

С. М. ТЕР-ОГАНЕСЯН

АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ ФОСФОГЛИЦЕРАЛЬДЕГИД- ДЕГИДРОГЕНАЗЫ, ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ И ГЛЮКОЗО-6- ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В ЭРИТРОЦИТАХ БОЛЬНЫХ АНЕМИЕЙ ДЕФИЦИТНОГО ГЕНЕЗА

Изучалась активность ферментов фосфоглицеральдегиддегидрогеназы, лактатдегидрогеназы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в эритроцитах больных анемией дефицитного генеза. Всего обследовано 42 больных, из коих 22—железодефицитной анемией, 10—витамином В₁₂-дефицитной анемией и 10 больных—гемолитической анемией. Выявлено повышение активности ферментов в эритроцитах больных с витамином В₁₂-дефицитной анемией. Более значительное повышение активности исследуемых ферментов наблюдалось в эритроцитах больных гемолитической анемией.

Современная клиническая биохимия характеризуется широким внедрением методов определения активности ферментов, поскольку все большее распространение получает теория, согласно которой патологические процессы представляют собой в конечном счете энзимопатии.

Несмотря на значительные успехи, достигнутые в самые последние годы, представляется очевидным, что в области энзимопатологии открыты лишь самые первые страницы. Исследованиями зарубежных и советских авторов было показано, что в патогенезе так называемых врожденных несфероцитарных гемолитических анемий типа I по Сельвину и Дейчи лежит резкое снижение или полное отсутствие фермента глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы [5, 6, 10]. Установленная новая нозологическая единица является первой в серии энзимопенических гемолитических эритропатий, обнаруженных за последнее время.

Нашими предыдущими исследованиями было выявлено значительное снижение активности в эритроцитах у части больных острым лейкозом с резко выраженной анемией [3]. В связи с этим считаем целесообразным изучить активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в эритроцитах больных анемией дефицитного генеза. Ожидались изменения не только в активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы как ключевого фермента гликолиза, являющегося основным источником энергии в безъядерных эритроцитах человека.

В доступной нам литературе мы не встречали работ по изучению ферментативного спектра в эритроцитах больных анемией дефицитного генеза. Имеющиеся литературные данные посвящены в основном изучению плазменных ферментов при пернициозной анемии [9, 11]. Между тем определение активности ферментов в эритроцитах играет важную роль в дифференциальной диагностике различных форм анемии.

В задачу наших исследований входило изучение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.49), фосфоглицеральдегиддегидрогеназы (КФ 1.2.1.9) и лактатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.27) в эритроцитах исследуемых больных. В связи с противоречивыми литературными данными относительно активности ферментов вышеуказанные исследования проводились также в эритроцитах доноров.

Всего обследовано 42 больных, из коих 22—железодефицитной анемией, 10—витамин В₁₂-дефицитной анемией и 10 больных—гемолитической анемией, находившихся в гематологической клинике Института. Активность ферментов определяли в гемолизатах, полученных разрушением водой отмытых эритроцитов в отношении 1:150.

Кровь заготавливали на 5%-ном растворе цитрата натрия в отношении 1:9, центрифугировали при 4°C в течение 15 мин. при 3000 об/мин. Плазму с содержащимися в ней тромбоцитами, слой лейкоцитов и верхний слой эритроцитов удаляли. Эритроциты 2—3 раза промывали физиологическим раствором при тех же условиях центрифугирования.

С целью определения активности ферментов пользовались гемолизатами эритроцитов, для получения которых 0,1 мл отмытых вышеуказанным способом эритроцитов гемолизировали в 14,9 мл дистиллированной воды. Активность ферментов фосфоглицеральдегиддегидрогеназы (ФГАД) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ) определяли по методу Ву и Реккер [12] и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФД) — по Корнбергу и Хореккеру [8].

Для определения ФГАД реакционная смесь состояла из 0,05 М рН—7,5 трис буфера—0,9 мл; $1,5 \cdot 10^{-2}$ М арсената натрия—0,1 мл; $1 \cdot 10^{-3}$ М ЭДТА—0,1 мл; $3 \cdot 10^{-4}$ М НАД—0,1 мл; алдолазы—0,2 мл 80 мкг. К реакционной смеси добавляли 1 мл гемолизата. Непосредственно перед определением активности фермента добавляли в качестве субстрата 0,06 М фруктозо-дифосфата (натриевая соль) —0,5 мл. Общий объем пробы составлял 3 мл.

