

**Министерство здравоохранения Республики Молдова
Государственный университет медицины и фармации
“Nicolae Testemitanu”**

**ЛЕЧЕБНЫЙ ФАКУЛЬТЕТ
Кафедра биохимии и клинической биохимии**

ДИПЛОМНАЯ РАБОТА

**Состояние ферментной редокс-системы глутатиона в крови
больных лимфогранулематозом (болезнь Ходжкина)**

**Чухрий Ольга
VI курс, М 1138 группа**

**Научный консультант,
Профессор, доктор хабилитат
медицинских наук,
Гаврилюк Людмила А.**

Кишинёв, 2017

Злокачественные лимфомы или лимфосаркомы, к которым относится лимфогранулематоз (болезнь Ходжкина) являются опухолями преимущественно лимфоидной ткани.

Лимфоидная ткань играет важную роль в поддержании гомеостаза организма, в регуляции процессов регенерации, деления и дифференцировки клеток.

Сдвиги в системе иммуногенеза сохраняются в организме дольше, чем явления стресса и процессы резорбции погибших в результате травмы тканей.

Регуляция клеточной пролиферации включает механизмы и факторы, обуславливающие переход из покоящегося дифференцированного состояния в стадию деления, а также факторы, влияющие на отдельные фазы митотического цикла.

Хорошо известно, что дифференцировка иммунокомпетентных клеток является обязательным условием их участия в защитных реакциях организма.

Активаторами дифференцировки могут быть медиаторы-полипептиды, нейропептиды, интерлейкины, внутриклеточные трансмиттеры.

Каким бы по химической природе не был активатор, ранние признаки активации характеризуются для макрофагов **«окислительным взрывом»**, образованием и выделением в среду перекиси водорода (H_2O_2), радикалов кислорода ($OH\cdot$, $O_2\cdot$), концентрация которых в клетке находится под контролем антиокислительной системы.

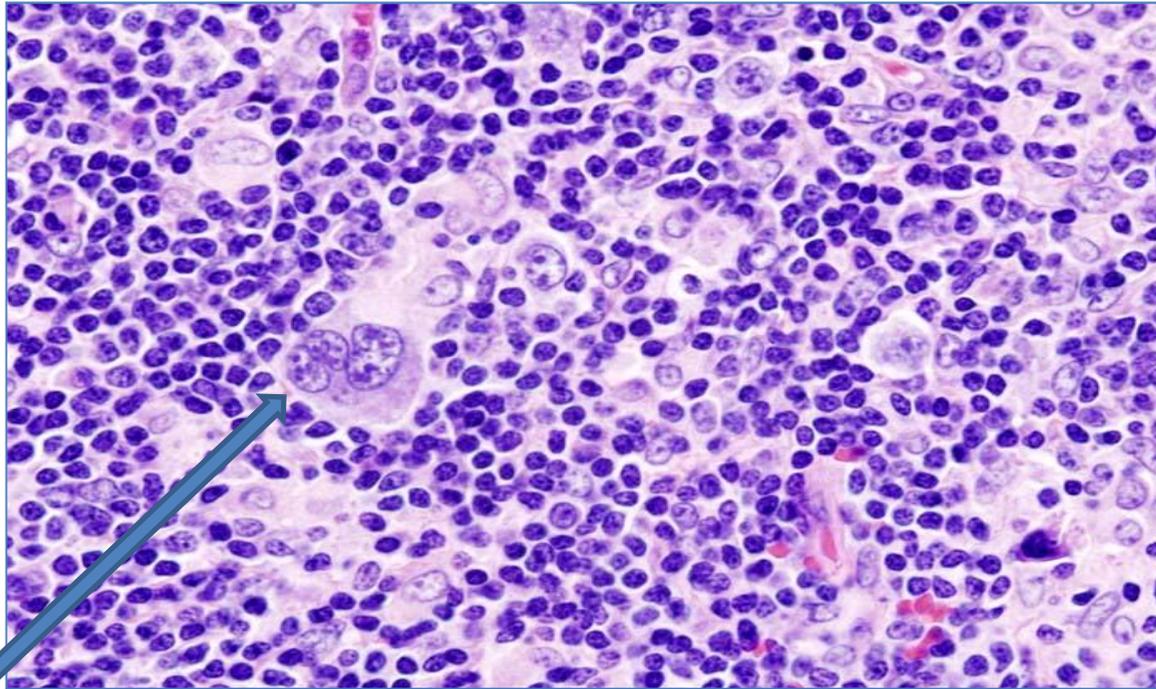
Активация лимфоцитов является стимулом к повышению концентраций линолевой и арахидоновой кислот, необходимых для синтеза простагландина E, запускающего иммунологические реакции лимфоцитов.

Внутриклеточная антиокислительная защита осуществляется посредством «*антиокислительного ответственного элемента*» (antioxidant responsive element, ARE), обнаруженного в промоторах многих генов, индукция которых наблюдалась при окислительном стрессе.

