

УДК 616—006.446+612.111

С. М. ТЕР-ОГАНЕСЯН

БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ
ПРИ ОСТРОМ ЛЕЙКОЗЕ

Одним из ведущих симптомов лейкоза является анемия, нередко приводящая больного к трагическому финалу. Патогенез анемии, сопутствующей лейкозу, до настоящего времени не совсем ясен.

В последнее время стало возможным получение достоверных сведений о сокращении продолжительности жизни эритроцитов у больных лейкозом при помощи метки клеток радиоактивным хромом (Cr^{51}) с последующим наблюдением за сроком исчезновения их из крови [1, 6, 12]. Причины этой неполноценности эритроцитов при лейкозе до настоящего времени окончательно не установлены.

Высказывается предположение, что разрушение эритроцитов при лейкозе связано с повышенной функциональной нагрузкой эритроцитов вследствие уменьшения их количества [4]. Отмечается также возможность образования костным мозгом неполноценных эритроцитов с укороченной продолжительностью жизни [1, 5].

Можно предположить, что повышенное разрушение эритроцитов при лейкозе тесно связано с изменением биохимических свойств эритроцитов.

В литературе имеются лишь единичные работы, посвященные изучению биохимических свойств эритроцитов при лейкозе, в частности активности отдельных ферментов эритроцитов [7, 9, 14]. Энергетический обмен в эритроцитах не изучен.

Хорошо известно, что сохранение структурной целостности клетки тесно связано с поддержанием обмена веществ и энергии на определенном уровне. Основным процессом, определяющим образование богатых энергией соединений в безъядерных эритроцитах, является гликолиз.

Можно предположить, что одной из причин, приводящих к разрушению эритроцитов при лейкозе, является нарушение обмена энергии.

В связи с этим нами исследовалась интенсивность гликолиза, содержание компонентов адениловой системы и активность ферментов в эритроцитах больных острым лейкозом.

Определялась активность гликолитических ферментов—фосфоглицеральдегиддегидрогеназы (ФГАД), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), а

также гликозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФД)—фермента пентозного цикла.

Исследованию подвергнуты эритроциты 25 больных острым лейкозом в стадии резко выраженной анемии.

В связи с противоречивыми данными в литературе, касающимися интенсивности гликолиза, содержания компонентов адениловой системы, а также активности ферментов в эритроцитах здоровых людей, указанные определения проводились в эритроцитах 30 доноров. Полученные данные служили для сравнения с результатами у больных.

Кровь больных острым лейкозом заготавливали на 5%-ом 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 отмывали физиологическим раствором при тех же условиях центрифугирования. Отмытые эритроциты суспензировали в фосфатносолевой смеси или фосфатносолевой смеси, содержащей глюкозу в отношении 1:2 (конечная концентрация глюкозы в реакционной смеси $1,1 \cdot 10^{-2}$ М). Суспензию эритроцитов инкубировали в N_2 при 37° в течение 2 ч. Ферментативные процессы прекращали добавлением равного объема 10%-й трихлоруксусной кислоты. Об интенсивности гликолиза судили по накоплению молочной кислоты. Молочную кислоту определяли по методу Баркера и Саммерсона до и после инкубации.

Содержание компонентов адениловой системы анализировали методом нисходящей хроматографии на бумаге «М» Ленинградской фабрики № 2. На хроматограмму наносили 40 капель трихлоруксусного фильтрата по 0,005 мл. Общее количество нанесенного фильтрата составляло 0,2 мл.

В качестве растворителя применяли смесь н-пропилового спирта, 25%-го аммиака и воды в отношении 60:30:10. После выявления пятен адениннуклеотидов в ультрамикроскопе и элюции их в 5 мл 0,1 N HCl в течение 18 ч. при 37° проводили количественные измерения на спектрофотометре СФ-4А в области спектра 260—290 мкм.

Для измерения активности ферментов отмытые эритроциты разрушали водой в отношении 1:150. Активность ферментов определяли спектрофотометрическим методом.