Состав реакционной смеси для определения ЛДГ: 0,05 М рН—7,5 трис буфера—1,8 мл; $1 \cdot 10^{-4}$ М НАД.Н₂—0,1 мл. К реакционной смеси добавляли 1 мл гемолизата. Перед определением активности фермента добавляли в качестве субстрата $3 \cdot 10^{-3}$ М пируват натрия —0,1 мл.

Опытная смесь для определения Г-6-ФД состояла из 0,05 М рН—7,5 трис буфера; 0,1 М MgCl₂—0,5 мл; $1,5 \cdot 10^{-3}$ М НАДФ—0,15 мл; 0,65 мл дистиллированной воды. К инкубационной смеси добавляли 1 мл гемолизата. Перед определением активности фермента добавляли 0,02 М глюкозо-6-фосфата (калиевая соль) —0,2 мл. Измерение проводили при 25°C через одну минуту в течение 10 мин.

Активность ферментов определяли спектрофотометрическим методом при 340 мкм. Об активности ФГАД судили по образованию восстановленного никотинамидадениндинуклеотида (НАД.Н₂); ЛДГ — по убыли НАД.Н₂; Г-6-ФД — по образованию восстановленного никотинамидадениндинуклеотидфосфата (НАДФ.Н₂). Результаты исследования

выражали в микромолях превращения НАД.Н₂ или НАДФ.Н₂ в 1 мин/мл эритроцитов.

Диагноз больных был подтвержден на основании клинико-лабораторных исследований. У больных железодефицитной анемией была констатирована анемия, выраженная в различной степени. Содержание гемоглобина варьировало от 6 до 8,7 г%, количество эритроцитов колебалось в пределах от 1.180.000 до 3.120.000 в 1 мм³. Со стороны лейкоформулы особых изменений не отмечалось. Содержание железа в сыворотке исследуемых больных было резко понижено до 21 мг%.

Группа больных с витамин В₁₂-дефицитной анемией характеризовалась наличием анемии с содержанием гемоглобина от 6 до 9 г%. Количество эритроцитов колебалось в пределах от 1.180.000 до 3.000.000 в 1 мм³. Костный мозг характеризовался значительным увеличением количества мегалобластов.

В группе больных с гемолитической анемией двое больных были с диагнозом Маркиафава-Микели — ночной гемоглобинурии и трое — с приобретенной аутоиммунной гемолитической анемией. Содержание гемоглобина варьировало от 6 до 9 г%, количество эритроцитов от 1.500.000 до 2.700.000 в 1 мм³. В результате повышенного гемолиза имелось увеличение содержания непрямого билирубина от 2,6 до 20,48 мг%. Костный мозг характеризовался эритрономобластной реакцией.

Изучение активности ферментов в эритроцитах больных железодефицитной анемией показало, что активность ЛДГ повышена у 5 из 22 исследуемых больных по сравнению с нормой; средняя активность ЛДГ в эритроцитах больных составляла 19,0 μ М НАД.Н₂, у доноров 14,0 μ М НАД.Н₂. У 4 больных активность ЛДГ в эритроцитах была понижена в среднем до 7,7 μ М НАД.Н₂, у остальных больных активность этого фермента находилась в пределах нормы. Активность ЛДГ определялась не только в эритроцитах, но и в плазме всех обследуемых больных. В плазме здоровых людей активность ЛДГ незначительна — 0,058 μ М НАД.Н₂ на 1 мл плазмы за 1 мин. Активность ЛДГ в плазме больных железодефицитной анемией увеличена только у двух из 22 — до 1,0 μ М НАД.Н₂, у остальных больных — в пределах нормы.

Фермент ФГАД катализирует окислительную реакцию, занимающую центральное место в процессе гликолиза. Средняя активность ФГАД в эритроцитах здоровых людей составляет 1,6 μ М НАД.Н₂. В эритроцитах всех обследованных больных активность этого фермента значительно повышена до 3,0 μ М НАД.Н₂.

