

УДК 517.121:612

© Н. М. Ёлкина, В. В. Казакова, С. В. Коношенко, Н. Е. Загноенко, 2009.

ХАРАКТЕР ИЗМЕНЕНИЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ОБМЕНА ГЛЮКОЗЫ И АКТИВНОСТИ МЕМБРАННОЙ K^+ , Na^+ - АТФ-АЗЫ В ЭРИТРОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА В УСЛОВИЯХ МОДЕЛИРОВАНИЯ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА И ПРИ ПАТОЛОГИИ

Н. М. Ёлкина, В. В. Казакова, С. В. Коношенко, Н. Е. Загноенко

Кафедра биохимии (зав. – профессор С. В. Коношенко) Таврического национального университета им. В. И. Вернадского, г. Симферополь.

Кафедра медицинской биологии (зав. – профессор К.Л. Лазарев) Крымского государственного медицинского университета им. С.И. Георгиевского, г. Симферополь.

CHARACTER OF CHANGES OF GLUCOSE EXCHANGE INDEXES AND MEMBRANE K^+ , Na^+ - ATP-ASE ACTIVITY IN HUMAN ERYTHROCYTES UNDER MODEL OXIDATIVE STRESS AND PATHOLOGY

N. M. Yolkina, V.V. Kazakova, S.V. Konoshenko, N. E. Zagnoenko

SUMMARY

It has been shown that under initiation of oxidative reactions with the share of oxygen active forms *in vitro* and under cirrhosis of liver – illness with oxidative stress – the metabolic changes, connected with glucose utilization and energy exchange are realized in human erythrocytes.

At the same time, the activity of membrane K^+ , Na^+ - ATP-ase is raised.

ХАРАКТЕР ЗМІН ПОКАЗНИКІВ ОБМІНУ ГЛЮКОЗИ І АКТИВНОСТІ МЕМБРАННОЇ K^+ - Na^+ - АТФ-АЗИ В ЕРИТРОЦИТАХ ЛЮДИНИ ЗА УМОВ МОДЕЛЮВАННЯ ОКИСНЮВАЛЬНОГО СТРЕСУ ТА ЗА ПАТОЛОГІЇ

Н. М. Ёлкина, В. В. Казакова, С. В. Коношенко, Н. Е. Загноенко

РЕЗЮМЕ

Встановлено, що за умово ініціації окиснювальних реакцій за участю активних форм кисню *in vitro* та за патології, що характеризується розвитком окиснювального стресу, в еритроцитах людини відбуваються метаболічні зміни, які пов'язані з утилізацією глюкози і енергообміном, підсилюється активність мембранної K^+ , Na^+ - АТФ-ази.

Ключевые слова: эритроциты, метаболизм глюкозы, энергообмен, K^+ , Na^+ - АТФ-аза, окислительный стресс, патология.

Проблема окислительного стресса является одной из наиболее актуальных в современной биологии и медицине [2, 6]. Развитие окислительного стресса осуществляется в результате нарушения прооксидантно-антиоксидантного равновесия и, как следствие, усиленного генерирования активных форм кислорода (АФК), действие которых направлено, прежде всего, на клеточные мембраны, липиды, белки и другие органические соединения [5, 3]. Окислительный стресс выявляется при многих заболеваниях и патологических состояниях организма человека [2, 4].

В связи с проблемой окислительного стресса важно понять не только механизм гиперпродукции свободных радикалов в клетках разного типа, но и характер регуляции в них метаболизма, формирования защитных реакций, направленных на

восстановление гомеостаза в экстремальных условиях [10]. В связи с этим, целью работы явилось изучение отдельных показателей обмена глюкозы и функционального состояния эритроцитов, находящихся в условиях генерирования АФК *in vitro* и при заболевании, характеризующимся развитием окислительного стресса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследований служили эритроциты доноров станции переливания крови (40 человек), а также больных циррозом печени (30 человек). С целью моделирования окислительного стресса *in vitro* эритроциты практически здоровых людей помещали в среду Фентона, генерирующую АФК (10 мМ $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ и 3 мМ H_2O_2) [3]. Эритроциты инкубировали в этих условиях в течение 2-х и 4-х часов при 37°C. Гемолиз эритроцитов

проводили по методу Драбкина [9]. Интенсивность гликолитических реакций в эритроцитах оценивали по уровню фосфоенолпирувата (ФЕП) и АТФ, содержание которых определяли при помощи методов, описанных в литературе [1]. Активность мембранной K^+ , Na^+ - АТФ-азы в эритроцитах определяли спектрофотометрическим методом [8].

