

УДК 577.1546.215.612.12

©Коллектив авторов

## ВЛИЯНИЕ НИЗКОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА НА МЕТАБОЛИЗМ КЛЕТОК КРОВИ

*В.А.Самохвалов, М.Д.Сметанина, Н.Ю.Мусейкина, Г.В.Мельников,  
О.В.Федотова, В.В.Изнатов.*

Саратовский государственный университет,  
Саратов 410026, ул. Астраханская 83, тел.: (8452) 51-92-20; факс (8452) 24-04-46;  
эл.почта: samokhvalov@mail.ru или samokhvalova@sartfoms.ru

Известно, что перекись водорода обладает широким спектром физиологических эффектов в отношении функциональной активности клетки. Мы исследовали влияние  $H_2O_2$  на активность гликолитического пути распада глюкозы клетками крови. Добавление  $H_2O_2$  до суммарной концентрации 50 мкМ к нативной крови приводило к снижению активности некоторых гликолитических ферментов - гексокиназы, фосfogексоизомеразы, фосфоглюкоальдозы. Ингибирующими было действие  $H_2O_2$  на потребление глюкозы клетками крови. Несмотря на то, что  $H_2O_2$  присущи проокислительные свойства, после ее 2-х часовой инкубации с клетками крови наблюдалось снижение уровня малонового диальдегида (МДА). Предполагается, что  $H_2O_2$  реализует свое физиологическое действие в отношении метаболизма клеток крови через систему внутриклеточной сигнализации.

**Ключевые слова:** перекись водорода, кровь, метаболизм, внутриклеточная сигнализация, гликолитические ферменты.

**ВВЕДЕНИЕ.** Роль свободных радикалов в функционировании биологических систем в настоящее время во многом остается невыясненной. В многочисленных работах показана способность активных форм кислорода повреждать биологические молекулы, такие как белки, липиды, нуклеиновые кислоты, а также вызывать дезорганизацию клеточных структур [1,2]. С активацией одноэлектронного восстановления кислорода связывают возникновение таких патологий как катаракта [3], атеросклероз [4], ишемическая болезнь сердца [5], канцерогенез [6]. Известна роль активных форм кислорода в процессах физиологического старения клеток [7]. Все это дало основание рассматривать их, в качестве универсального патогенетического маркера. В тоже время в организме происходит постоянная генерация активных форм кислорода. Продукты одноэлектронного восстановления кислорода в особенности  $O_2$  и  $H_2O_2$ , постоянно возникают в ходе работы электронтранспортной цепи митохондрий [8], цитохрома P450 [9], в результате окислительного взрыва в макрофагах [10].

К настоящему времени имеются данные, показывающие возможность модуляции низкими концентрациями  $H_2O_2$  функционирование целого ряда метаболических процессов. Рядом авторов было выяснено, что  $H_2O_2$  в диапазоне концентраций 0,1-50,0 мкМ усиливает окислительный взрыв в нейтрофилах в ответ на хемотаксический пептид [11], секрецию простагландинов [12], агрегацию тромбоцитов [13], активирует  $K^+$  и  $Ca^{2+}$  каналы плазматической мембраны [14,15], а также способна модулировать чувствительность NMDA-рецептора к его агонистам [16].

## ПЕРЕКИСЬ ВОДОРОДА И МЕТАБОЛИЗМ КЛЕТОК КРОВИ

Свое действие на метаболизм клеток перекись водорода способна реализовывать в концентрациях порядка 10 - 50 мкМ и в присутствии высокоактивных антиоксидантных систем [17].

Известно, что в клетках крови гликолиз является основным механизмом, образующим АТФ. В связи с этим, безусловно интересным является исследование влияния низких концентраций  $H_2O_2$  на активность гликолитических ферментов клеток крови.

В настоящей работе все эксперименты были проведены на нативной крови, поскольку это позволяет, по-нашему мнению, максимально приблизить физиологический ответ клеток крови на действие  $H_2O_2$  к условиям *in vivo*. Отсутствие сывороточных белков и антиоксидантов, стрессирование клеток при их выделении - все это не способствует полноценному и адекватному ответу клеток на действие перекиси водорода, который мог бы хоть в некоторой степени отражать физиологический ответ клеток крови в условиях целостного организма.