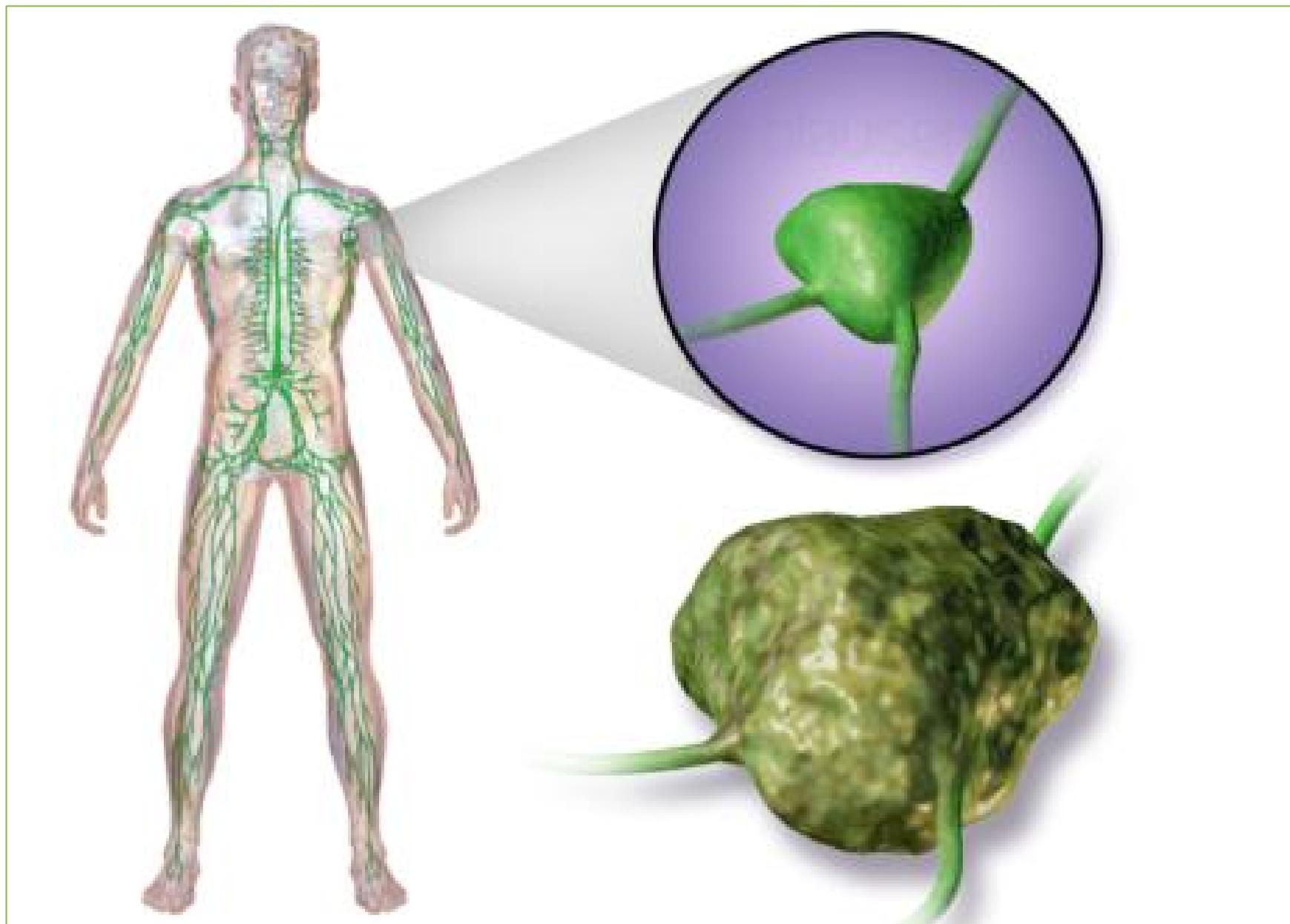
Активация генов посредством ARE является основанием для повышения антиоксидантной и детоксикационной функций клеток, для защиты от образующихся эндотоксинов и поступающих из окружающей среды экзотоксинов, которые могут повысить риск возникновения лимфопролиферативных заболеваний.

У больных лимфогранулематозом наблюдается хронический «*окислительный стресс*», при котором повышено образование активных форм кислорода ($\text{OH}\cdot$, $\text{O}_2\cdot$), усилены процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) клеточных мембран, наблюдается нарушение многих биохимических процессов.

Лимфома Ходжкина - это злокачественное заболевание лимфоидной ткани, характерным признаком которого является наличие гигантских клеток Рид-Березовского-Штернберга, обнаруживаемых при микроскопическом исследовании поражённых лимфатических узлов.



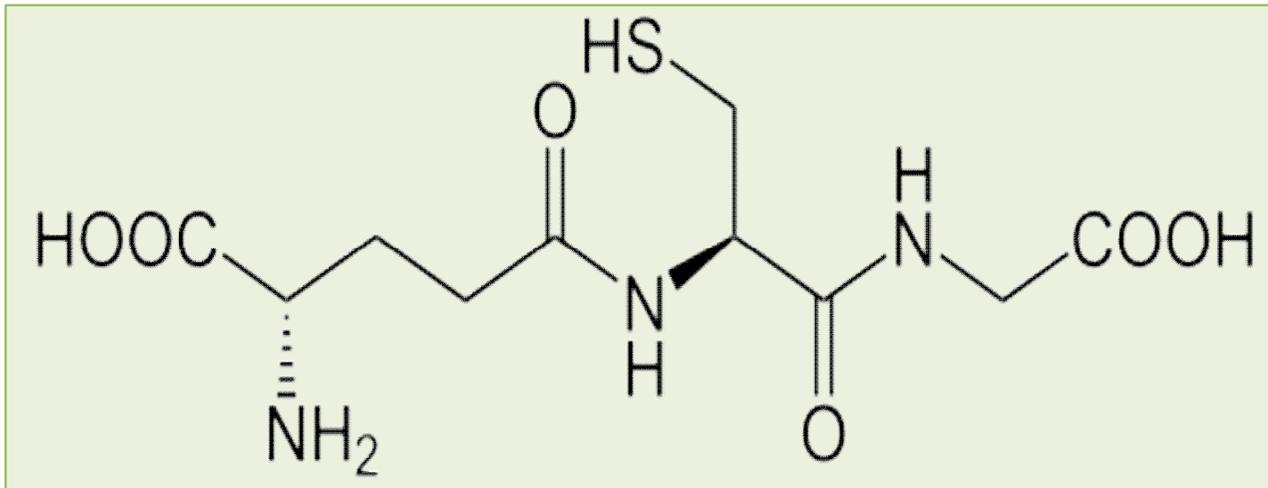
Биоптат лимфоузла
Характерная клетка Рид — Березовского — Штернберга



Лимфатическая система человека, лимфоузел

Важная роль ферментной редокс-системы глутатиона определена её участием в тиолдисульфидном обмене, в регуляции биосинтеза белков, в процессе деления, дифференцировки и апоптоза клеток, в устранении свободных радикалов, перекисей и гидроперекисей липидов.