Активность первого фермента пентозного цикла — Г-6-ФД в эритроцитах доноров составляет 1,7 μ М НАДФ.Н₂. В эритроцитах больных активность этого фермента увеличена у 13 из 22 обследованных больных и составляет в среднем 2,9 μ М, у остальных 9 больных — в пределах нормы (табл. 1).

Нами не было выявлено определенной связи между степенью выраженности анемии и активностью ферментов в эритроцитах больных железодефицитной анемией.

Таблица I

Активность ферментов в эритроцитах здоровых людей, больных железодефицитной, витамин В₁₂-дефицитной анемией и гемолитической анемией

Исследуемая группа	ЛДГ (в эритроцитах)	ЛДГ (в плазме)	Г-6-ФД	ФГАД
Доноры	14±0,44 (20)	0,058±0,04 (50)	1,7±0,02 (20)	1,6±0,07 (20)
Больные железодефицитной анемией (22)	19,0±0,46 (5)	0,1 (2)	2,9±0,07 (13)	3,0±0,07 (22)
	14,0±0,40 (13)	0,058±0,04 (20)	1,7±0,06 (9)	
	7,7±0,21 (4)			
Больные В ₁₂ -дефицитной анемией (10)	14,0±0,44 (10)	0,14±0,01 (10)	2,6±0,06 (10)	2,6±0,05 (5)
Больные гемолитической анемией (10)	22,0±1,0 (3)	0,3 ±0,02 (10)	3,1±0,0 (10)	3,0±0,07 (10)
	14 ±0,41 (7)			

Примечание. Результаты выражены в мкмольх образующегося НАД·Н₂ для ФГАД, НАДФ·Н₂ (для Г-6-ФД) и израсходованного НАД·Н₂ (для ЛДГ) за 1 мин. на 1 мл эритроцитов.

В скобках указано число исследований.

В группе больных витамин В₁₂-дефицитной анемией активность ЛДГ в эритроцитах находилась в пределах нормы. В отличие от гипохромной анемии в плазме больных витамин В₁₂-дефицитной анемией активность плазменной ЛДГ резко повышена и доходит в среднем до 0,14 мкм НАД·Н₂ при норме 0,058 мкм НАД·Н₂.

Полученные нами результаты о повышении плазменной ЛДГ больных пернициозной анемией совпадают с данными ряда авторов [7, 11].

Активность ФГАД повышена у 5 из 10 обследованных больных и доходит в среднем до 2,6 мкм НАД·Н₂, у остальных—в пределах нормы. Повышена также активность Г-6-ФД в эритроцитах всех обследованных больных до 2,6 мкм НАДФ·Н₂ при норме 1,7 мкм НАДФ·Н₂ на 1 мл эритроцитов/мин. (табл. 1).

Активность ЛДГ больных с гемолитической анемией была повышена у 3 из 10 обследованных, у остальных находилась в пределах нормы. В плазме всех больных гемолитической анемией активность ЛДГ резко повышена. Средняя активность ЛДГ в плазме доноров составляет 0,3 мкм НАДФ·Н₂ при норме 0,058 мкм НАД·Н₂.

У всех больных гемолитической анемией активность ФГАД повышена. Средняя активность ЛДГ в плазме больных составляет 0,3 мкм НАД·Н₂ при норме 0,058 мкм НАД·Н₂.

Активность Г-6-ФД у всех обследованных больных этой группы значительно повышена и в среднем доходит до 3,1 мкм НАДФ·Н₂. Следует отметить, что ни в одном случае нами не было выявлено значительного понижения или полного отсутствия Г-6-ФД в эритроцитах больных гемолитической анемией, что говорит об отсутствии случаев фавизма или лекарственной гемолитической анемии среди обследованных нами больных.

Исследованиями Н. Б. Черняк и И. С. Асриян [4] также было выявлено повышение активности Г-6-ФД в эритроцитах при болезни Маркиафава Микели.

Определение Г-6-ФД в эритроцитах при гемолитических анемиях, протекающих с внутрисосудистым гемолизом, имеет важное значение для энзиматической дифференциальной диагностики фавизма, лекарственных гемолитических анемий от болезни Маркиафава Микели.

Помимо этого, по активности отдельных энзимов в эритроцитах можно заключить о возрасте эритроцитов, продолжительности их жизни и их строении. Чем выше активность энзимов, тем моложе возрастная популяция эритроцитов.