Статистическую обработку экспериментальных данных выполняли с использованием стандартных методов статистики.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При изучении показателей обмена глюкозы в эритроцитах, находящихся в условиях инициации окислительных реакций с участием АФК (инкубация в среде Фентона) были получены данные, представленные в табл. 1. Показано, что при инкубации эритроцитов в среде Фентона в течение 2-х часов содержание в них фосфоенолпирувата снижается на 15,4 % по сравнению с контролем. При более длительной инкубации эритроцитов (4 часа) уровень ФЕП снижается на 46,15 % по сравнению с контролем и на 36,4 % по сравнению с предыдущим значением показателя (2 часа инкубации). Это свидетельствует о снижении интенсивности гликолитического пути утилизации глюкозы в эритроцитах, что наиболее выражено между 2-мя и 4-мя часами их инкубации в среде Фентона. Отмеченные изменения могут быть обусловлены как усиливающейся интенсификацией свободно-радикальных реакций в эритроцитах, так и большей "чувствительностью" отдельных гликолитических ферментов (вероятно, ферментов промежуточного звена гликолиза) к действию АФК.

Содержание АТФ в эритроцитах в этих условиях также снижалось: на 39,6 % через 2 часа инкубации и на 54,17 % через 4 часа инкубации по сравнению с контролем. Наиболее выраженное снижение содержания АТФ отмечено через 2 часа инкубации эритроцитов в среде Фентона. В целом, прослеживается более интенсивное снижение содержания в эритроцитах АТФ по сравнению с фосфоенолпируватом.

Снижение уровня ФЕП и АТФ в эритроцитах сопровождается увеличением активности мембранной K^+ , Na^+ - АТФ-азы. Так, через 2 часа инкубации эритроцитов в среде Фентона активность фермента возрастала на 27,3 %, тогда как через 4 часа инкубации – на 59,1 % по сравнению с контролем.

Наиболее выраженное увеличение активности фермента отмечается через 2 часа инкубации эритроцитов. Прослеживается хорошо выраженная обратная связь в динамике изменения уровня АТФ и активности K^+ , Na^+ - АТФ-азы.

На основании этих данных можно предположить, что наибольшие траты энергии в эритроцитах, связанные, в частности, с работой K^+ , Na^+ - "помпы", приходится на первые 2 часа инкубации в среде, генерацией АФК. В этот период инкубации в эритроцитах могут развиваться компенсаторные реакции, направленные на сохранение K^+ , Na^+ - баланса и функциональной активности эритроцитов. В дальнейшем, при возрастающем генерировании АФК, компенсаторные возможности эритроцитов истощаются, снижается уровень АТФ в связи с его меньшим образованием и продолжающимся расходом энергии.

Таблица 1

Содержание ФЕП и АТФ и активность мембранной K^+ , Na^+ - АТФ-азы в эритроцитах в условиях инициации окислительных реакций *in vitro*

Показатели	Контроль	Инкубация эритроцитов в среде Фентона в течение	
		2-х часов	4-х часов
ФЕП, ммоль $\Phi \cdot \text{л}^{-1}$	$0,13 \pm 0,005$	$0,11 \pm 0,006^*$	$0,07 \pm 0,005^*$
АТФ, ммоль $\Phi \cdot \text{л}^{-1}$	$0,144 \pm 0,003$	$0,087 \pm 0,002^*$	$0,066 \pm 0,002^*$
Активность K^+ , Na^+ - АТФ-азы, мкмоль $\Phi \cdot \text{н} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мл}^{-1}$	$0,044 \pm 0,006$	$0,056 \pm 0,008$	$0,070 \pm 0,01^*$

* - достоверность различия по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

В эритроцитах больных циррозом печени содержание ФЕП и АТФ (табл.2.) было выше уровня контрольной группы (в 8,0 и 2,7 раза, соответственно).

