

КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 612.015.11:616-006.441

© Коллектив авторов

ГЛУТАТИОНЗАВИСИМЫЕ ФЕРМЕНТЫ И ГЛЮКОЗО-6-ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗА В КРОВИ БОЛЬНЫХ ЛИМФОСАРКОМОЙ (НЕХОДЖКИНСКОЙ ЛИМФОМОЙ)

Л.А. Гаврилюк, И.Ф. Корчмару, М.В. Робу, Л.Т. Лысый*

Государственный университет медицины и фармации им.Н. Тестемицану,
Бульвар Стефана Великого 165, Кишинёв, Молдова, МД 2004;
тел.: +37322-205-404; эл. почта: gavrlu@mail.ru

Исследовали активности глутатионзависимых энзимов и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (ГФДГ) в крови больных лимфосаркомой (ЛС, неходжкинской лимфомой). Изменения активности исследуемых ферментов (глутатиондегидроаскорбатредуктазы (ГДАР), гамма-глутамилтранспептидазы (ГГТ), и ГФДГ), измеренные в плазме, лейкоцитах, лимфоцитах и эритроцитах периферической крови, и данные корреляционного анализа свидетельствовали о дисбалансе антиоксидантной системы защиты и нарушении метаболизма у больных ЛС. Тесная функциональная взаимосвязь в лимфоцитах больных ЛС сохранялась только между ГР и ГДАР с высоким уровнем надёжности ($r=+0,717$; $p<0,0005$). Выявленная взаимосвязь между уровнем активности антиокислительных энзимов и активностью (стадией) патологического процесса, что может быть дополнительным биохимическим тестом для дифференциальной диагностики ЛС, позволяющим оценить состояние пролиферативной активности клеток.

Ключевые слова: лимфосаркома, глутатионредуктаза, гамма-глутамилтранспептидаза, глутатиондегидроаскорбатредуктаза, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа.

ВВЕДЕНИЕ. Злокачественные (неходжкинские) лимфомы или лимфосаркомы являются опухолями преимущественно лимфоидной ткани [1]. Лимфоидная ткань играет важную роль в поддержании гомеостаза организма, в регуляции процессов регенерации, деления и дифференцировки клеток. Сдвиги в системе иммуногенеза сохраняются в организме дольше, чем явления стресса и процессы резорбции погибших в результате травмы тканей [2]. Регуляция клеточной пролиферации включает механизмы и факторы, обуславливающие переход из покоящегося дифференцированного состояния в стадию деления, а также факторы, влияющие на отдельные фазы митотического цикла.

Хорошо известно, что дифференцировка иммунокомпетентных клеток является обязательным условием их участия в защитных реакциях организма. Активаторами дифференцировки могут быть медиаторы-полипептиды, нейропептиды, интерлейкины, внутриклеточные трансммиттеры [3, 4]. Каким бы по химической природе не был активатор, ранние признаки активации характеризуются для макрофагов “окислительным взрывом”, образованием и выделением в среду перекиси водорода, радикалов кислорода (OH^\bullet , O_2^\bullet), концентрация которых в клетке находится под контролем антиокислительной системы [5]. Активация лимфоцитов является стимулом к повышению концентраций линолевой и арахидоновой кислот, необходимых для синтеза простагландина Е, запускающего иммунологические реакции лимфоцитов [3, 4].

* - адресат для переписки

Для лимфопролиферативных заболеваний, к которым относятся лимфосаркомы (ЛС), характерен хронический окислительный стресс, при котором повышается количество активных форм кислорода (АФК), усилены процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ), нарушены многие биохимические процессы [6, 7]. Внутриклеточная антиокислительная защита осуществляется посредством “антиокислительного ответственного элемента” (antioxidant responsive element, ARE), обнаруженного в промоторах многих генов, индукция которых наблюдалась при окислительном и химическом стрессе [8, 9]. Активация генов посредством ARE является основанием для повышения антиоксидантной и детоксикационной функций клеток, для защиты от образующихся эндотоксинов и поступающих из окружающей среды экзотоксинов, которые могут повысить риск возникновения лимфопролиферативных заболеваний [10].

Важная роль ферментной редокс-системы глутатиона определена её участием в тиолдисульфидном обмене, в регуляции биосинтеза белков, в процессах деления, дифференцировки и апоптоза клеток, в устранении свободных радикалов, перекисей и гидроперекисей липидов [11-13]. Изменение состояния ферментной редокс-системы глутатиона может определять чувствительность опухолевых клеток к лекарственным препаратам, применяемым в курсе химиотерапии [14, 15].

