С. М. ТЕР-ОГАНЕСЯН

АКТИВНОСТЬ ГЕКСОКИНАЗЫ, ФОСФОГЛИЦЕРАЛЬДЕГИД-
ДЕГИДРОГЕНАЗЫ, ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ И ГЛЮКОЗО-6-
ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В ЭРИТРОЦИТАХ И ЛЕЙКОЦИТАХ
БОЛЬНЫХ ОСТРЫМ ЛЕЙКОЗОМ И ХРОНИЧЕСКИМ
МИЕЛОЛЕЙКОЗОМ

Лейкозы являются системным заболеванием кроветворной ткани. По мнению большинства исследователей, лейкозы относятся к группе заболеваний неопластической природы. Для лейкозов характерным является гиперплазия кроветворной ткани и утрата лейкоцитами способности к дифференциации и созреванию.

За последние годы широко изучаются обменные процессы и активность ферментов в лейкоцитах при лейкозах [3, 6, 10, 11, 14].

Исследованиями этих авторов было выявлено понижение активности некоторых гликолитических ферментов в лейкоцитах.

Неизбежным осложнением при лейкозе можно считать анемию, развивающуюся в различной степени. За последние годы интенсивно изучаются механизмы, приводящие к развитию анемии. До настоящего времени патогенез анемии при лейкозе нельзя считать полностью выясненным. Однако некоторые авторы, применяя хром-51 для метки эритроцитов, показали, что продолжительность жизни эритроцитов при остром и хроническом миелолейкозе значительно уменьшена [2, 15, 17].

Сведения о биохимии эритроцитов при лейкозе ограничиваются единичными работами [4, 5, 16], касающимися исследования активности отдельных ферментов в эритроцитах при лейкозе. Можно предположить, что при лейкозе наступают изменения и других биохимических свойств красных кровяных телец.

Поскольку структурная целостность клетки непосредственно связана с регуляцией обмена веществ и энергии, а гликолиз является основным процессом, определяющим образование богатых энергией соединений в безъядерных эритроцитах человека, мы исследовали интенсивность этого процесса. Было показано, что в эритроцитах периферической крови при остром лейкозе и хроническом миелолейкозе суммарная скорость гликолиза и содержание компонентов адениловой системы увеличено [7].

Для расширения представлений о биохимических свойствах эритроцитов при лейкозе мы исследовали активность ферментов гликоли-

за-гексокиназы (ГК), глицеральдегидфосфатдегидрогеназы (ФГАД) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ), а также глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФД). Исследовались эритроциты больных острым лейкозом и хроническим миелолейкозом при выраженной анемии до лечения.

Наряду с изучением активности ферментов в эритроцитах для сравнительной биохимической оценки форменных элементов крови нами проводилось параллельное определение активности исследуемых ферментов в лейкоцитах.

Венозную кровь больных острым и хроническим миелолейкозом заготавливали с цитратом натрия. Эритроциты отделяли центрифугированием, а затем трижды отмывали физиологическим раствором. Гемолизаты эритроцитов получали разрушением водой отмытых эритроцитов в отношении 1 : 150. При исследовании активности ферментов к реакционной смеси добавляли 1 мл гемолизата, что соответствовало 0,0066 мл эритроцитов. Общий объем пробы—3 мл.

Исследовалась активность ферментов в лейкоцитах при лейкоэмических вариантах острого лейкоза и хронического миелолейкоза. Содержание белых клеток в периферической крови было не менее 50000 в 1 мл. Для ускорения оседания эритроцитов применяли высокомолекулярный поливиниловый спирт с молекулярным весом 31000—37000.

Кровь доноров заготавливали на 5%-ном растворе цитрата натрия с добавлением 4,5%-ного раствора поливинилового спирта (16 мл поливинилового спирта доводили цитратом натрия до 100 мл); отношение раствора в крови составило 1:4. После осторожного перемешивания кровь оставлялась в течение 45—50 мин. при комнатной температуре. За это время происходит полное оседание эритроцитов. В плазме во взвешенном состоянии оставались тромбоциты и лейкоциты. Плазму отбирали в мерные силиконированные пробирки и центрифугировали в рефрижераторной центрифуге при 4°C в течение 6—7 мин. при 800 оборотах в минуту. При этом на дне пробирки оседают лейкоциты с небольшой примесью эритроцитов, а в плазме остаются во взвешенном состоянии тромбоциты. Затем отбирали плазму, к осадку добавляли 0,87%-ный раствор хлористого аммония для гемолиза эритроцитов. После центрифугирования при тех же условиях выделялись лейкоциты без примеси эритроцитов. Объем, занимаемый лейкоцитами во взвеси, определяли в гематокрите. Лейкоциты лизировали добавлением 100 мг% раствора сапонина в отношении 1 : 5 и воды в отношении 1 : 15 (к 0,1 мл лейкоцитов добавляли 0,5 мл сапонина и 1,5 мл воды) на холоду в течение 1—2 ч. Содержание лейкоцитов в опытной смеси—0,006 мл.

