

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, фосфогексоизомеразы, фосфофруктоальдозазы. Ингибирующими было действие  $H_2O_2$  на потребление глюкозы клетками крови. Несмотря на то, что  $H_2O_2$  присущи прооксидантные 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  $37^\circ C$  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 оставалась 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 гемолитику. Это выражалось в уменьшении максимального времени гемолиза и времени окончания гемолиза (табл.3).

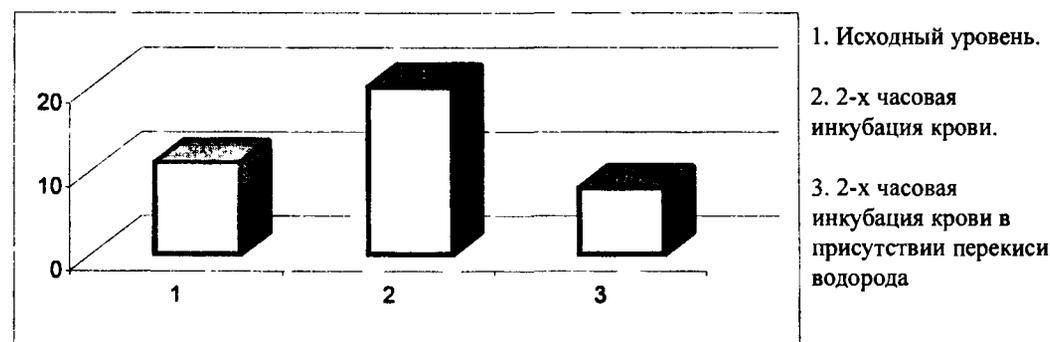


Рисунок.

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 гемоллиза, мин	Максимальное время гемоллиза, мин	Максимальная степень гемоллиза, %	Время окончания гемоллиза, 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<sub>2</sub><sup>•</sup> и OH<sup>•</sup> 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub> модулировать активность аденилатциклазы [25] и протеинкиназы С [26], инициировать образование внутриклеточных инозитол - трифосфатов [27], активировать фосфолипазу С [28]. Интересным является тот факт, что H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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., Cox 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. *Гительзон 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 HYDROGENE 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.