**МЕТОДИКА.** Все эксперименты были проведены на крови беспородных белых мышей самцов массой  $23 \pm 2$  г. Кровь быстро смешивали с гепарином (100 Ед на 1 мл крови) и добавляли глюкозу (40 мг/мл 0,9 % NaCl) из расчета 50 мкл на 1 мл крови. В крови определяли концентрацию перекиси водорода, а затем добавляли экзогенную 10 %  $H_2O_2$  до суммарной концентрации 50 мкМ. Все реактивы готовили на бидистиллированной воде. Определение всех параметров проводили в доинкубационной среде, через 2 часа после инкубации при 37°C без перекиси водорода и после инкубации крови с ее добавлением. В течении инкубации через каждые 10 минут кровь осторожно встряхивали рукой. Определяли содержание глюкозы [18], лактата [19], перекись водорода [20]. Активность фосфофруктоальдозазы (КФ 4.1.2.7), фосфогексоизомеразы (КФ 5.3.1.9) и лактатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.27) определяли, как описано в [20]. Активность гексокиназы (КФ 2.7.1.1) определяли с применением сопряженной системы, где в качестве вспомогательного фермента использовалась глюкозо - 6 - фосфатдегидрогеназа [21]. Содержание малонового диальдегида (МДА) в крови регистрировали по его реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой [22]. Кинетику гемолитического процесса (кислотная резистентность эритроцитов) определяли как устойчивость трижды отмытых в 0,9 % р-ре NaCl эритроцитов к кислотному гемолитику (0,002 М HCl) [23]. Наблюдение за процессом гемолиза вели спектрофотометрически при длине волны 540 нм. Определяли следующие параметры: время начала и окончания гемолиза, максимальное время и степень гемолиза. Все реактивы были получены из фирмы "Sigma" (США). В работе был использован спектрофотометр "Hitachi 356" (Япония). Статистическую обработку цифровых данных проводили на IBM PC с использованием программы "Solo".

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Поскольку интенсивность утилизации глюкозы клетками определяется активностью соответствующих ферментов, мы исследовали влияние 2-х часовой инкубации клеток крови в присутствии  $H_2O_2$  на активность некоторых гликолитических ферментов. Необходимо отметить, что инкубация крови без перекиси водорода сопровождалась некоторым снижением активности гексокиназы, фосфогексоизомеразы и фосфофруктоальдозазы. Инкубация крови в присутствии перекиси водорода приводила к значительно более сильному снижению активности этих ферментов. Активность лактатдегидрогеназы, как в случае инкубации крови в присутствии  $H_2O_2$ , так и без нее практически не изменялась (табл.1). Ингибирующим было действие перекиси водорода на потребление глюкозы клетками крови. Оно уменьшалось на 45 %, однако концентрация лактата оставалось на прежнем уровне относительно крови инкубируемой без  $H_2O_2$  (табл.2).

Известно, что перекись водорода обладает прооксидантными свойствами. В связи с этим было важно исследовать способность  $H_2O_2$  инициировать процессы перекисного окисления в клетках крови.

Мы обнаружили, что инкубация клеток крови в отсутствие перекиси водорода сопровождалась значительным накоплением в них МДА (рис). Этот факт

Таблица 1. Изменение активности гликолитических ферментов крови после ее 2-х часовой инкубации в присутствии перекиси водорода

Параметры	Лактатдегидрогеназа нмоль NAD/мин на 1 мг белка	Гексокиназа; нмоль NADPH/мин на 1 мг белка	Фосфогексоизо- мераза; мкмоль фруктозо-6-фосфата/ час на 1 мг белка	Фосфофрукто- альдолаза; мкмоль фосфотриоз/мин на 1 г белка
Исходный уровень	285,73±13,11	310,24±14,56	1,31±0,071	8,31±0,067
Инкубация 2 часа	263,15±11,47	287,34±17,83*	0,97±0,049*	7,71±0,052*
Инкубация 2 часа в присутствии H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	257,67±25,23	117,87±13,54* #	0,63±0,034* #	4,52±0,021* #

Примечание: \* -  $p < 0,05$  по отношению к значениям исходного уровня, # -  $p < 0,05$  по отношению к значениям 2-х часовой инкубации.

Таблица 2. Влияние перекиси водорода на потребление глюкозы и накопление лактата клетками крови.

Параметры	Глюкоза; ммоль/л	Лактат; ммоль/л
Исходный уровень	10,80±0,94	2,13±0,79
Инкубация 2 часа	3,88±0,35*	4,51±0,21*
Инкубация 2 часа в присутствии H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	8,85±0,45* #	4,31±0,23*

Примечание: \* -  $p < 0,05$  по отношению к значениям исходного уровня, # -  $p < 0,05$  по отношению к значениям 2-х часовой инкубации.