Состав проб следующий: 1) для определения ФГАД—трис буфер 0,04 М, арсенат $1,5 \cdot 10^{-2}$ М, ЭДТА $1,1 \cdot 10^{-3}$ М, никотинамидадениндинуклеотил (НАД) $3 \cdot 10^{-4}$ М, Ф-1, 6Ф 0,06 М; 2) для определения ЛДГ—трис буфер 0,05 М, НАД·H₂ $1,1 \cdot 10^{-4}$, пировиноградной кислоты $3 \cdot 10^{-3}$ [15]; 3) для определения Г-6-ФД—трис буфер 0,05 М, MgCl₂ 0,1 М, НАДФ $1,5 \cdot 10^{-3}$ М, Г-6-Ф—0,02 М [13]. К опытной смеси добавляли 1 мл гемолизата. Общий объем пробы 3 мл. Измерение производили при 25°.

В зависимости от целей исследования 25 больных острым лейкозом были подразделены на две группы.

В первой группе (10 человек) изучалась интенсивность гликолиза и содержание адениловых нуклеотидов, во второй (15 человек) определялась активность основных ферментов гликолиза и пентозного цикла.

При определении скорости гликолиза в эритроцитах больных острым лейкозом было обнаружено более интенсивное накопление молочной кислоты, по сравнению с эритроцитами доноров ($P < 0,001$). Более значительное накопление молочной кислоты наблюдалось в пробах взвеси эритроцитов больных с добавлением глюкозы (табл. 1).

Таблица 1

Содержание молочной кислоты в эритроцитах здоровых людей и больных острым лейкозом

Исследуемый контингент	Без глюкозы		С глюкозой	
	до инкубации	после инкубации	до инкубации	после инкубации
Доноры	$1,8 \pm 0,1$ (10)	$2,16 \pm 0,07$ (10)	$1,82 \pm 0,08$ (10)	$7,0 \pm 0,11$ (10)
Больные	$2,15 \pm 0,1$ (10)	$2,15 \pm 0,1$ (10)	$2,21 \pm 0,13$ (10)	$10,51 \pm 0,22$ (10)

Примечание. Результаты выражены в микромолях молочной кислоты, накапливающейся за 2 ч. инкубации в N_2 при 37° на 1 мл эритроцитов. В скобках отмечено число исследований.

Наряду с определением суммарной скорости гликолиза, нами изучалось содержание аденозинтрифосфата (АТФ), аденозиндифосфата (АДФ), аденозинмонофосфата (АМФ) в эритроцитах исследуемых больных острым лейкозом. Количественное определение адениловых нуклеотидов в эритроцитах больных позволило обнаружить повышение их содержания, по сравнению с эритроцитами доноров ($P < 0,01$).

Показано также, что в результате значительного увеличения содержания АДФ в эритроцитах больных острым лейкозом отношение АТФ/АДФ значительно ниже, чем у доноров (табл. 2).

Таблица 2

Содержание компонентов адениловой системы в эритроцитах доноров и больных острым лейкозом

Исследуемый контингент	АТФ	АДФ	АТФ/АДФ
Доноры	$0,61 \pm 0,03$ (10)	$0,17 \pm 0,01$ (10)	$3,6 \pm 0,01$ (10)
Больные	$0,85 \pm 0,06$ (10)	$0,32 \pm 0,13$ (10)	$2,6 \pm 0,3$ (10)

Примечание. Результаты выражены в микромолях адениловой кислоты на 1 мл эритроцитов.

Таким образом, наряду с увеличением накопления молочной кислоты в эритроцитах больных острым лейкозом, было выявлено повышение содержания адениловых нуклеотидов.

Нам представлялось целесообразным исследовать активность некоторых ферментов, участвующих в сложном процессе гликолиза.

Определение ферментов показало, что наименьшей активностью в эритроцитах здоровых людей обладает фермент ФГАД. Затем в порядке возрастания следует Г-6-ФД и ЛДГ (табл. 3).

Таблица 3

Активность ферментов в эритроцитах здоровых людей и больных острым лейкозом

Эритроциты			
Исследуемый фермент	доноры	больные острым лейкозом	
ФГАД	$1,77 \pm 0,07$ (10)	$3,06 \pm 0,05$ (15)	
ЛДГ	$5,86 \pm 0,34$ (10)	$10,78 \pm 0,62$ (15)	
		больные с повышенной активностью	больные с пониженной активностью
Г-6-ФД	$1,34 \pm 0,02$ (10)	$1,80 \pm 0,14$ (8)	$0,70 \pm 0,03$ (7)

Примечание. Результаты выражены в микромолях 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 количество исследований.