Изменение состояния ферментной редокс-системы глутатиона может определять чувствительность опухолевых клеток к лекарственным препаратам, применяемым в курсе химиотерапии.



Глутатион
(глу-цис-гли)

Поступление вновь синтезированного **глутатиона** из печени в кровь и желчь стимулируется гормонами, глюкагоном и вазопрессином.

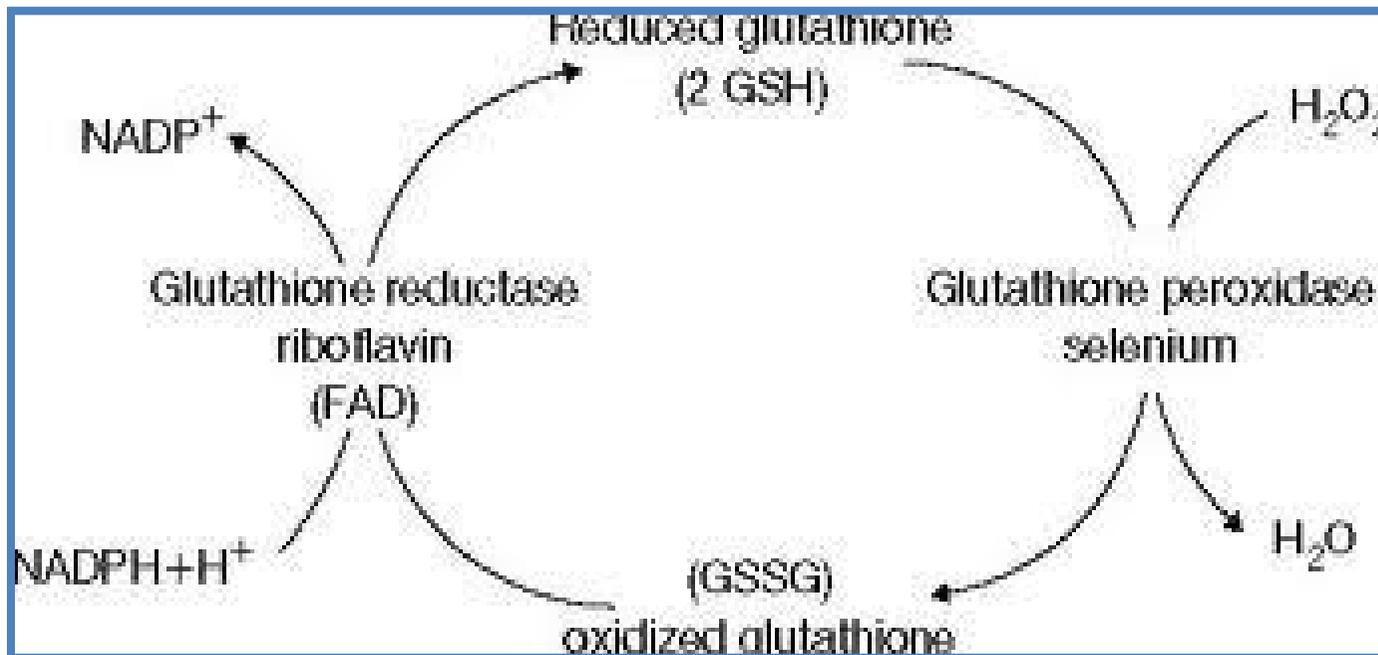
Поступление **глутатиона** из плазмы крови в клетки осуществляется находящимся в мембране клеток ферментом **гамма-глутамил-транспептидазой**.

Способность организма синтезировать **глутатион** генетически детерминирована и зависит от генов, участвующих в его метаболизме.

Функция глутатиона в организме многообразна: восстановление дисульфидных связей в белках и полипептидах, участие в обмене эйкозаноидов, резервирование цистеина, коферментная функция, влияние на активность ДНК, ферментов, пролиферацию клеток, транспорт аминокислот через мембрану клеток и др.