Таким образом, из вышеизложенного можно заключить, что активность гликолитических ферментов пентозного цикла в эритроцитах и плазме различается при различных формах анемии. Если активность ЛДГ в плазме больных железодефицитной анемией нормальная, то при пернициозной анемии и гемолитической анемии она значительно повышена. Одновременное повышение активности ФГАД и Г-6-ФД также более выражено при гемолитической анемии. Разница в активности плазменного фермента ЛДГ и эритроцитарных ферментов ФГАД и Г-6-ФД может послужить важным тестом для дифференциальной диагностики различных форм анемии.

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что повышенная активность эритроцитарных ферментов более выражена при гемолитической анемии и связана с наличием молодой возрастной популяции эритроцитов.

Определение активности вышеуказанных ферментов в эритроцитах имеет важное значение не только для дифференциальной диагностики отдельных форм анемии, но и для оценки функционального состояния эритроцитов при различных формах анемии.

Армянский институт гематологии
и переливания крови

Поступила 27/IV 1971 г.

Ա. Մ. ՏԵՐ-ՀՈՎՀԱՆԵՆՅԱՆ

ԱՄԵԱԶՐԱՏՆԵՐԻ ՓՈՆԱՆԱԿՈՒԹՅԱՆ ՖԵՐՄԵՆՏՆԵՐԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ ԴԵՖԻՑԻՏԱՅԻՆ ԾԱԳՈՒՄ ՈՒՆԵՑՈՂ ՍԱԿԱՎԱՐՅՈՒՆ ՀԻՎԱՆԴՆԵՐԻ ԷՐԻԹՐՈՑԻՏՆԵՐՈՒՄ

Ա. մ. փ. ռ. ի. մ.

Ուսումնասիրվել է 70 դոնորների և 42 հիվանդների (22՝ երկաթ-դիֆիցիտային, 10՝ վիտամին B₁₂-դեֆիցիտային, 10՝ հեմոլիտիկ սակավարյունությունների հիվանդներ) էրիթրոցիտների և արյան պլազմայի մի քանի ֆերմենտների ակտիվությունը:

Պարզվել է, որ տարբեր սակավարյունության ժամանակ փոփոխվում է ուսումնասիրված ֆերմենտների ակտիվությունը էրիթրոցիտներում և պլազմայում: Երկաթ-դեֆիցիտային սակավարյունության ժամանակ ԼԴՀ-ի ակտիվությունը պլազմայում նորմալի սահմանում է, մինչդեռ վիտամին B₁₂-դեֆիցիտային և հեմոլիտիկ սակավարյունության ժամանակ այն բավական բարձր է: Հեմոլիտիկ սակավարյունության դեպքում ավելի արտահայտված է ՖԳԱԴ-ի և Գ-6-ՖԴ-ի ակտիվությունն էրիթրոցիտներում:

Ուսումնասիրված ֆերմենտների ակտիվությունը տարբերությունը պլազմայում և էրիթրոցիտներում կարող է կարևոր ցուցանիշ դառնալ տարբեր սակավարյունության դիֆերենցիալ ախտորոշման հարցում:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Алексеев Г. А. Вестник АМН СССР, 1968, 4, стр. 81.
2. Воробьев А. И. Дисс. канд. Казань, 1963.
3. Тер-Оганесян С. М. Журнал экспериментальной и клинической медицины АН Арм. ССР, 1969, 3, стр. 44.
4. Черняк Н. Б., Асриян И. С. Вопросы медицинской химии, 1968, 1, стр. 54.
5. Beutler E. Amer. J. clin. Path., 1967, 47, 303.
6. Carson P. E., Flanagan C. L., Ickes C. E. Science, 1956, 124, 484.
7. Emerson P. M., Withycome W. A., Wilkinson J. H. Brit. J. Haematol., 1967, 5, 656.
8. Kornberg A., Horecker B. Acad. Press. N. J., 1955, 1, 323.
9. Lohr G. W., Waller H. D. Klin. Wchnsch., 1958, 36, 865.
10. Sansone G., Segni G. Boll. Soc. Ital. Biol. Sperum., 1956, 32, 456.
11. Stein I. Blood., 1967, 6, 876.
12. Wu R., Racker E. J. Biol. Chem., 1959, 234, 1029.