Активность дегидрогеназы-фосфоглицеринового альдегида (ФГАД—К. Ф. 1.2.1.9.) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ—К. Ф. 1.1.1.27) определяли по методу Ву и Рекер [18], дегидрогеназы глюкозо-6-фосфата (Г-6-ФД—К. Ф. 1.1.1.1.49)—по Корнберу и Хоррекеру [13], гексокиназы (Г. К.—К. Ф. 2.7.1.1.)—по методу Гриньяни и Лёра [12]. В случае значительной активности ферментов в лейкоцитах лизат разводили

от 2 до 4 раз. При определении активности ЛДГ плазму больного разводили в отношении 1:4. Аналогичные исследования по определению активности ферментов проводили в эритроцитах здоровых людей. Активность ЛДГ у доноров определяли в неразведенной плазме. Об активности ФГАД судили по накоплению, а ЛДГ—по убыли восстановленного никотинамидадениндинуклеотида (НАД-Н₂), об активности Г-6-ФД—по накоплению восстановленного никотинамидадениндинуклеотидфосфата (НАДФ-Н₂), измеряя поглощение при 340 мкм на СФ-4А. Измерение активности ферментов проводили при 25°.

Результаты опытов выражены в μM на 1 мл эритроцитов или лейкоцитов и обработаны статистически.

Было обнаружено, что при остром лейкозе активность ФГАД в эритроцитах значительно повышена по сравнению с нормой. Аналогичные результаты получены в эритроцитах больных хроническим миелолейкозом (табл. 1). Активность ЛДГ в эритроцитах больных острым лейкозом почти в два раза больше по сравнению с нормой. При хроническом миелолейкозе активность ЛДГ несколько меньше, чем при остром лейкозе (табл. 1). Исследованиями М. Б. Свенцицкой и О. Д. Романовой-Цхворебовой [5] не было обнаружено изменения активности ЛДГ в эритроцитах больных различными формами лейкоза.

Таблица 1

Активность ферментов в эритроцитах здоровых людей, больных острым лейкозом и хроническим миелолейкозом. Результаты выражены в μM образующегося НАДН₂ (для ФГАД), НАДФ, Н₂ (для Г-6-ФД) и израсходованного НАД·Н₂ (для ЛДГ) за 1 минуту на 1 мл эритроцитов

Фермент	Активность ферментов доноров	Активность ферментов больных острым лейкозом	Активность ферментов больных хроническим миелолейкозом
ФГАД	1,77 ± 0,07 (10)	3,06 ± 0,07 (15)	3,03 ± 0,07 (10)
ЛДГ	5,86 ± 0,034 (10)	10,78 ± 0,62 (15)	0,33 ± 0,4 (10)
ЛДГ в плазме	0,035 ± 0,04 (10)	0,135 ± 0,012 (15)	0,153 ± 0,016 (10)
Г-6-ФД	1,34 ± 0,02 (10)	1,8 ± 0,14 (8)	0,7 ± 0,03 (7)
			2,89 ± 0,07 (10)

В скобках отмечено число опытов.

Несмотря на то, что Г-6-ФД в эритроцитах находится в небольшом количестве, роль этого фермента в обмене эритроцитов очень велика. Недавно работами И. С. Асриян и Н. Б. Черняк [1, 8, 9] было установлено значительное снижение или полное отсутствие активности Г-6-ФД в эритроцитах при некоторых формах гемолитической анемии (фавизм), а при пароксизмальной ночной гемоглобинурии (болезнь Маркиафава Микели) активность этого фермента не отличалась

от нормы или была несколько увеличена. Одновременно авторами было выявлено наличие двух популяций эритроцитов в периферической крови при болезни Маркиафава Микели, различающихся по своим биохимическим показателям, причем большая активность исследовавшихся ферментов и интенсивность гликолиза связаны с неустойчивой частью эритроцитов. Так как при остром лейкозе и обострениях хронического миелоидного лейкоза развивается анемия, мы сочли целесообразным определение активности Г-6-ФД у исследуемых нами больных. При определении содержания Г-6-ФД в эритроцитах больных острым лейкозом у одних больных отмечается незначительное повышение активности этого фермента, у других—значительное уменьшение. Так, например, из 15 обследованных больных с резко выраженной анемией у 7 было отмечено значительное снижение активности Г-6-ФД по сравнению с нормой (табл. 1). При хроническом миелоидном лейкозе активность Г-6-ФД была значительно повышена у всех обследуемых больных. Исследованиями И. С. Лугановой и И. Ф. Сейца [4] было обнаружено понижение активности Г-6-ФД в эритроцитах больных острым лейкозом и повышение при хроническом миелоидном лейкозе. Содержание этого фермента имеет большое значение для сохранения целостности эритроцитов. При недостаточности Г-6-ФД нарушается образование НАДФ-Н₂, что приводит к прекращению образования восстановленного глутатиона, который играет большую роль в поддержании SH-содержащих ферментов в восстановленном состоянии и поддержании структурной целостности эритроцитов. Можно предположить, что эритроциты больных острым лейкозом с пониженным содержанием Г-6-ФД склонны к более быстрому разрушению.