В эритроцитах 15 больных острым лейкозом активность ФГАД значительно повышена ($P < 0,001$), по сравнению с нормой (табл. 1). Фермент ФГАД катализирует реакцию оксидоредукции, занимающую центральное место в процессе гликолиза.

Выявленное увеличение активности ФГАД в эритроцитах больных острым лейкозом, несомненно, приводит к усилению интенсивности гликолиза.

Самым активным ферментом среди исследуемых в эритроцитах здоровых людей является ЛДГ (табл. 3). Изучение ЛДГ в эритроцитах больных показало резкое повышение активности фермента.

Кроме основного пути анаэробного превращения глюкозы, для эритроцитов человека характерным является прямое окисление глюкозы по пентозному пути. Прямое окисление глюкозы играет особую роль в жизнедеятельности эритроцитов.

Основным ферментом, участвующим в прямом окислении глюкозы 6-фосфата, является Г-6-ФД. Исследованиями некоторых авторов доказано значительное или полное отсутствие Г-6-ФД в эритроцитах при некоторых формах гемолитической анемии [2, 10].

Поскольку при лейкозе одним из патогенетических механизмов развития анемии считается чрезмерное разрушение эритроцитов, сочли

необходимым определить активность Г-6-ФД в эритроцитах исследуемых больных. В результате выяснилось, что у половины исследуемых больных активность Г-6-ФД отчетливо понижена, у остальной половины несколько повышена (табл. 3).

Можно предположить, что эритроциты больных острым лейкозом с пониженным содержанием Г-6-ФД подвергаются более быстрому разрушению, т. к. при нарушении активности этого фермента нарушается образование НАДФН₂, играющего большую роль в поддержании структурной целостности эритроцитов.

Таким образом, по нашим данным, эритроциты при лейкозе отличаются от эритроцитов здоровых людей усилением интенсивности гликолиза, повышением содержания компонентов адениловой системы, уменьшением соотношения АТФ/АДФ, увеличением активности гликолитических ферментов и незначительным повышением Г-6-ФД у половины исследуемых больных.

Связать усиление интенсивности гликолиза с наличием ретикулоцитов не представляется возможным, так как при выделении эритроцитов с последующим 3—4-кратным отмыванием физиологическим раствором верхний слой эритроцитов, где преимущественно располагаются ретикулоциты, удалялся.

Вероятно, выявленное нами увеличение интенсивности гликолиза, повышение содержания АТФ и АДФ, а также повышение активности фермента приводит к ранней гибели эритроцитов, хотя у исследованных нами больных острым лейкозом не было клинических проявлений, свидетельствовавших о наличии гемолиза. Однако многие авторы высказывают предположение о гемолитическом характере анемии при лейкозе, указывая на возможность различного механизма гемолиза [11].

По-видимому, в одном из патогенетических механизмов, способствующих повышению хрупкости эритроцитов, определенную роль играют глубокие внутриклеточные биохимические изменения.

Можно предположить, что для выполнения своих жизненных функций эритроциты при лейкозе для получения необходимой энергии компенсируют свою малочисленность усилением гликолиза, вместе с тем они усиленно используют эндогенную АТФ и быстрее разрушаются, чем обуславливается укорочение продолжительности жизни эритроцитов при остром лейкозе.

В ы в о д ы

1. Эритроциты больных острым лейкозом с выраженной анемией отличаются по некоторым биохимическим свойствам от эритроцитов здоровых людей.

2. В эритроцитах больных острым лейкозом в стадии анемизации обнаружено усиление интенсивности гликолиза, увеличение содержания компонентов адениловой системы, уменьшение соотношения АТФ/АДФ.

3. В эритроцитах больных острым лейкозом активность ФГАД и ЛДГ значительно повышена, по сравнению с активностью этих ферментов в эритроцитах здоровых людей.