свидетельствует об усилении активности клеточных процессов перекисного окисления, что соответственно повлечет за собой накопление в клетках первичных и вторичных продуктов перекисного окисления, являющихся по всей видимости причиной снижения устойчивости эритроцитов крови после ее инкубации без H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> к кислотному гемолизу. Это выражалось в уменьшении максимального времени гемолиза и времени окончания гемолиза (табл.3).

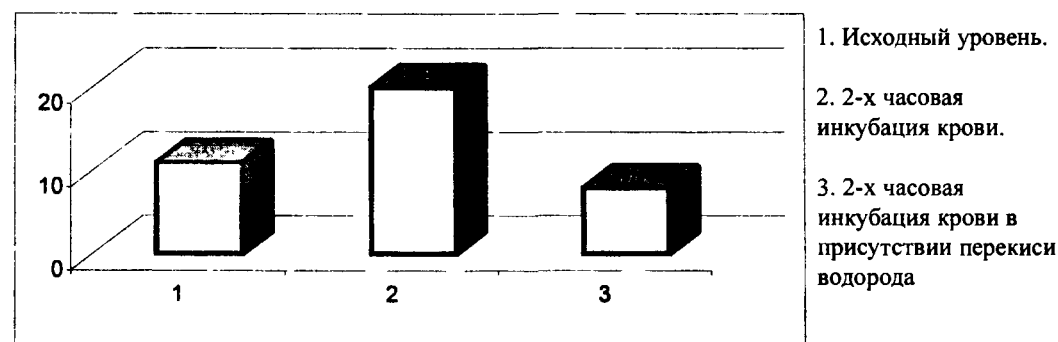


Рисунок.

Изменение уровня МДА в крови после ее 2-х часовой инкубации в присутствии перекиси водорода.

Напротив, инкубация крови с перекисью водорода приводила к сильному снижению уровня МДА в клетках крови, но параметры гемолитического распада эритроцитов практически не отличались от таковых для эритроцитов крови, инкубируемой без H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Отсюда можно сделать важный вывод - добавление перекиси водорода до конечной концентрации 50 мкМ к инкубируемой крови не вызывает активацию внутриклеточных процессов свободнорадикального окисления.

Описанное выше изменение определяемых параметров крови в процессе инкубации без перекиси водорода, вероятно, вызвано ответом крови на развитие

### ПЕРЕКИСЬ ВОДОРОДА И МЕТАБОЛИЗМ КЛЕТОК КРОВИ

Таблица 3. Изменение кинетики гемолитического распада эритроцитов крови мышей, инкубируемой в присутствии перекиси водорода

Характер воздействия	Параметры кинетики гемолитического распада эритроцитов			
	Время начала гемолиза, мин	Максимальное время гемолиза, мин	Максимальная степень гемолиза, %	Время окончания гемолиза, мин
Исходный уровень	1,5±0,1	3,51±0,17	32,46±3,11	5,51±0,12
Инкубация 2 часа	1,5±0,09	2,51±0,19*	30,48±2,51	5,00±0,11*
Инкубация 2 часа в присутствии H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1,5±0,11	2,52±0,11*	31,00±2,11	5,51±0,32

Примечание: \* -  $p < 0,05$  по отношению к значениям исходного уровня.

целого ряда стресс-факторов, к которым в первую очередь можно отнести развивающуюся гипероксию. Известно, что равновесие с воздухом дает порядка 157 мм рт. ст, в то время как даже артериальная кровь не содержит больше 100 мм рт. ст., что соответствует 13% кислорода, а не 21% как в воздухе. Вероятно, гипероксические условия приводили к усилению генерации в клетках крови целого спектра активных форм кислорода, некоторые из которых, в частности  $O_2^{\cdot -}$  и  $OH^{\cdot}$  являются агрессивными деструкторами клеточных структур. Именно их усиленная генерация, очевидно и являлась причиной накопления в клетках крови МДА, повлекшее за собой снижение устойчивости эритроцитов к кислотному гемолитику.

Представленные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что инкубация клеток крови с  $H_2O_2$  приводит к ряду изменений в гликолитическом потоке. Обращает на себя внимание сильное снижение потребления глюкозы клетками крови при неизменном уровне лактата. Вероятно, это можно объяснить использованием клетками крови их основного, энергозапасяющего вещества - 2,3 дифосфоглицерата, расщепление которого в данных условиях могло быть доступным способом получения АТФ.

Поскольку исследуемые нами ферменты гликолиза имеют различную первичную структуру, определяющую их пространственную конформацию и физико-химические свойства, подавление активности, вызванное непосредственным взаимодействием перекиси водорода с каждым из них, представляется маловероятным.