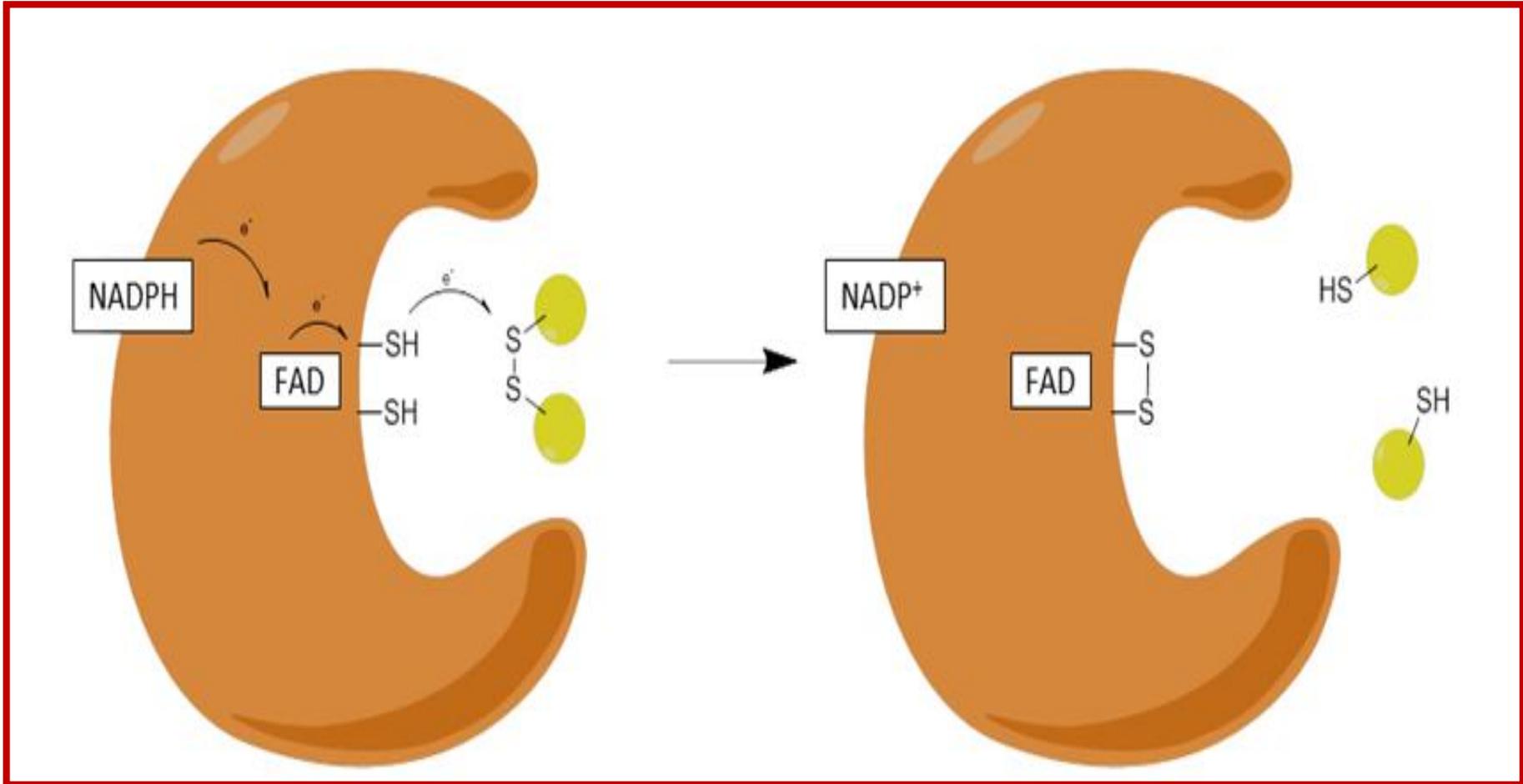
Но если интоксикация организма является очень высокой, это может вызвать дисбаланс редокс-системы клеток, нарушение буферной ёмкости клетки и возникновение патологии.

Отношение восстановленный глутатион / окисленный глутатион (**GSH/GSSG**) внутри клетки является одним из важнейших параметров, который показывает уровень внутриклеточной токсичности, т.е. **уровень окислительного стресса**.



Состояние ферментной редокс-системы в первую очередь зависит от соотношения активностей **глутатионредуктазы (ГР)** и **глутатионпероксидазы (ГП)**, контролирующей уровень глутатиона, соответственно в *восстановленной* и *окисленной* форме.

ГР является единственным ферментом организма, **восстанавливающим окисленный глутатион (GSSG) в его восстановленную форму (GSH).**



Цель исследования:

Провести сравнительное исследование активности глутатионзависимых энзимов, глутатионредуктазы (ГР), глутатионпероксидазы (ГП), и функционально связанного с ними ключевого энзима пентозофосфатного пути окисления глюкозы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ) в периферической крови здоровых и больных лимфогранулематозом людей.

Задачи исследования:

- 1. Исследовать состояние антиоксидантных энзимов в крови больных лимфогранулематозом с разной активностью (стадией) патологического процесса.**
- 2. Осуществить поиск корреляционных взаимоотношений ферментной редокс-системы глутатиона и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в крови здоровых и больных лимфогранулематозом людей.**

Материал и методы исследования

***Объектом* исследования были 25 больных лимфогранулематозом (болезнь Ходжкина), в возрасте 30-63 лет, проходивших курс лечения в Отделении Гематологии Онкологического Института Молдовы.**

Все исследования были проведены до начала курсовой химиотерапии.

Контрольной группой были 20 здоровых людей, соответствующего возраста.

Все процедуры были проведены согласно этическим нормам клинических исследований.

Материалом исследования была периферическая кровь больных лимфогранулематозом и здоровых людей. Для получения клеток крови использовали комплекс антикоагулянтов (цитрат натрия -1% + ЭДТА, -1%). Затем 5 мл крови наносили на раствор *двухступенчатого градиента фиколл - уротраста*.

Лейкоциты и лимфоциты получали из периферической крови в двухступенчатом градиенте плотности фиколл-уротраст с использованием силиконированной посуды.

Микроскопический контроль чистоты фракции *лимфоцитов* проводили по методу Нохта.

Эритроциты отбирали со дна пробирки и отмывали дважды физиологическим раствором (0,85% NaCl, рН 7,4).

Лизаты лимфоцитов, лейкоцитов и эритроцитов получали инкубацией в течение 30 мин с 0,1% Тритон X-100 (*конечная концентрация*) и центрифугировали в течение 15 мин при 5 000 об/мин.

Биохимические методы

Активность ферментов определяли спектрофотометрически, используя Humalyzer 2000 (DE).