Цель данной работы состояла в исследовании активностей глутатионзависимых ферментов и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в плазме, лейкоцитах, лимфоцитах и эритроцитах периферической крови больных лимфосаркомой и поиске корреляционных взаимоотношений между энзимами лимфоцитов.

МЕТОДИКА. Объектом исследования были 30 больных лимфосаркомой, в возрасте 42-56 лет, проходивших курс лечения в Отделении гематологии Онкологического научно-исследовательского института (Кишинёв). Все исследования были проведены до начала курсовой химиотерапии. Контрольной группой были 20 здоровых людей, соответствующего возраста. Материалом исследования служила периферическая кровь больных лимфосаркомой и здоровых людей. Лейкоциты и лимфоциты получали из периферической крови в двухступенчатом градиенте плотности фиколл-уротраста [16] с использованием силиконированной посуды. Микроскопический контроль чистоты получения фракций лейкоцитов и лимфоцитов проводили по методу Нохта. Эритроциты отбирали со дна пробирок и отмывали физиологическим раствором (0,85% NaCl, pH 7,4). Лизаты клеток получали инкубацией в течение 30 мин с 0,1% Тритон X-100 (конечная концентрация) и центрифугировали в течение 10 мин при 600 g. Активность ферментов определяли спектрофотометрически, используя Humalyzer 2000 DE. Активность глутатионредуктазы (ГР, КФ 1.6.4.2) определяли по методу Conn и Vennesland (1951) в нашей модификации [17], глутатиондегидроаскорбатредуктазы (ГДАР, КФ 1.8.5.1) - по ранее разработанному нами методу [18], гамма-глутамилтранспептидазы (ГГТ, КФ 2.3.2.2) - по методу Meister [19], глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ, КФ 1.1.1.44) - по методу Сейц и Лугановой [20] в плазме, лейкоцитах, лимфоцитах и эритроцитах периферической крови. Содержание белка определяли по методу Watanabe [21]. Статистическую обработку результатов проводили по методу Стьюдента с использованием пакета прикладных программ “Microstat” (Microsoft 2003, США). Коэффициенты ранговой корреляции рассчитывали по методу Спирмена.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Больные лимфосаркомой были распределены на 4 группы в зависимости от активности (стадии) патологического процесса. Результаты исследования глутатионзависимых ферментов и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в плазме и эритроцитах периферической крови больных лимфосаркомой и здоровых людей, представленные в таблице 1, свидетельствуют о значительном изменении удельных активностей всех энзимов как в плазме, так и в эритроцитах. Уровень активностей энзимов в плазме крови отражает состояние метаболизма не только клеток, циркулирующих в кровеносном

русле, но также поступивших в кровь из других тканей и органов. Повышение активности ГГТ у больных с IV-ой стадией болезни в 4 раза по сравнению с уровнем активности энзима у здоровых людей, вероятно, отражает общее состояние метаболизма. ГГТ, являясь энзимом, необходимым для многих процессов, а также индикаторным энзимом печени, нарушение функций которой часто наблюдается у больных лимфопролиферативными заболеваниями, характеризует существенное изменение обменных процессов в организме больных [6]. Анализ полученных результатов в эритроцитах показал значительное снижение удельных активностей всех энзимов у пациентов на первой стадии болезни по сравнению с их активностью у здоровых лиц. Тенденцию к повышению активностей энзимов в эритроцитах в зависимости от активности патологического процесса (I → IV) можно считать адаптационной в ответ на усиление перекисеобразования [7, 22]. Повышение активности ГДАР в эритроцитах больных может служить защитным механизмом для поддержания уровня аскорбиновой кислоты, необходимой для восстановления альфа-токоферола [23].

Таблица 1. Активность глутатионредуктазы, гамма-глутамилтранспептидазы, глутатиондегидроаскорбатредуктазы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в плазме и эритроцитах больных лимфосаркомой.

