

МЕДИЦИНСКИЕ НАУКИ**ФЕРМЕНТНАЯ РЕДОКС-СИСТЕМА ГЛУТАТИОНА В КРОВИ БОЛЬНЫХ ЛИМФОГРАНУЛЕМАТОЗОМ**

*Гаврилюк Людмила Александровна,
доктор медицинских наук, профессор,
Государственный университет медицины и фармации
им. Николая Тестемицану,
Республика Молдова, г. Кишинёв*
*Чухрий Ольга Васильевна
студент-дипломник 6-го курса лечебного факультета,
Государственный университет медицины и фармации
им. Николая Тестемицану, г. Кишинёв, Молдова*

ENZYMATIC REDOX-SYSTEM OF GLUTATHIONE IN THE BLOOD IN PATIENTS WITH LYMPHOGRANULEMATOSIS

*Gavriliuc Ludmila,
Doctor of medical science, Professor,
N.Testemitanu State University of Medicine and Pharmacy,
Cuhrii Olga,
Student of the 6 cours of General Medicine Department,
N.Testemitanu State University of Medicine and Pharmacy,
Chisinau, Moldova*

АННОТАЦИЯ

Антиоксидант глутатион и его ферментная редокс-система, включающая глутатионредуктазу и глутатионпероксидазу, играют важную роль в защите клеточных мембран от перекисного окисления липидов (ПОЛ). В исследовании участвовали 25 больных лимфогранулематозом (30-63 лет) до начала терапии и 20 здоровых лиц соответствующего возраста. В плазме крови и лимфоцитах определяли активность глутатионредуктазы и глутатионпероксидазы. Найдена прямая корреляция между активностью глутатионзависимых ферментов и активностью патологического процесса у больных лимфогранулематозом.

ABSTRACT

The antioxidant glutathione and its enzymatic redox-system, including glutathione reductase and glutathione peroxidase, play very important role in the protection of cell membranes against peroxide oxidation of lipids (POL). The study involved 25 patients (30-63 years) with lymphogranulematosis and 20 healthy individuals. The activity of glutathione reductase and glutathione peroxidase were determined in the blood plasma and lymphocytes. Between activity of glutathione dependent enzymes and activity of pathologic process in patients with lymphogranulematosis was found a direct correlation.

Ключевые слова: глутатионредуктаза, глутатионпероксидаза, лимфогранулематоз.

Keywords: glutathione reductase, glutathione peroxidase, lymphogranulematosis.

Лимфома Ходжкина (лимфогранулематоз) - это злокачественное заболевание лимфоидной ткани, характерным признаком которого является наличие гигантских клеток Рид-Березовского-Штернберга, обнаруживаемых при микроскопическом исследовании поражённых лимфатических узлов. Основная причина, приводящая к возникновению злокачественных лимфом (лимфосарком) остаётся не совсем ясной [1, с. 6-7; 11, с. 35-37]. Однако некоторые эпидемиологические данные говорят об инфекционно-вирусной природе лимфом [2, с. 706]. Другими факторами, вызывающими

эту болезнь, могут быть генетическая предрасположенность и воздействие химических веществ [3, с. 21].

У больных лимфогранулематозом наблюдается хронический «*окислительный стресс*», при котором повышено образование активных форм кислорода, усилены процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) клеточных мембран, наблюдается нарушение многих биохимических процессов [8, с. 210].

В промоторах многих генов найден «*антиокислительный ответственный элемент*» (*antioxidant responsive element, ARE*), с

помощью которого может происходить индукция генов, отвечающих за синтез энзимов, представляющих систему антиокислительной защиты от окислительного стресса [9, с. 142-143]. При активации (индукции) генов с помощью ARE, происходит повышение антиоксидантной и антитоксической функций клеток, как защита от образующихся в организме эндотоксинов и поступающих извне экзотоксинов, которые могут повысить риск возникновения лимфопролиферативных заболеваний, к которым относится лимфогранулематоз (болезнь Ходжкина) [16, с. 25-26].

Одним из важных звеньев антиоксидантной системы защиты организма является ферментная редокс-система глутатиона. Эта глутатионзависимая система также необходима для процессов дифференцировки и деления клеток, поддержания тиол-дисульфидного обмена, устранения свободных радикалов кислорода, перекисей и гидроперекисей жирных кислот и липидов клеточных мембран [5, с. 203-204; 7, с. 1058]. Также хорошо известно, что изменение состояния ферментной редокс-системы глутатиона определяет чувствительность опухолевых клеток к лекарственным препаратам, применяемым в курсе химиотерапии [6, с. 220-221; 17, с. 296].