Вместе с этим, как и при инкубации эритроцитов в среде Фентона, содержание АТФ в эритроцитах больных отличается меньшим содержанием по

сравнению с фосфоенолпируватом, что может быть связано с повышением энергозатрат эритроцитов при данном заболевании.

Обращает на себя внимание тот факт, что в эритроцитах больных циррозом печени также наблюдается увеличение активности мембранной K^+ , Na^+ - АТФ-азы (в 2 раза по сравнению с контрольной группой доноров).

Полученные данные свидетельствуют о том, что в условиях инициации окислительных реакций с

участием АФК *in vitro* и при циррозе печени, характеризующимся развитием окислительного стресса [7], в эритроцитах человека осуществляются метаболические изменения, связанные с использованием глюкозы и энергообменом. Характер изменений изученных показателей является отражением неравноценных возможностей адаптации к действию АФК изолированных эритроцитов и эритроцитов при соответствующей патологии.

Таблица 2

Содержание ФЕП и АТФ и активность мембранной K^+ , Na^+ - АТФ-азы в эритроцитах больных циррозом печени

Обследованные группы	ФЕП, ммоль Фн·л ⁻¹	АТФ, ммоль Фн·л ⁻¹	Активность K^+ , Na^+ - АТФ-азы, мкмоль Фн·мин ⁻¹ ·мл ⁻¹
Контрольная группа	0,130 ± 0,005	0,144 ± 0,003	0,044 ± 0,006
Больные циррозом печени	1,05 ± 0,02*	0,390 ± 0,018	0,09 ± 0,01*

* - достоверность различия по сравнению с контрольной группой доноров ($p < 0,05$).

ВЫВОДЫ

1. В условиях моделирования окислительного стресса *in vitro* в эритроцитах снижается интенсивность гликолитического пути утилизации глюкозы и возрастают энергозатраты, связанные, в частности, с функционированием мембранной K^+ , Na^+ - АТФ-азы.

2. При циррозе печени (заболевание с развивающимся окислительным стрессом) в эритроцитах больных отмечается интенсификация гликолиза и повышение активности мембранной K^+ , Na^+ - АТФ-азы, что может иметь определенное компенсаторное значение.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алейникова Т.А., Рубцова Т.В. Руководство к практическим занятиям по биологической химии. – М.: Высшая школа, 1988. – 223 с.
2. Владимиров Ю.А. Активные формы кислорода и азота: значение для диагностики, профилактики и терапии // Биохимия. – 2004. – Т. 69, вып. 1. – С. 5-7.
3. Дубинина Е.Е., Гавровская С.В., Кузьмич Е.В. и др. Окислительная модификация белков: окисление триптофана и образование битирозина в очищенных белках с использованием системы Фентона // Биохимия. – 2002. – Т. 67, вып. 3. – С. 413-421.
4. Меншиков Е.Б., Зенков Н.К. Окислительный стресс при воспалении // Усп. совр. биол. – 1997. – Т. 117, № 2. – С. 155-169.

5. Пескин А.В. Взаимодействие активного кислорода с ДНК // Биохимия. – 1997. – Т. 62, № 12. – С. 1571-1578.

6. Плетюшкина О.Ю., Фетисова Е.К., Лямзаев К.Г. и др. Пероксид водорода, образуемый внутри митохондрий, участвует в передаче апоптозного сигнала от клетки к клетке // Биохимия. – 2006. – Т. 71, № 1. – С. 75-84.

7. Толкачёва Н.В. Альбумин-зависимый транспорт липидов при различных состояниях организма // Автореф. дисс. докт. биол. наук. – Москва. 1991. – 50 с.

8. Толстухина Т.И. Определение Na, K – активируемой Mg-зависимой АТФ-азной активности в субклеточных фракциях // Методы биохимических исследований. – Л.: ЛГУ. – 1982. – С. 258-260.

9. Drabkin D. A simplified technique for large scale crystallization of myoglobin and haemoglobin in the crystalline // Arch. Biochem. – 1949. – V. 21. – P. 224-226.

10. Ullrich O., Ciftci O., Hass R. Proteasome activation by poly-ADP-ribose-polymerase in human myelomonocytic cells after oxidative stress // S. Free Radic. Biol. And Med. – 2000. – V. 29, № 10. – P. 995-1004.