Активность **глутатионредуктазы** (ГР) определяли по методу Horn H., активность **глутатионпероксидазы** (ГП) – по методу Paglia и Valentine, активность **глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы** (Г6ФДГ) – по методу Сейц и Лугановой в плазме, лейкоцитах, лимфоцитах и эритроцитах периферической крови.

Содержание **белка** определяли по методу Watanabe.

Статистическую обработку результатов проводили по методу Стьюдента, используя пакет прикладных программ "Microstat" (Microsoft, 2007, США).

Коэффициенты ранговой корреляции рассчитывали по методу Спирмена.

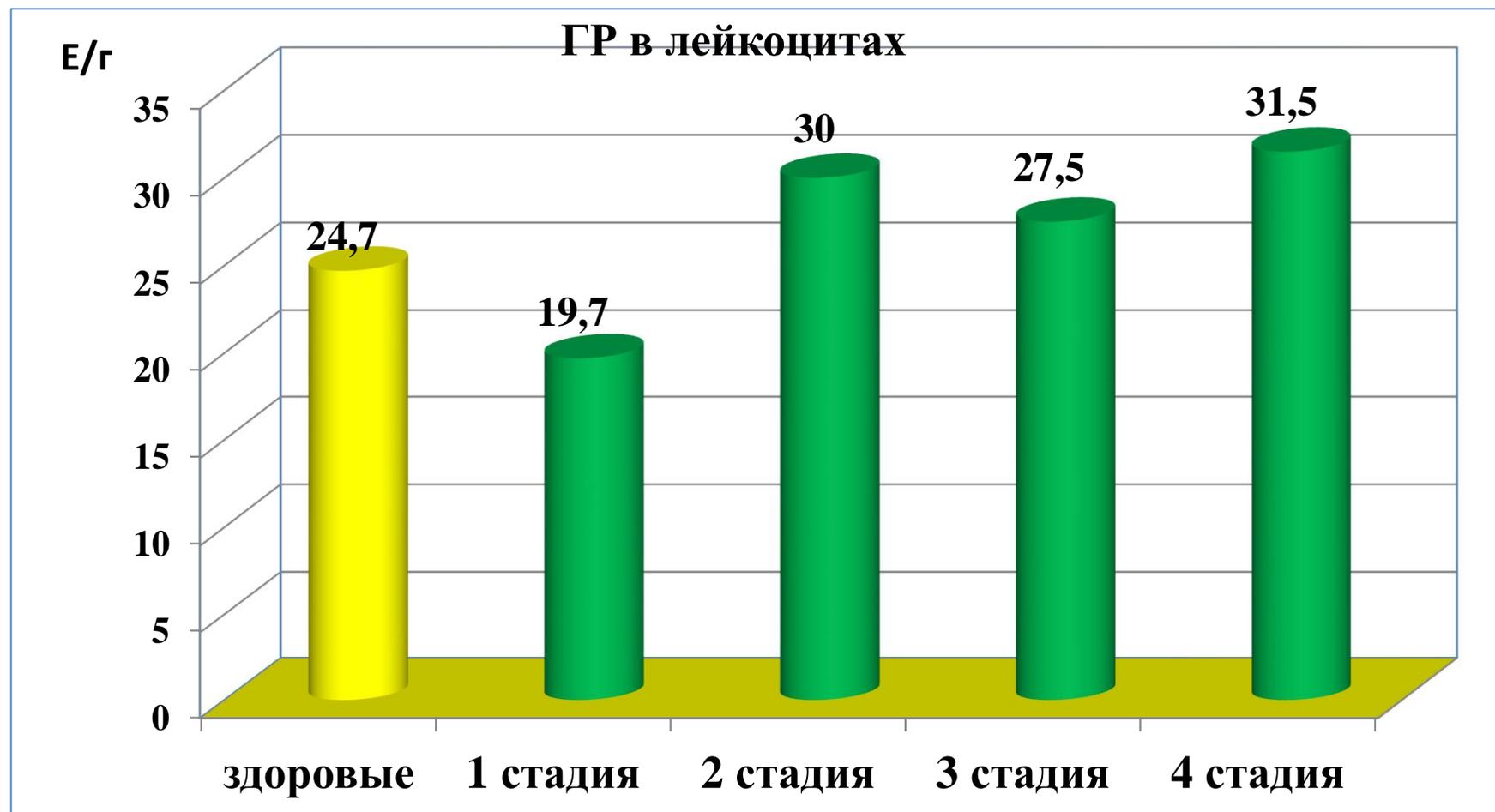
Результаты исследования



Активность ГР в плазме крови больных лимфогранулематозом

Примечание. МЕ –международные единицы; МЕ/г белка – удельная активность фермента.