Цель исследования: провести сравнительный анализ взаимосвязи между уровнем активности глутатионзависимых ферментов, глутатионредуктазы и глутатионпероксидазы, и активностью патологического процесса у больных лимфогранулематозом.

Материал и методы исследования.

25 больных возрастом от 30 до 63 лет, проходивших курс лечения в Отделении Гематологии Онкологического Института Молдовы, были исследованы до начала терапии. В группу сравнения входили 20 здоровых лиц соответствующего возраста. В процессе наблюдения были соблюдены все этические нормы согласно Положению о порядке проведения клинических исследований.

Материалом для исследования была периферическая кровь больных лимфогранулематозом (болезнь Ходжкина) и здоровых людей.

Перед взятием крови у больного в пробирку вносили антикоагулянт (1 мл 5% цитрата натрия). Лимфоциты получали из периферической крови в двухступенчатом градиенте плотности фиколл-уротраста по методу A. Vouum [14, с. 11] с использованием силиконированной посуды. Микроскопический контроль чистоты получения фракции лимфоцитов проводили по методу Нохта. Лизаты клеток (лимфолизаты) получали инкубацией в течение 30 мин с 0,1% Тритон X-100 (конечная концентрация) и центрифугировали в течение 15 мин при 5000 оборотов/мин.

Определение содержания белка, активности глутатионредуктазы (ГР) и глутатионпероксидазы (ГП) проводили, используя спектрофотометр Humalyzer 2000 (DE). Содержание белка определяли по методу Watanabe N. [13, с. 1552]. Активности ГР определяли по методу Horn H. [10, с. 877], ГП – Paglia D., Valentine W. [12, с. 160-161]. Статистическую обработку результатов проводили по методу Стьюдента с использованием пакета прикладных программ "Microstat" (Microsoft, 2007, США).

Результаты исследований и их обсуждение

Больные лимфогранулематозом были распределены на 4 группы в зависимости от активности патологического процесса (стадии болезни). Полученные в исследовании результаты активности ферментов были рассчитаны в международных единицах (МЕ), отнесённых к содержанию белка (г). Таким образом, активность всех ферментов представлена, как удельная активность (МЕ/г).

Глутатионредуктаза (ГР). Активность ГР в плазме крови представлена на *рис. 1*. Как видно, активность энзима у больных на первой стадии болезни была значительно ниже (46,7%; $p < 0,05$), чем у здоровых людей (100%). На второй (91,9%) и третьей (83,8%) стадиях болезни у больных активность энзима была значительно выше, чем на первой, но ниже контроля, понижаясь на четвёртой стадии (71,1%; $p < 0,05$).



Рисунок 1. Активность ГР в плазме крови больных лимфогранулематозом. Примечание. МЕ – международные единицы; МЕ/г белка – удельная активность фермента

Определение активности ГР в лимфоцитах больных (рис. 2.) показало её низкий уровень на первой стадии болезни (36,2%; $p < 0,05$). По мере прогрессирования патологического процесса активность фермента повышалась, достигая уровня активности ГР в лимфоцитах здоровых людей только на четвёртой стадии болезни (117,9%).

Плазма крови отражает состояние не только клеток периферической крови, но тканей и органов всего организма. Тем не менее,

динамика активности ГР у больных лимфогранулематозом в плазме крови имеет такой же характер, как и в лимфоцитах периферической крови.

Ранее, в работе Гаврилюк Л.А. и соавт. (2009) описана такая же картина полученных результатов определения активности ГР в плазме и эритроцитах пациентов с болезнью Ходжкина, наблюдаемых до начала лечения [15, с. 11-12].