Материал	Стадия	n	ГР	ГГТ	ГДАР	ГФДГ
Плазма	Норма	20	0,019±0,001	0,584±0,077	0,162±0,014	0,024±0,005
Кровь	I	7	0,011±0,002*	1,069±0,183*	0,106±0,019*	0,008±0,001*
	II	7	0,015±0,002	1,361±0,137*	0,228±0,015*	0,021±0,003
	III	7	0,018±0,003	2,416±0,260*	0,223±0,024	0,034±0,006
	IV	9	0,032±0,005*	5,768±1,085*	0,297±0,023*	0,063±0,011*
	Норма	20	0,618±0,098	2,078±0,451	0,162±0,015	0,513±0,056
Эритроциты	I	7	0,343±0,065*	0,813±0,123*	0,108±0,019*	0,127±0,034*
	II	7	0,661±0,073	1,058±0,078*	0,229±0,016*	0,473±0,096
	III	7	1,105±0,131*	1,876±0,163	0,224±0,023	0,835±0,085*
	IV	9	2,293±0,268*	4,207±0,754*	0,297±0,022*	1,407±0,263*
	Норма	20	0,618±0,098	2,078±0,451	0,162±0,015	0,513±0,056

Примечание. Активности ГР, ГДАР и ГФДГ даны в кат/г белка; активность ГГТ - нМ/мин × г белка.
* - достоверность различий с нормой (p<0,05).

Удельная активность ГР в лимфоцитах больных лимфосаркомой (рис. 1) в начале заболевания (I стадия), и на более поздних стадиях болезни (II - IV) была ниже, чем у здоровых людей.

Удельная активность ГДАР в лимфоцитах больных с I и II стадией ЛС была существенно ниже активности этого фермента в лимфоцитах здоровых людей (рис. 1). Статистически достоверных отличий между уровнем активности ГДАР в лимфоцитах больных с III стадией болезни и уровнем активности фермента в лимфоцитах здоровых лиц не обнаружено. У пациентов с четвёртой стадией болезни активность фермента повышалась. ГДАР рассматривают, как энзиматический компонент двух защитных редокс-цепей клетки: регенерации альфа-токоферола и обезвреживания супероксидного радикала [23]. Очевидно, что для поддержания необходимого количества аскорбиновой кислоты, как биоантиоксиданта, требуется наличие постоянно действующей системы восстановления дегидроаскорбата [24].

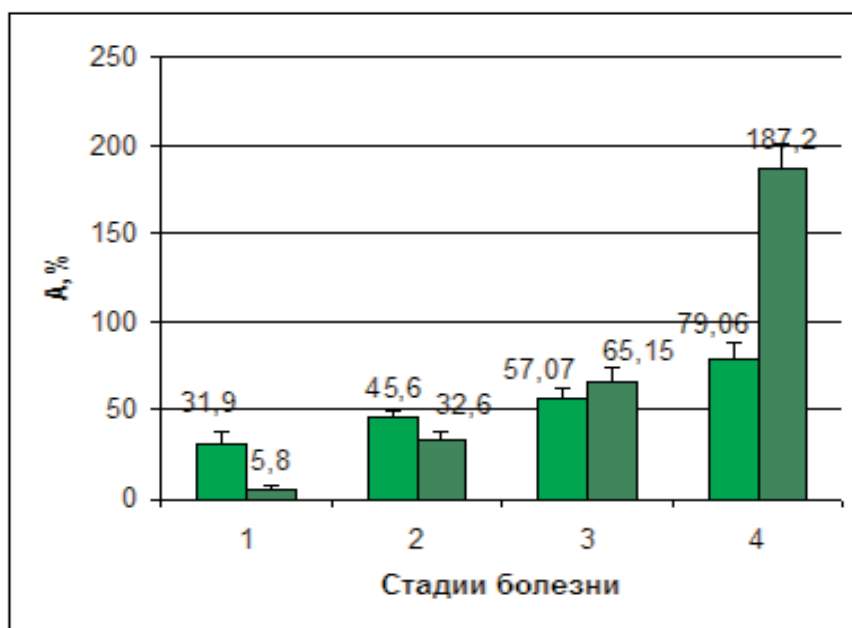


Рисунок 1.

Активность ГР и ГДАР в лимфоцитах больных лимфосаркомой. Активность ГР и ГДАР (кат/ г белка) (А) дана в относительных единицах (%) по отношению к контролю (100%). ГР - слева, ГДАР - справа. 1, 2, 3, 4 - стадии болезни.

ГГТ, мембранно-связанный фермент, необходим для транспорта аминокислот в клетки. Повышение активности ГГТ в лимфоцитах больных можно рассматривать, как механизм поступления глутатиона, необходимого для многих внутриклеточных процессов лимфоцитов, и как источник цистеина, необходимого для его участия в тиол-дисульфидном обмене белков и пептидов (рис. 2).

