерирования $\bullet\text{OH}$.

Во всех случаях коэффициент корреляции был положительным и существенно высоким и находился, в целом, в пределах (+0,93) – (+0,98), что указывает на достаточно хорошо выраженную зависимость интенсивности гликолитических реакций в эритроцитах больных от скорости генерирования активных форм кислорода. На наш взгляд, этот факт представляет большой интерес и создает перспективу для дальнейших исследований с целью выяснения причины столь тесной взаимосвязи двух совершенно разных внутриэритроцитарных процессов.

Усиленное генерирование супероксиданиона и гидроксил-радикала в эритроцитах больных свидетельствует о развитии окислительного стресса и о возможности интенсификации в эритроцитах деструктивных процессов, осуществляемых под действием АФК. Факт активизации гликолиза в эритроцитах в этих условиях позволяет предположить реализацию некоторого процесса, возможно, запускаемого АФК и способствующего оптимизации гликолитических реакций, энергообмена и в итоге – поддержанию функциональной активности эритроцитов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, результаты исследований позволяют сделать следующие выводы:

1. В эритроцитах больных дилатационной кардиомиопатией и ишемической болезнью сердца интенсифицируются гликолитические реакции, о чем свидетельствует повышение активности внутриэритроцитарной гексокиназы, содержания фосфоенолпирувата и АТФ.
2. При ишемической болезни сердца и дилатационной кардиомиопатии в эритроцитах усиливается генерирование супероксиданиона и гидроксил-радикала, что свидетельствует о развитии окислительного стресса. Показано более интенсивное генерирование $\cdot\text{OH}$ -радикала по сравнению с супероксиданионом.
3. Методом корреляционного анализа установлена тесная взаимосвязь интенсивности гликолитических реакций в эритроцитах больных и скорости генерирования супероксиданиона и гидроксил-радикала. Коэффициенты корреляции положительные и находятся в пределах (+0,93) – (+0,98).

Список литературы

1. Новицкий В. В. Белковый спектр мембран эритроцитов у больных раком легкого и с опухолями головы и шеи / В. В. Новицкий, В. Е. Гольдберг, М. В. Колосова и др. // Бюлл. эксперим. биол. и мед. – 1999. – Прил. 1. – С. 18–20.
2. Елкина Н. М. Процессы перекисидации липидов, метгемоглобинообразования и генерирования активных форм кислорода в эритроцитах больных эритремией / Н. М. Елкина // Уч. записки Таврического нац. ун-та им. В. И. Вернадского. – Сер.: Биология, химия. – 2013. – Т. 26 (65), № 4. – С. 39–43.
3. Коношенко С. В. Особливості окиснювальної модифікації протеїнів в еритроцитах хворих на кардіоміопатію, ішемічну хворобу серця, еритремію та апластичну анемію / С. В. Коношенко, Н. М. Йолкіна // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. – 2013, № 2. – С. 40–43.
4. Novgorodtseva T. P. Modifications of the fatty acid composition of the erythrocyte membrane in patients with chronic respiratory diseases / T. P. Novgorodtseva, Y. K. Denisenko, N. N. Zhukova [et al] // Lipids Health Dis. – 2013, N 12. – P. 117–121.
5. Мак-Мюррей У. Обмен веществ у человека / У. Мак-Мюррей. – М.: Мир, 1980. – 368 с.
6. Drabkin D. A simplified technique for large scale crystallization myoglobin and haemoglobin in the crystalline / D. Drabkin // Arch. Biochem. – 1959. – V. 21. – P. 224–226.
7. Кочетов Г. А. Практическое руководство по энзимологии / Г. А. Кочетов. – М.: Высшая школа, 1980. – 271 с.
8. Алейникова Т. Л. Руководство к практическим занятиям по биологической химии / Т. Л. Алейникова, Г. В. Рубцова. – М.: Высшая школа, 1988. – 238 с.
9. Basaga H. S. Biochemical aspects of free radicals / H. S. Basaga // Cell. Biol. – 1990. – V. 68, N 5. – P. 989–998.
10. Иржак Л. И. Гемоглобины и их свойства / Л. И. Иржак. – М.: Наука, 1975. – 240 с.
11. Елкина Н. М. Состояние антиоксидантной системы в эритроцитах при отдельных гематологических и сердечно-сосудистых заболеваниях / Н. М. Елкина, С. В. Коношенко // Уч. записки Таврического нац. ун-та им. В. И. Вернадского. – Серия: Биология, химия. – 2015. – Т. 1 (67), № 3. – С. 14–20.