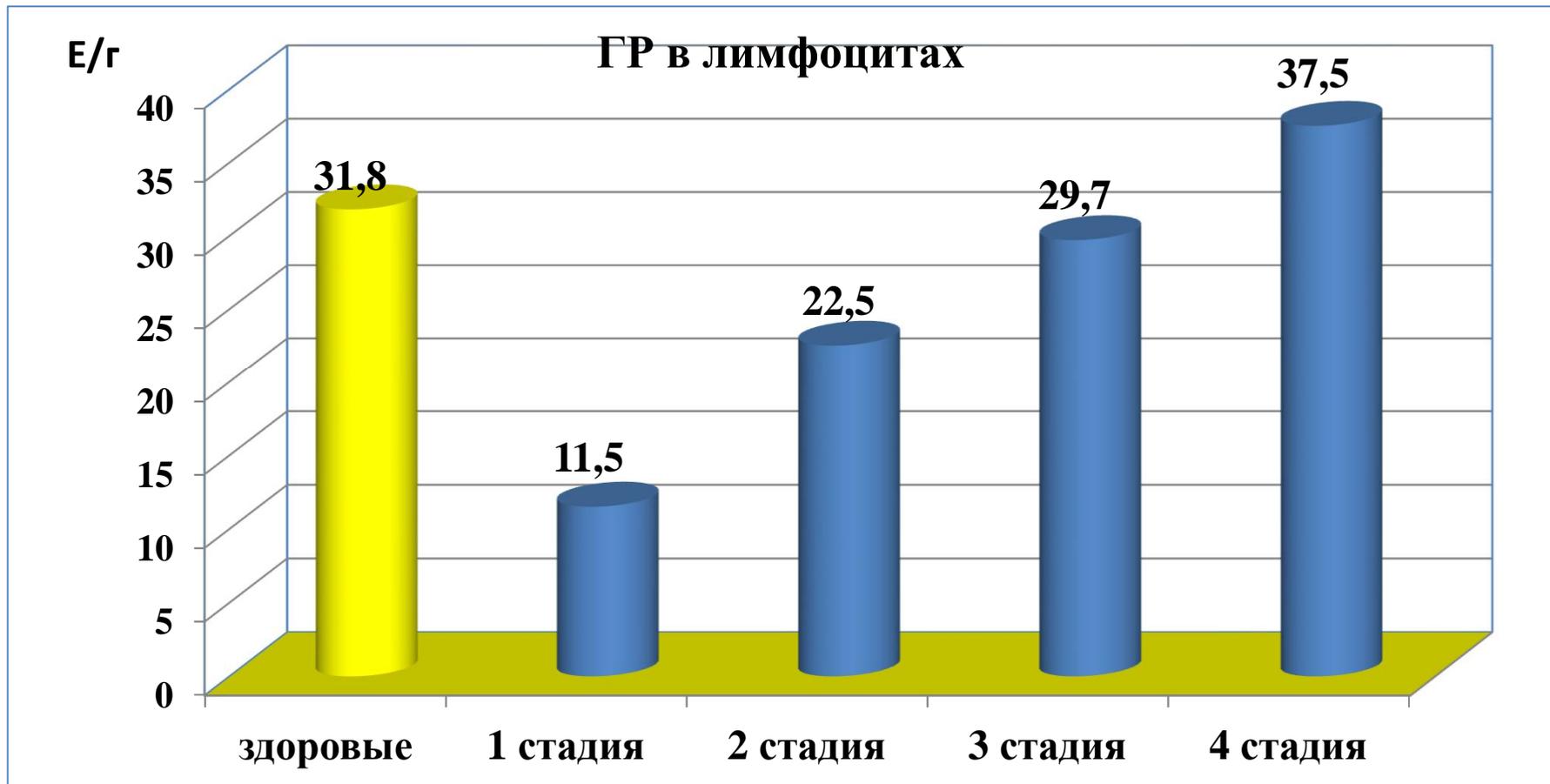
I- 46,7% ($p < 0,05$); II- 91,9%; III- 83,8%; IV- 71,1% ($p < 0,05$).



Активность ГР в лейкоцитах у больных лимфогранулематозом

Примечание. Е – международные единицы; Е/г белка – удельная активность фермента.

I- 79,8%; II- 121,5%; III- 111,3%; IV- 127,5% ($p < 0,05$).



Активность GR в лимфоцитах больных лимфогранулематозом

Примечание. Е – международные единицы; Е/г белка – удельная активность фермента.

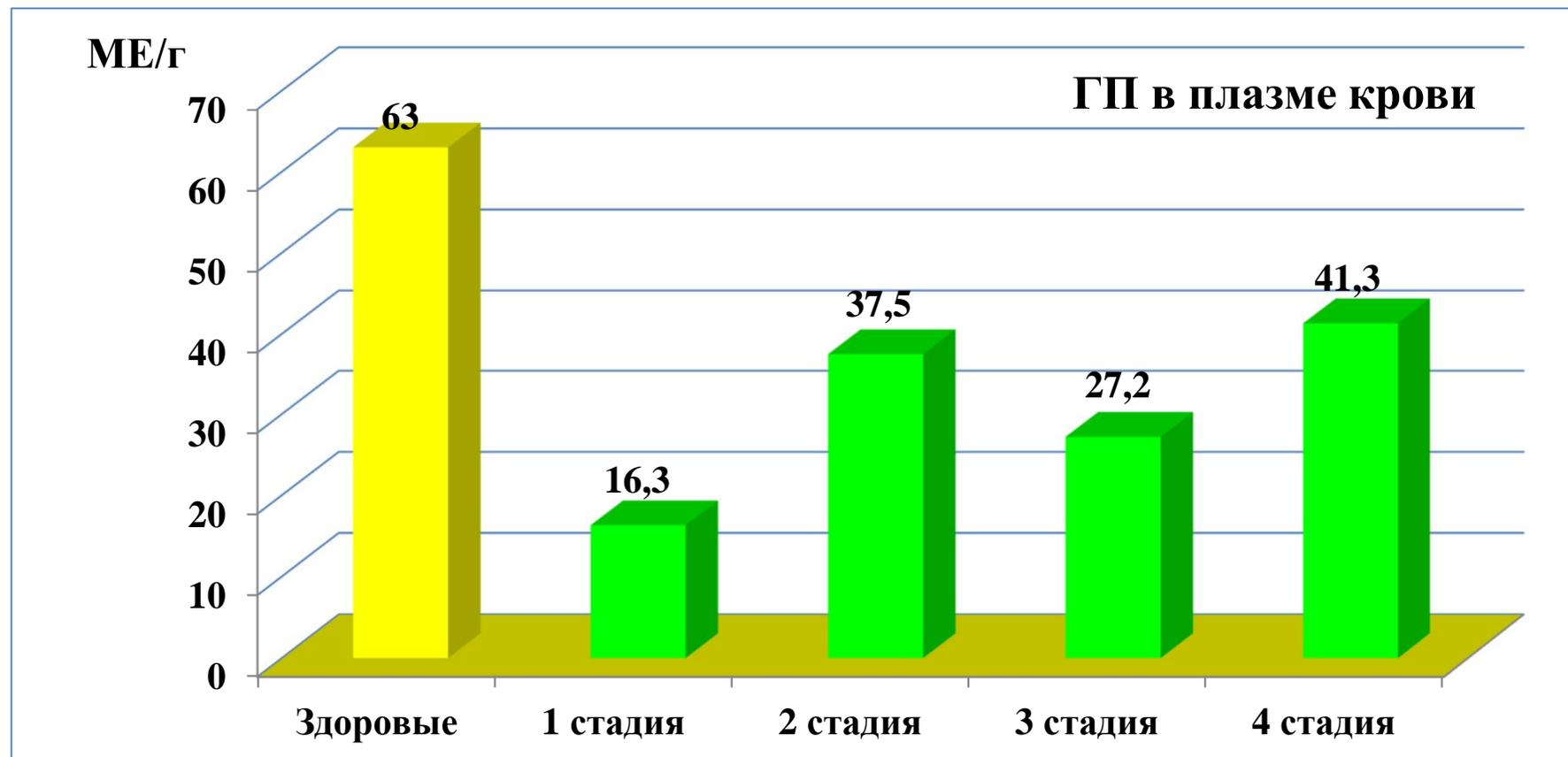
I- 36,2% ($p < 0,05$); II- 70,7% ($p < 0,05$); III- 93,4%; IV- 117,9%.