Мы предполагаем, что в данном случае эффекты перекиси водорода на гликолитический поток клеток крови были реализованы через некоторые механизмы клеточной регуляции, среди которых можно выделить два основных. Первый связан с возможностью окисления перекисью водорода SH-групп мембранных рецепторов [24]. Изменение конформации может быть причиной активации рецептора. Активированный рецептор запускает внутриклеточные каскадные процессы, изменяющие в конечном счете направленность метаболических путей клетки.

Второй механизм предполагает возможность перекиси водорода реализовать свои эффекты непосредственно на уровне модуляции систем клеточной сигнализации. Взаимодействие  $H_2O_2$  с аденилатциклазой может привести к активации последней и, как следствие, увеличивать уровень сАМР в клетках. В свою очередь, сАМР-зависимая протеинкиназа А через универсальный механизм фосфорилирования/дефосфорилирования может модулировать активность многих ферментов, в том числе и гликолитических. Важным достижением последних лет является экспериментальное подтверждение способности  $H_2O_2$  модулировать активность аденилатциклазы [25] и протеинкиназы С [26], инициировать образование внутриклеточных инозитол - трифосфатов [27], активировать фосфолипазу С [28]. Интересным является тот факт, что  $H_2O_2$  может ингибировать семейство G(i) белков [29]. В связи с этим необходимо отметить, что в клетках

крови, в том числе в эритроцитах, обнаружены практически все известные регуляторы и посредники системы внутриклеточной сигнализации [30].

Возможность воздействия перекиси водорода на метаболизм глюкозы в клетках описана в литературе. В работе [31] показана возможность перекиси водорода имитировать некоторые эффекты инсулина на адипоциты. Так, их обработка 500 мкМ перекисью водорода приводила к увеличению транспорта глюкозы через плазматическую мембрану этих клеток и ее дальнейшую метаболическую утилизацию. Усиление потребления глюкозы в эндотелиальных клетках, обработанных 200 мкМ  $H_2O_2$ , было продемонстрировано в работе [32]. Поскольку мы получили обратный эффект - ингибирование перекисью водорода метаболизма глюкозы клетками крови, мы предполагаем, что концентрация  $H_2O_2$  может являться фактором, определяющим направленность метаболического ответа клеток. Так, в работе [33] показано, что "знак" физиологического ответа клеток табака на действие органических перекисей зависит от их концентрации. В зависимости от концентрации пероксидов в среде роста они либо ускоряли рост клеток, либо замедляли его. Подобное явление "перемены знака" в дозовой зависимости хорошо известно и описано для целого ряда биологически активных веществ в малых и особенно в сверхмалых концентрациях [34]. Хотя, используемую нами концентрацию перекиси водорода трудно отнести к области сверхмалых концентраций, следует заметить, что большая ее часть будет разрушаться высокоактивными ферментами каталазой и глутатионпероксидазой, присутствующими в крови.

Интересно, что инкубация крови в присутствии перекиси водорода не только не усиливала накопление МДА в клетках крови, но и напротив, приводила к значительному снижению его уровня. Создается впечатление, что добавление экзогенной  $H_2O_2$  к инкубируемой крови способствует увеличению мощности систем антиоксидантной защиты клеток (каталаза, супероксиддисмутаза, ферменты глутатионового цикла, а также низкомолекулярные антиоксиданты). Эти системы способны эффективно нейтрализовать негативное действие активных форм кислорода в отношении клеточных структур. Скорее всего, за счет этого, происходило снижение деструктивных эффектов гипероксии.

Возможно, роль перекиси водорода в функционировании метаболических путей является более значительной, чем это кажется. По всей вероятности, в низких концентрациях  $H_2O_2$  может выполнять функции эндогенного регулятора метаболических путей в клетках через систему внутриклеточной сигнализации. Дальнейшее тщательное исследование физиологических эффектов перекиси водорода - предмет наших будущих исследований.

Выражаем глубокую благодарность Е.Б. Бурлаковой и Е.М. Молочкиной (Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва), за обсуждения и ценные критические замечания по работе.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Halliwell B., Gutteridge G.M. (1989) *Free Radicals in Biology and Medicine*, Clarendon Press, Oxford.
2. Stadtman E.R. (1993) *Annu. Rev. Biochem.*, **62**, 797-821.
3. Bhuyan K.C., Bhuyan D.K. (1984) *Curr. Eye. Res.*, **3**, 67-81.
4. Ham E.A., Egan R.W., Soderman D.D., Gale P.H., Kuehe F.A. (1979) *J. Biol. Chem.*, **254**, 2191-2194.
5. Singal P., Khaper N., Palace V., Kumar D. (1998) *Cardiovasc. Research.*, **254**, 2191-2194.
6. Sun Y. (1990) *Free Rad. Biol. Med.*, **8**, 583-589.
7. Shi L., Sawada M., Sester U., Carlson J. (1994) *Exp. Gerontol.*, **5**, 575-584.
8. Delvin T. (1997) *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations*, Willey - Liss, N Y.