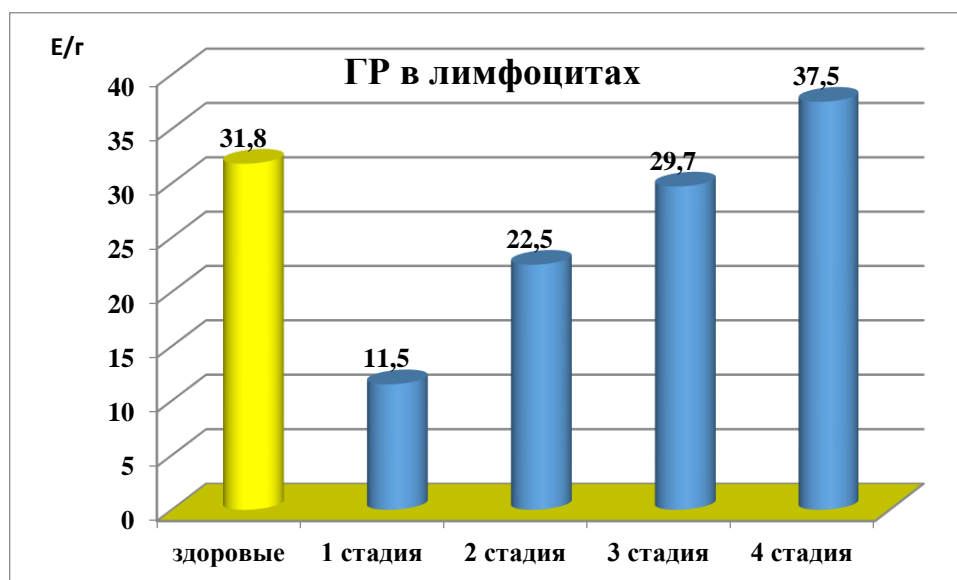


Рисунок 2. Активность ГР в лимфоцитах больных лимфогранулематозом

ГР является единственным энзимом, восстанавливающим окисленный глутатион в его восстановленную форму. Все остальные глутатионзависимые ферменты окисляют его, используя в качестве кофермента (глутатионтрансфераза, глутатионпероксидаза, гамма-

глутамилтрансфераза). Наблюдаемое повышение её активности на поздних стадиях болезни, по-видимому, диктуется метаболической потребностью клеток.



Рисунок 3. Активность ГП в плазме крови у больных лимфогранулематозом

Глутатионпероксидаза (ГП). Результаты исследования активности ГП в плазме крови больных лимфогранулематозом (рис. 3.) в сравнении с активностью энзима в плазме крови здоровых людей статистически достоверно ($p < 0,05$) были значительно ниже на всех

стадиях болезни (I-25,9%; II-59,5%; III-43,2%; IV-65,6%).

На рис. 4 представлены результаты активности ГП в лимфоцитах больных лимфогранулематозом. Полученные результаты свидетельствовали о низкой активности энзима на всех стадиях болезни.

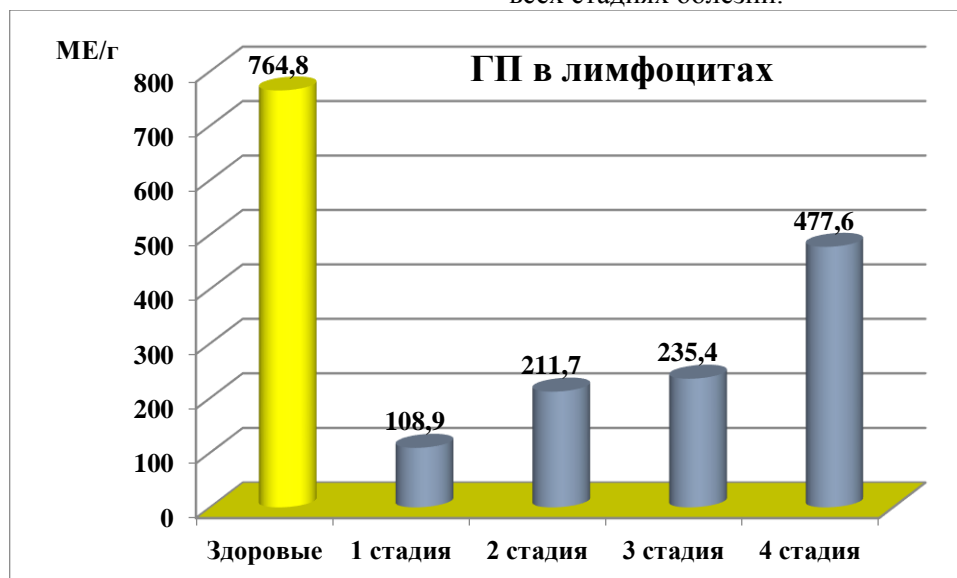


Рисунок 4. Активность ГП в лимфоцитах больных лимфогранулематозом

Güven M. и соавт. (2000), определяя активность ГП в плазме и эритроцитах крови больных лимфогранулематозом, нашли, что её уровень был ниже уровня активности энзима в плазме и эритроцитах здоровых людей [8, с. 210-211]. К сожалению, авторами не было указано, на какой стадии патологического процесса находились исследуемые больные. Полученные Güven M. и соавт. результаты совпадают с нашими результатами.