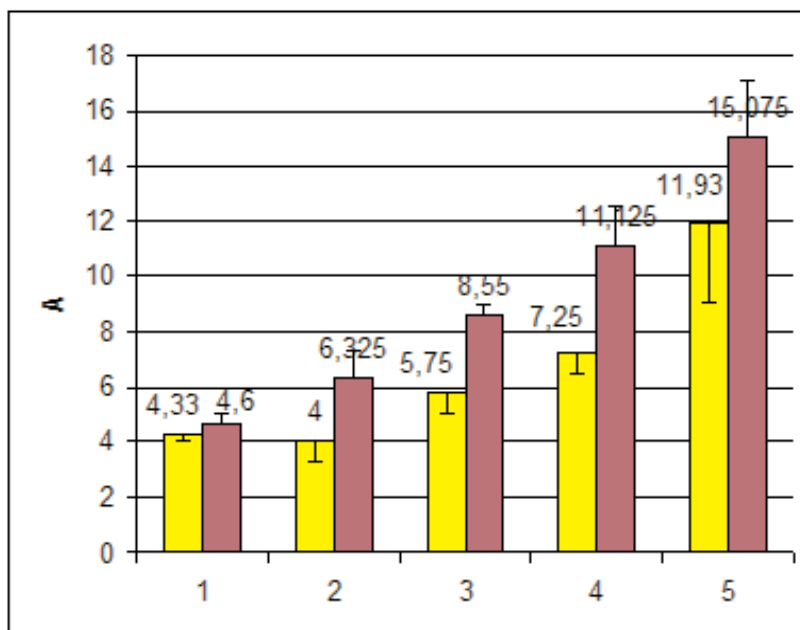


Рисунок 2.

Активность гамма-глутамилтранспептидазы в лимфоцитах и лейкоцитах больных лимфосаркомой. Активность фермента (А) дана в нМ/мин × г белка. 1 - здоровые; 2- I ; 3- II; 4-III; 5-IV-я стадии болезни. Слева-лейкоциты; справа-лимфоциты.

Для нормального функционирования ГР в клетке необходим NADPH, важнейшим поставщиком которого служит пентозо-фосфатный путь. Снижение активности ГР в лимфоцитах больных лимфосаркомой может способствовать повышению содержания окисленного глутатиона. Известно, что высокий уровень окисленного глутатиона при пероксидном стрессе активирует пентозный цикл [25]. С этой точки зрения снижение активности ГР может быть необходимо для регуляторных процессов. ГР связывает энзиматическое разрушение перекисей с гексозомонофосфатным путём метаболизма глюкозы, одним из ключевых энзимов которого является ГФДГ. Результаты исследования удельной активности ГФДГ в лимфоцитах больных лимфосаркомой показали её незначительное снижение на первой стадии болезни (рис. 3). У пациентов со II стадией наблюдалось незначительное повышение активности, активность фермента в лимфоцитах больных с III или IV стадией возрастала в 1,6 и 2,7 раз, соответственно. Пентозофосфатный путь окисления глюкозы является основным метаболическим путём образования пентоз (рибозо-5-фосфата), необходимых для синтеза мононуклеотидов. Мононуклеотиды являются субстратами синтеза нуклеиновых кислот (ДНК, РНК), коферментов (NAD, FAD), макроэргов (АТР, GTP), циклических нуклеотидов (3',5'-сАМР, 3',5'-сGMP). Поэтому, повышение активности ГФДГ, коррелирующее с уровнем активности патологического процесса у больных лимфосаркомой, можно объяснить возрастающими метаболическими потребностями лимфоцитов и лимфобластов.

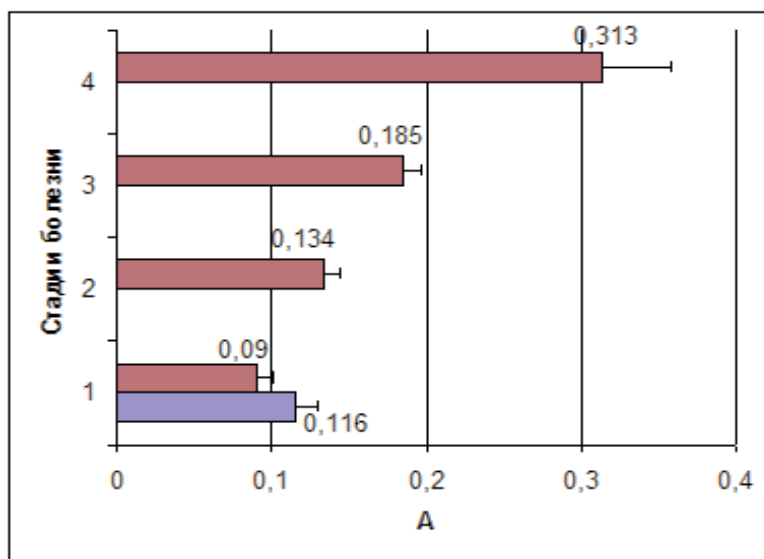


Рисунок 3.

Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в лимфоцитах больных лимфосаркомой.

Активность (А) дана в кат/г белка.

1-здоровые (внизу), I-я стадия болезни (вверху); 2 - II; 3- III; 4- IV-я стадии болезни.

Функционирование ГР в клетке сопряжено не только с ГФДГ, но и ГДАР и ГГТ, для которых восстановленный глутатион является коэнзимом. Принимая это во внимание, был проведён поиск корреляционных взаимоотношений между ГР и ГДАР, ГР и ГГТ, ГР и ГФДГ (табл. 2). Результаты поиска показали тесную функциональную связь между всеми энзимами в лимфоцитах здоровых людей. В лимфоцитах больных лимфосаркомой функциональная связь сохранялась только между ГР и ГФДГ с высоким уровнем надёжности ($p < 0,0005$). Нарушение функциональной связи между ГР, ГГТ и ГДАР в лимфоцитах пациентов свидетельствует о дисбалансе антиокислительной системы защиты и метаболизма.

ГЛУТАТИОНЗАВИСИМЫЕ ФЕРМЕНТЫ, ГФДГ В КРОВИ ПРИ ЛИМФОСАРКОМЕ

Таблица 2. Поиск корреляционных взаимоотношений между активностями ГР, ГГТ, ГДАР и ГФДГ в лимфоцитах больных лимфосаркомой.

Фермент	Здоровые			Больные		
	n	r	p	n	r	p
ГР-ГДАР	10	+0,911	<0,001	14	+0,099	>0,05
ГР-ГГТ	10	+0,744	<0,05	14	+0,292	>0,05
ГР-ГФДГ	10	+0,835	<0,005	16	+0,716	<0,0005

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Таким образом, основываясь на полученных результатах, можно сделать вывод: вариабельность величин активностей антиокислительных глутатионзависимых энзимов и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, дисбаланс между отдельными звеньями антиоксидантной системы защиты отражают метаболические перестройки не только в злокачественных клетках (лимфобластах), но и в других клетках периферической крови (лейкоцитах, эритроцитах). Определение активностей глутатионзависимых ферментов и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в крови больных лимфосаркомой могут быть дополнительным биохимическим тестом для дифференциальной диагностики активности (стадии) патологического процесса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Файнштейн Ф.Э., Козинец Г.И., Бахрамов С.М., Хохлова М.П. (1987) Болезни системы крови. Медицина, Ташкент.
2. Дыгай А.М., Гольдберг Е.Д., Шахов В.П., Ивасенко И.Н., Хлусов И.А. (1992) Гематология и трансфузиология, **1**, 3-5.
3. Ляшенко В.А., Дроженников В.А., Молотковская И.М. (1988) Механизмы активации иммунокомпетентных клеток. Медицина, М.
4. Петров Р.В., Павлюк А.С., Ковальчук Л.В., Заречнева Н.В., Ульянова Т.Ю. (1989) Интерлейкин-зависимые механизмы формирования иммунопатологических состояний. В: Механизмы иммунорегуляции и иммунная биотехнология. Москва, с.4-12.
5. Han Y.J., Kwon Y.G., Chung H.T., Lee S.K., Simmons R.L., Biliar T.R., Kim Y.M. (2001) Nitric Oxide, **5**(5), 504-513.
6. Dreher D., Junod A.F. (1996) Eur. J. Cancer, **32**, 30-38.
7. Lightfoot T.J., Skibola C.F., Smith A.G., Forrest M.S., Adamson P.J., Morgan G.J. (2006) Haematologica, **91**(9), 1222-1227.
8. Hayes J.D., Ellis E.M., Neal C.E. (1999) Cellular response to cancer chemopreventive agents: contribution of the antioxidant responsive elements to the adaptive response to oxidative and chemical stress. In: Cellular Responses to Stress (C.P. Downes, C.R. Wolf and D.P. Lane, eds.) Biochemical Society Symposium, **64**, Portland Press, London, pp. 141-168.
9. Paolicchi A., Dominici S., Pieri L. (2002) Biochem. Pharmacol., **64**(5-6), 1027-1035.
10. Kerridge I., Lincz L., Scorgie F., Hickey D., Granter N., Spencer A. (2002) Br. J. Haematol., **118**(2), 477-481.