Активность ГР в эритроцитах больных лимфогранулематозом

Примечание. ME –международные единицы; ME/г гемоглобина – удельная активность.

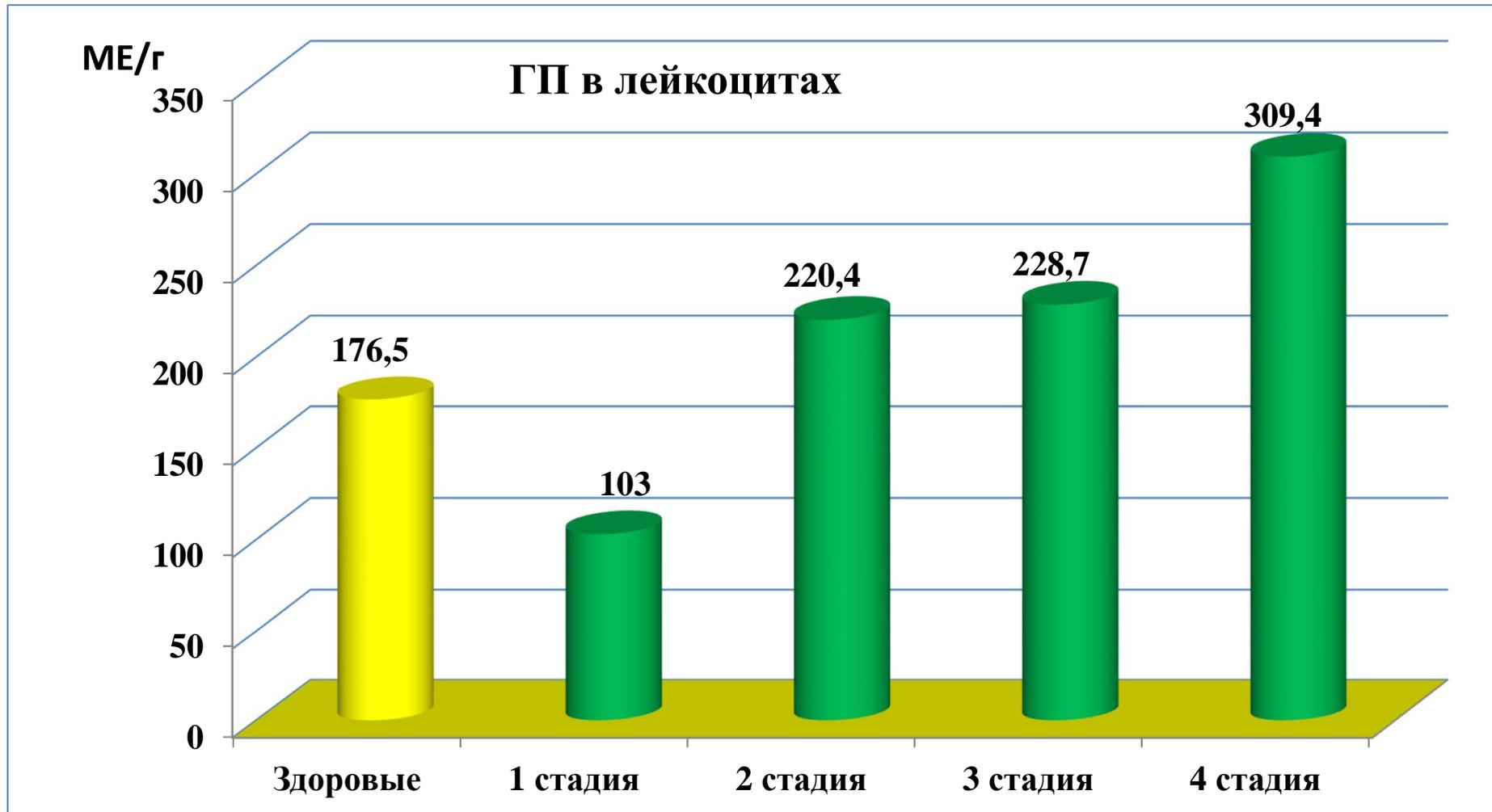
I- 67,8% ($p < 0,05$); II- 86,5%; III-127,4% ($p < 0,05$); IV-118,4%.