Повышение активности ЛДГ обнаружено не только в эритроцитах, но и в плазме всех обследуемых больных острым лейкозом и хроническим миелоидным лейкозом (табл. 1). При остром лейкозе активность ЛДГ в плазме значительно возрастает иногда в 6—7 раз, а при хроническом миелоидном лейкозе—8 раз.

При сравнении активности ферментов в лейкоцитах здоровых людей с отчетливостью видно, что их активность намного превышает таковую в эритроцитах здоровых людей.

Из исследуемых ферментов в лейкоцитах самая низкая активность характера для гексокиназы. По данным Бека [10], гексокиназа является ферментом, ограничивающим скорость гликолиза в лейкоцитах здоровых людей и больных лейкозом. Нами было выявлено понижение активности ГК в лейкоцитах при остром лейкозе. При хроническом миелоидном лейкозе, по нашим данным, активность ГК еще больше снижена. Активность ФГАД в лейкоцитах при остром лейкозе несколько снижена, еще меньше она при хроническом миелоидном лейкозе. При остром лейкозе активность ЛДГ в лейкоцитах резко снижена, еще меньше она при хроническом миелоидном лейкозе. При определении содержания Г-6-ФД в лейкоцитах больных острым лейкозом мы

выявили, что активность фермента вдвое понижена. При хроническом миелолейкозе активность этого фермента понижена в меньшей степени (табл. 2). Имеются данные, указывающие на понижение активности Г-6-ФД в лейкоцитах при лейкозе [3, 10].

Таблица 2

Активность ферментов в лейкоцитах здоровых людей, больных острым и хроническим миелолейкозом. Результаты выражены в μM образующегося НАД-Н₂ (для ФГАД), НАДФ-Н₂ (для Г-6-ФД, ГК) и израсходованного НАД-Н₂ (для ЛДГ) за 1 минуту на 1 мл лейкоцитов

Исследуемый фермент	Активность ферментов доноров	Активность ферментов больных острым лейкозом	Активность ферментов больных хроническим миелолейкозом
ГК	$2,12 \pm 0,03$ (10)	$1,27 \pm 0,06$ (10)	$0,8 \pm 0,03$ (10)
ФГАД	$4,73 \pm 0,011$ (10)	$4,2 \pm 0,12$ (10)	$3,08 \pm 0,08$ (10)
ЛДГ	$27,2 \pm 1,13$ (10)	$14,55 \pm 0,9$ (10)	$11,06 \pm 0,52$ (10)
Г-6-ФД	$13,54 \pm 0,43$ (10)	$6,78 \pm 0,42$ (10)	$10,2 \pm 0,24$ (10)

В скобках отмечено число опытов.

В ы в о д ы

1. В эритроцитах больных острым лейкозом обнаружено повышение активности фосфолицеральдегиддегидрогеназы (ФГАД) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ). Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФД) в эритроцитах у части этих больных несколько повышена по сравнению с нормой, у части—понижена.

2. В эритроцитах больных хроническим миелолейкозом обнаружено повышение активности фосфолицеральдегиддегидрогеназы (ФГАД), лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФД).

3. В лейкоцитах больных острым лейкозом активность гексокиназы (ГК), фосфолицеральдегиддегидрогеназы (ФГАД), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФД) значительно понижена.

При хроническом миелолейкозе снижение активности указанных ферментов в лейкоцитах выражено более отчетливо, чем при остром лейкозе, снижение же активности Г-6-ФД более выражено при остром лейкозе.

4. Активность ЛДГ в плазме резко увеличена у всех обследуемых больных как при остром, так и при хроническом миелолейкозе.