Наблюдается отчетливое понижение активности гликозо-6-фосфат-дегидрогеназы (Г-6-ФД) в эритроцитах у половины исследуемых больных, у остальных отмечалось незначительное повышение активности фермента.

4. Не исключено, что выявление усиления интенсивности гликолиза, повышение активности ферментов может быть одной из причин, приводящих к укорочению продолжительности жизни эритроцитов больных острым лейкозом.

Ереванский институт гематологии
и переливания крови

Поступило 23/X 1970 г.

Ս. Մ. ՏԵՐ-ՆՈՎԶԱՆԻՍՅԱՆ

ԷՐԻՏՐՈՑԻՏՆԵՐԻ ԲԻՈՔԵՄԻԱԿԱՆ ԱՌԱՆՁԱՀԱՏՎՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ
ՍՈՒՐ ԼԵՅԿՈԶԻ ԺԱՄԱՆԱԿ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Ուսումնասիրվել են 25 սուր լեյկոզով հիվանդների և 30 դոնորների էրիտրոցիտների բիոքեմիական հատկությունները: Որոշվել է գլիկոլիզի ինտենսիվությունը կաթնաթթվի կուտակման քանակով, գլիկոլիտիկ ֆերմենտների (ֆոսֆոգլիցերալդեհիդդեհիդրոգենազա-(ՖԳԱԴ), լակտատ-դեհիդրոգենազա (ԼԴՀ) և գլյուկոզա-6 ֆոսֆատդեհիդրոգենազա (Գ-6-ՖԴ) ակտիվությունը, ինչպես նաև ադենիլալին սիստեմի բաղադրիչների պարունակությունը (ադենիլին տրիֆոսֆատ-ՏՄՖ, ադենոզինդիֆոսֆատ-ՏԴՖ և ադենոզին մոնոֆոսֆատ-ԱՄՖ), որոնք կենտրոնական դեր են խաղում էրիտրոցիտների էներգետիկ փոխանակության մեջ:

Ի տարբերություն դոնորների էրիտրոցիտների, սուր լեյկոզով հիվանդների էրիտրոցիտներում նկատվել է գլիկոլիզի ինտենսիվության ուժեղացում, ադենիլալին սիստեմի բաղադրիչների պարունակության տվեղացում, վերոհիշյալ ֆերմենտների ակտիվության զգալի բարձրացում:

Լեյկոզի ժամանակ անեմիայի հետևանքով էրիտրոցիտներում նկատվող նյութափոխանակության ուժեղացումը, ըստ երևույթին, արյան կարմիր գնդիկների կյանքի տևողության կարճացման պատճառ է դառնում:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Арипов А. Я., Сахибов Я. Д. Проблемы гематологии и переливания крови, 1968, 9, стр. 12.
2. Асриян И. С. Вопросы медицинской химии, 1967, 6, стр. 623.
3. Венкстерн Т. В., Баев А. А. Биохимия, 1957, 6, стр. 943.
4. Воробьев А. И. Дисс. канд. Казань, 1963.
5. Воробьев А. И. Дисс. докт. М., 1963.

6. Климова Н. Ф., Лорие Ю. И., Шитикова М. Г. Материалы докладов III Всесоюзной конференции по пересадке тканей и органов. Ереван, 1963.
7. Луганова И. С., Сейц И. Ф. Сб. трудов Института переливания крови, ч. II. Л., 1966.
8. Мешкова Н. П., Северин С. Е. Практикум по биохимии животных. М., 1950.
9. Свенцицкая М. Б., Рамонова-Цовребова О. Д. Вопросы медицинской химии, 1968, 14, 4, стр. 343.
10. Черняк Н. Б., Асриян И. С. Вопросы медицинской химии, 1968, 5, стр. 483.
11. Dameshek W., Gunz F. Leukemia, New York, 1958.
12. Friedman et al. Z. ges. innere Med., 1961, 1, 12.
13. Kornberg A., Horecker B. L. Meth. Enzymol., 1955, 1, 393.
14. Vetter K. Folia Haematol., 1961, 6, 80.
15. Wu R., Racker E. J. Biol. Chem., 1959, 234, 1029.