Таким образом, результаты исследования показали, что у больных лимфогранулематозом (болезнь Ходжкина) наблюдался дисбаланс активности глутатионзависимых ферментов, ГР и ГП, в плазме и лимфоцитах периферической крови. Уровни активности ГР и ГП коррелировали с активностью (стадий: I→IV) патологического процесса у больных лимфогранулематозом (болезнь Ходжкина).

Список литературы:

1. Aditya Bardia. Johns Hopkins Patients' Guide to Lymphoma. Jones and Bartlett Learning, 2010, P. 6-12.
2. Alexander F.E., Jarrett R.F., Cartwright R.A. Epstein-Barr virus and HLA-DPB1-*0301 in young adult Hodgkin's disease: evidence for inherited susceptibility to Epstein-Barr virus in cases that are EBV (+ve). //Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev., 2001, Vol. 10, P. 705-709.
3. American Cancer Society. Surveillance Research, 2015.
4. Arai M., Imai H., Koumura T. Mitochondrial phospholipid hydroperoxide: glutathione peroxidase plays a major role in preventing oxidative injury to cells. // J. Biol. Chem., 1999, Vol. 274, N8, P. 4924-4933.
5. Aruoma O.I. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease.// J. Am. Oil Chem. Soc., 1998, Vol. 75, P. 199-212.
6. Erden M., Bor N.M. Changes in reduced glutathione, glutathione reductase, and glutathione peroxidase after radiation.// Biochem. Med., 1984, Vol. 31, N2, P. 217-227.
7. Filomeni G., Rotilio G., Ciriolo M.R. Cell signaling and the glutathione redox system.// Biochem. Pharmacol., 2002, Vol. 64, P. 1057-1064.
8. Guven M., Ozturk B., Sayal A., Ozet A. Lipid peroxidation antioxidant system in the blood of patients with Hodgkin's disease.// Clin. Biochem., 2000, Vol. 33, N3, P. 209-212.
9. Hayes J.D., Ellis E.M., Neal C.E. Cellular response to cancer chemopreventive agents: contribution of the antioxidant responsive elements to the adaptive response to oxidative and chemical stress. In: Downes C.P. et al., eds. Cellular responses to stress biochemical society symposium, 64, London: Portland Press, 1999, P. 141-168.
10. Horn H.D. Glutathione reductase. In: Bergmeyer H.-U., ed. Methods of enzymatic analysis. N.Y.: Academic Press; 1963, P. 875-879.
11. Jaffe E.S., Harris N.L., Vardiman J.W., Campo E., Arber D.A. Hematopathology (1st ed), Elsevier Saunders, 2011.
12. Paglia D.E., Valentine W.N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase.// J. Lab. Clin. Med., 1967, Vol. 70, P. 158-169.
13. Watanabe N., Kamei S., Ohkuto A. Urinary protein as measured with pyrogallol red-molibdate analyzer.// Clin. Chem., 1986, Vol. 32, P. 1551-1554.
14. Бейум А.М. Лимфоциты: выделение, фракционирование и характеристика. (пер. с англ.), М: Мир, 1980, С. 9-19.
15. Гаврилюк Л.А., Корчмару И.Ф., Робу М.В. Активность глутатионзависимых энзимов и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в крови больных лимфогранулематозом.// Гематол. и трансфузиолог., 2009, Том 54, №2, С. 11-14.
16. Дёмина Е.А., Тумян Г.С., Унукова Е.Н., Кондратьева Н.Е. Современные возможности лечения первичных больных лимфомой Ходжкина и причины неудач лечения.// Онкогематология, 2007, №2, С. 24-30.
17. Капланов К.Д., Шипаева А.А., Васильева В.А. Международный прогностический индекс при распространённых стадиях лимфомы Ходжкина в условиях современной терапии.// Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. 2013, Том 6, №3, С. 294-301.