Ս. Մ. ՏԵՐ-ՉՈՎԶԱՆԵՍՅԱՆ

ՍՈՒՐ ԼԵՅԿՈԶՈՎ ԵՎ ԽՐՈՆԻԿԱԿԱՆ ՄԻԵԼՈԼԵՅԿՈԶՈՎ ՀԻՎԱՆԴՆԵՐԻ ԷՐԻԹՐՈ-ՑԻՏՆԵՐՈՒՄ ԵՎ ԼԵՅԿՈՑԻՏՆԵՐՈՒՄ ՀԵՔՍՈԿԻՆԱԶԱՅԻ, ՖՈՍՖՈԳԼԻՑԵՐԱԼԴԵ-ՀԻԴ-ԴԵՂԻԴՐՈԳԵՆԱԶԱՅԻ, ԼԱԿՏԱՏ-ԴԵՂԻԴՐՈԳԵՆԱԶԱՅԻ ԵՎ ԳԼՅՈՒԿՈԶԱ 6-ՖՈՍՖԱՏ ԴԵՂԻԴՐՈԳԵՆԱԶԱՅԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅՈՒՆՆԸ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Ուսումնասիրված է 15 սուր լեյկոզով և 10 խրոնիկական միելոլեյկոզով հիվանդների և 40 լոնորների էրիթրոցիտներում և լեյկոցիտներում գտնվող գլիկոլիտիկ ֆերմենտների (հեքսոկինազա—ՀՔ, ֆոսֆոգլիցերալդեհիդ-դեհ-հիդրոգենազա—ՖԳԱԴ, լակտատ-դեհիդրոգենազա—ԼԴՂ, գլյուկոզա-6-ֆոսֆատ դեհիդրոգենազա—Գ-6-ՖԴ) ակտիվությունը:

Հետազոտությունից պարզվել է, որ առողջ մարդկանց մոտ ուսումնասիրված ֆերմենտների ակտիվությունը անհամեմատ ավելի բարձր է լեյկոցիտներում, քան էրիթրոցիտներում:

Սուր լեյկոզով և խրոնիկական միելոլեյկոզով տառապող հիվանդներին էրիթրոցիտներում ՖԳԱԴ-ի և ԼԴԴ-ի ակտիվությունը բարձրացել է:

Գ-6ՖԴ-ի ակտիվությունը էրիթրոցիտներում բարձրացել է սուր լեյկոզով հիվանդների կեսի մոտ, իսկ մնացած կեսի մոտ զգալիորեն իջել է:

Խրոնիկական միելոլեյկոզով հիվանդների էրիթրոցիտներում Գ-6-ՖԴ-ի ակտիվությունը բարձրացել է:

Սուր լեյկոզի դեպքում լեյկոզատների ՀՔ-ի, ՖԳԱԴ-ի, ԼԴՂ-ի ակտիվությունը զգալիորեն իջել է, իսկ խրոնիկական միելոլեյկոզի ժամանակ առավել ևս: Հակառակ դրան, Գ-6-ՖԴ-ի ակտիվությունը ավելի իջել է սուր լեյկոզի, քան խրոնիկական միելոլեյկոզի ժամանակ:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Асриян И. С. Вопросы медицинской химии, 1967, XIII, 6, 623.
2. Климова Н. Ф., Лорие Ю. И., Шитикова М. Г. Материалы докладов III Всесоюзной конференции по пересадке тканей и органов. Ереван, 1963.
3. Луганова И. С., Сейц И. Ф. Вопросы онкологии, 1964, X, 7, 38.
4. Луганова И. С., Сейц И. Ф. Сборник трудов Ленинградского института гематологии и переливания крови, II. Л., 1966, 57.
5. Свенцицкая М. Б., Романова-Цхворебова О. Д. Вопросы медицинской химии, 1968; XIV, 4, 343.
6. Сейц И. Ф., Луганова И. С. Биохимия клеток крови и костного мозга в норме и при лейкозах. Л., 1967.
7. Тер-Оганесян С. М. Сборник научных трудов института гематологии и переливания крови, XI—XII. Ереван, 1968, 459.
8. Черняк Н. Б., Асриян И. С. Вопросы медицинской химии, 1968, XIV, 1, 54.
9. Черняк Н. Б., Асриян И. С. Вопросы медицинской химии, 1968, XIV, 5, 483.
10. Beck W. S. J. Biol. chem., 1958, 232, 251.
11. Engelhardt-Gölkel A., Ehrhard-Seitz W., Woller J. Klin. Wschr., 1958, 36, 576.
12. Grignani F., Löhr G. W. Klin. Wschr., 1960, 38, 796.
13. Kornberg A., Horecker B. L. Meth. Enzymol., 1955, 1, 393.

14. Löhr G. W., Waller H. D., Bock H. E. Verh. Dtsch. Ges. inn. Med. München, 1960.
15. Nathan D. G., Berlin N. J. Blood, 1959, 14, 935.
16. Vetter K. Folia Haematol., 1961, 6, 80.
17. Wetherley-Mein G., Epstein I. S., Foster W. D., Grimes A. J. Brit. J. Haematol. 1958, 4, 281.
18. Wu R., Racker E. J. Biol. Chem., 1959, 234, 1029.