11. *Acworth I.N., McCabe D.R., Maher T.J.* (1997) The analysis of free radicals, their reaction products, and antioxidants. In: *Oxidants, Antioxidants and Free Radicals* (S.I. Baskin and H. Salem, eds.), Taylor and Francis, Washington and London, pp. 23-77.
12. *Armstrong J.S., Steinauer K.K., Hornung B., Irish J.M., Lecane P., Birrell G.W.* (2002) *Cell Death Differ.*, **9**(3), 252-263.
13. *Октябрьский О.Н., Смирнова Г.В.* (2007) *Биохимия*, **72**(2), 132-145.
14. *Gra O.A., Glotov A.S., Nikitin E.A.* (2008) *Am. J. Hematol.*, **83**(4), 279-287.
15. *Bracht K., Liebeke M., Ritter C.A., Griinert R., Bednarski P.J.* (2007) *Anticancer Drugs*, **18**(4), 389-404.
16. *Бейум А.М.* (1980) Лимфоциты: выделение, фракционирование и характеристика (пер. с англ.). Мир, М., с. 9-19.
17. *Панченко Л.Ф., Герасимов А.М., Коев Я.М., Королёва Л.А.* (1975) *Фармакология и токсикология*, №3, 334-337.
18. *Герасимов А.М., Королёва Л.А., Иванова Л.И., Панченко Л.Ф.* (1979) *Вопросы мед. химии*, №4, 447-451.
19. *Meister A., Tate S.S., Griffith O.W.* (1981) *Methods Enzymol.*, **77**, 237-253.
20. *Сейц И.Ф., Луганова И.С.* (1967) Метод определения активности глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы в лейкоцитах. В: *Биохимия клеток крови*. М., с. 113-114.
21. *Watanabe N., Kamei S., Ohkuto A., et al.* (1986) *Clin. Chemistry*, **32**, 1551-1554.
22. *Abou-Seif M.A., Rabia A., Nasr M.* (2000). *Clin. Chem. Lab. Med.*, **38**(8), 737-742.
23. *May J.M., Qu Z.C., Mendiratta S.* (1998) *Arch. Biochem. Biophys.*, **349**(2), 281-289.
24. *May J.M., Qu Z.C., Cobb C.E.* (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**(15), 14975-14982.
25. *Giblin F., Wies D., Reddy V.* (1981) *Exp. Eye Res.*, **33**(3), 289-298.

Поступила: 18. 07. 2008.

GLUTATHIONE-DEPENDENT ENZYMES AND GLUCOSE-6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE OF BLOOD IN PATIENTS WITH LYMPHOSARCOMA (NON-HODGKIN'S DISEASE)

L.A. Gavriluc, I.F. Corcimar, M.V. Robu, L.T. Lisii

State University of Medicine and Pharmacy "N.Testemitanu", Bul. Stefan cel Mare, 165, Chisinau,
Moldova, MD 2004; . tel: +37322-205-404; e-mail: gavrlu@mail.ru

Activities of glutathione-dependent enzymes and glucose-6-phosphate dehydrogenase (GPDH) were studied in blood of the patients with lymphosarcoma (LS). The activity of glutathione reductase (GR), glutathione dehydroascorbate reductase (GDAR), gamma-glutamyltranspeptidase (GGT) and G6PDH in plasma, leucocytes, lymphocytes and erythrocytes of peripheral blood in 30 patients (42-56 years) with LS and in 20 healthy have been determined with spectrophotometric methods (Humalyzer 2000 DE). Leucocytes and lymphocytes were separated from blood using Boyum method. Spearman method used for correlative analysis. The levels of enzymes activity and results of correlative analysis showed an imbalance of antioxidative system defense and metabolic disturbances in patients with LS. The strong functional interrelation was estimated only between GR and G6PDH in the patients' lymphocytes ($r=+0,716$; $p<0.0005$). Interrelation was found between the levels of activity of antioxidative enzymes and activity (stage) of pathologic process, this may be used as the additional biochemical test for differential diagnostics of LS and estimation of the cells proliferative activity.

Key words: lymphosarcoma, glutathione reductase, glutathione dehydroascorbate reductase, gamma-glutamyltranspeptidase, glucose-6-phosphate dehydrogenase.