# ПЕРЕКИСЬ ВОДОРОДА И МЕТАБОЛИЗМ КЛЕТОК КРОВИ

9. Mohazzab K.M., Wolin M.S. (1994) Amer. J. Physiol., **267**, 823-831.
10. Winn J.S., Guille J., Gebicki J.M., Day R.O. (1991) Biochem. Pharmacol., **41**, 31-36.
11. Gamaley I.A., Kirpichnikova K.M., Kluibin I.V. (1994) Cell. Signal., **6**, 190-192.
12. Ager A., Gordon J.L. (1984) J. Exp. Med., **159**, 592-603.
13. Ikeda H., Koga Y., Oda T. (1994) Amer. Coll. Cardiol., **24**, 1749-1756.
14. Kuo S.S., Saad A.H., Koong A.C., Hahn G.M., Giaccia A.J. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **90**, 908-912.
15. Volk T., Hensel M., Kox W.J. (1997) Mol. Cell. Biochem., **171**, 11-21.
16. Aizenman E. (1995) Neurosci Lett., **189**, 57-59.
17. Гамалей И.А., Клубин И.В. (1996) Цитология, **38**, 1233-1247
18. Балаховский И.С., Наточин Ю.В. (1973) Пробл. косм. биол., **22**, 43-44
19. Балаховский И.С., Наточин Ю.В. (1973) Пробл. косм биол., **22**, 32-33.
20. Асатиани В.С. (1969) Ферментные методы анализа. М.: Наука, 740 с.
21. Easterby J., Rosenmeyer M. (1972) Eur. J. Biochem., **28**, 241-252.
22. Slater T.E., Sawyer B.C. (1971) Biochem. J., **123**, 805-814.
23. Гутельзон И.И., Терсков И.А. (1957) Биофизика, **2**, 259-262.
24. Czech M.P., Lawrence J.C., Lynn W.S. (1974) Proc. Acad. Sci. USA., **10**, 4173-4177.
25. See V., Koch B., Loeffler J.B. (2001) J. Neurochem., **3**, 778-788.
26. Shasby D.M., Yorek M., Shasby S.S. (1988) Blood, **72**, 491-499.
27. Wu L., de Champlain J. (1999) Biochem. Biophys. Res. Commun., **2**, 239-243.
28. Rao G.N., Range M.S., Alexander R.W. (1995) Biochim. Biophys. Acta., **1265**, 67-72.
29. Nishida M., Maruyama Y., Tanaka R., Kontani K., Nagao T., Kurose H. (2000) Nature, **48**, 492-495.
30. Lutz H.U., Stringaro-Wipf G., Maratski D. (1976) J. Cardiovasc. Pharm., **8**, 576-579.
31. May J.M., de Haen C. (1979) J. Biol. Chem., **254**, 9017-9021.
32. Asahina T., Kashiwagi Y., Nishio M. (1995) Diabetes., **44**, 520-526.
33. Богатыренко Т.Н., Редкозубова Г.П., Конрадов А.А., Антоновский В.Л., Бурлакова Е.Б. (1989) Биофизика, **34**, 327-329.
34. Бурлакова Е.Б. (1994) Вест. РАН., **64**, 425-431.

Поступила 20.03.01

## THE INFLUENCE OF LOW DOSES HYDROGEN PEROXIDE ON METABOLISM OF BLOOD CELLS.

Samokhvalov V., Smetanina M., Museykina N., Melnikov G., Fedotova O., Ignatov V.

Saratov State University, Saratov. Astrakhanskaya str 83, 410026 Russia.

tel.: (8452) 51-92-20; fax: (8452) 24-04-46;

e-mail: samokhvalov@mail.ru

Hydrogen peroxide is known to possess a wide range of physiological effects towards functional activity of cells. We have investigated the influence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on the activity of glycolysis in the native blood cells. Adding of hydrogen peroxide up to final concentration 50 μM led to decrease of activity some glycolytic enzymes. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inhibited consumption of glucose by blood cells. Despite the fact that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is well known as prooxidant, we observed decrease of the level of thiobarbituric acid reactive species in the blood cells after their incubation in the presence of hydrogen peroxide for 2 hours. Based on these data we supposed that effects of hydrogen peroxide occur via signal transduction pathways.

**Key words:** hydrogen peroxide, blood, metabolism, signal transduction pathways, glycolytic enzymes.