Активность ГП в плазме крови у больных лимфогранулематозом

Примечание. МЕ –международные единицы; МЕ/г белка – удельная активность фермента.

I- 25,9% ($p < 0,001$); II- 59,5% ($p < 0,05$); III- 43,2% ($p < 0,05$); IV- 65,6% ($p < 0,05$).



Активность ГП в лейкоцитах больных лимфогранулематозом

Примечание. МЕ –международные единицы; МЕ/г белка – удельная активность фермента.

I- 58,4% ($p < 0,01$); II- 124,8%; III- 129,0%; IV- 175,3% ($p < 0,01$).



Активность ГП в лимфоцитах больных лимфогранулематозом

Примечание. МЕ –международные единицы; МЕ/г белка – удельная активность фермента.

I-14,2% ($p < 0,001$); II- 27,7% ($p < 0,005$); III- 30,8% ($p < 0,001$) ; IV- 62,4% ($p < 0,05$).



Активность ГП в эритроцитах больных лимфогранулематозом

Примечание. ME –международные единицы; ME/г гемоглобина – удельная активность.

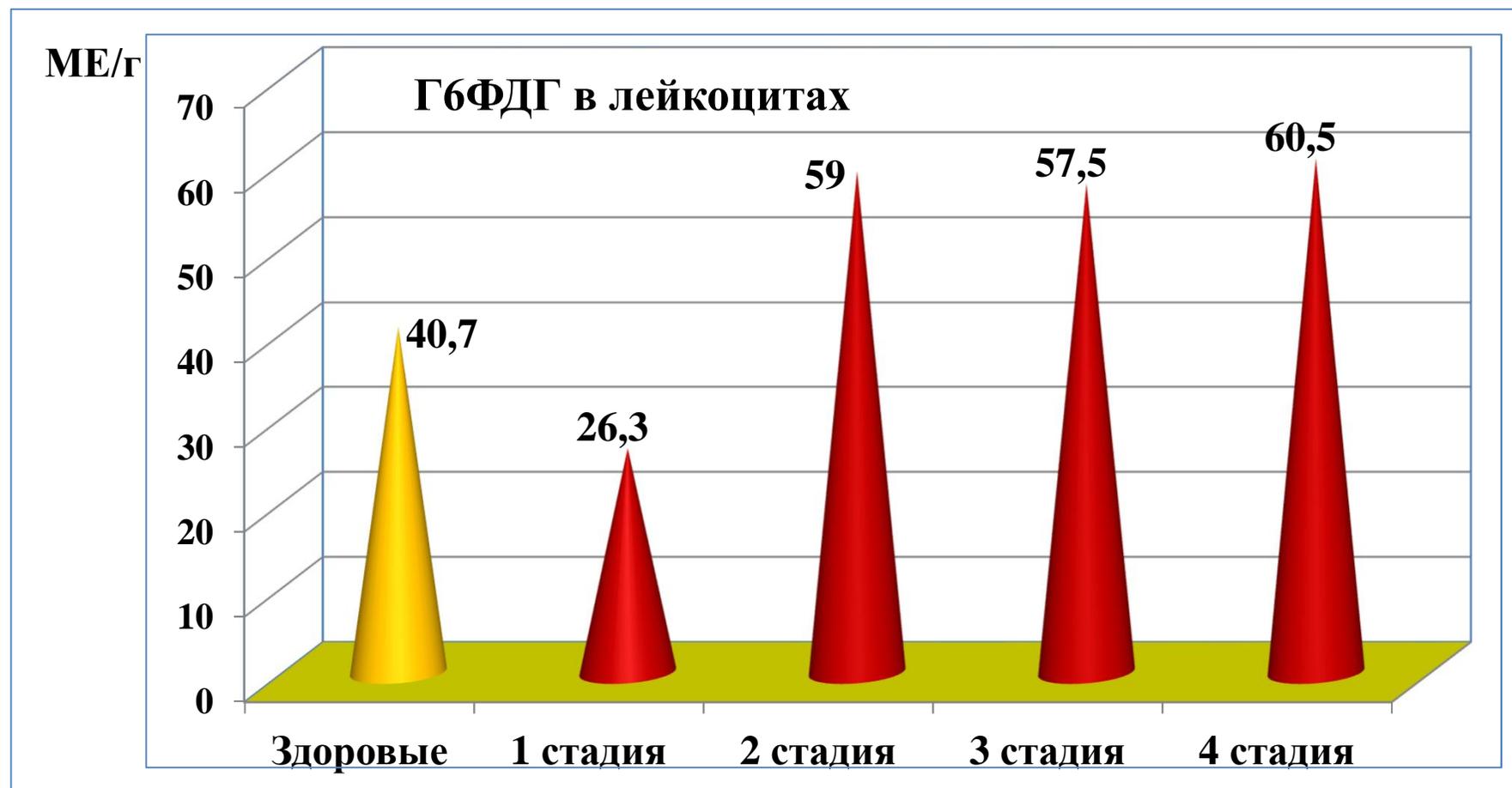
I- 89,3%; II- 135,4%; III-160,9% ($p < 0,01$); IV-142,9% ($p < 0,05$).



Активность Г6ФДГ в плазме крови у больных лимфогранулематозом

Примечание. ME –международные единицы; ME/г белка – удельная активность фермента.

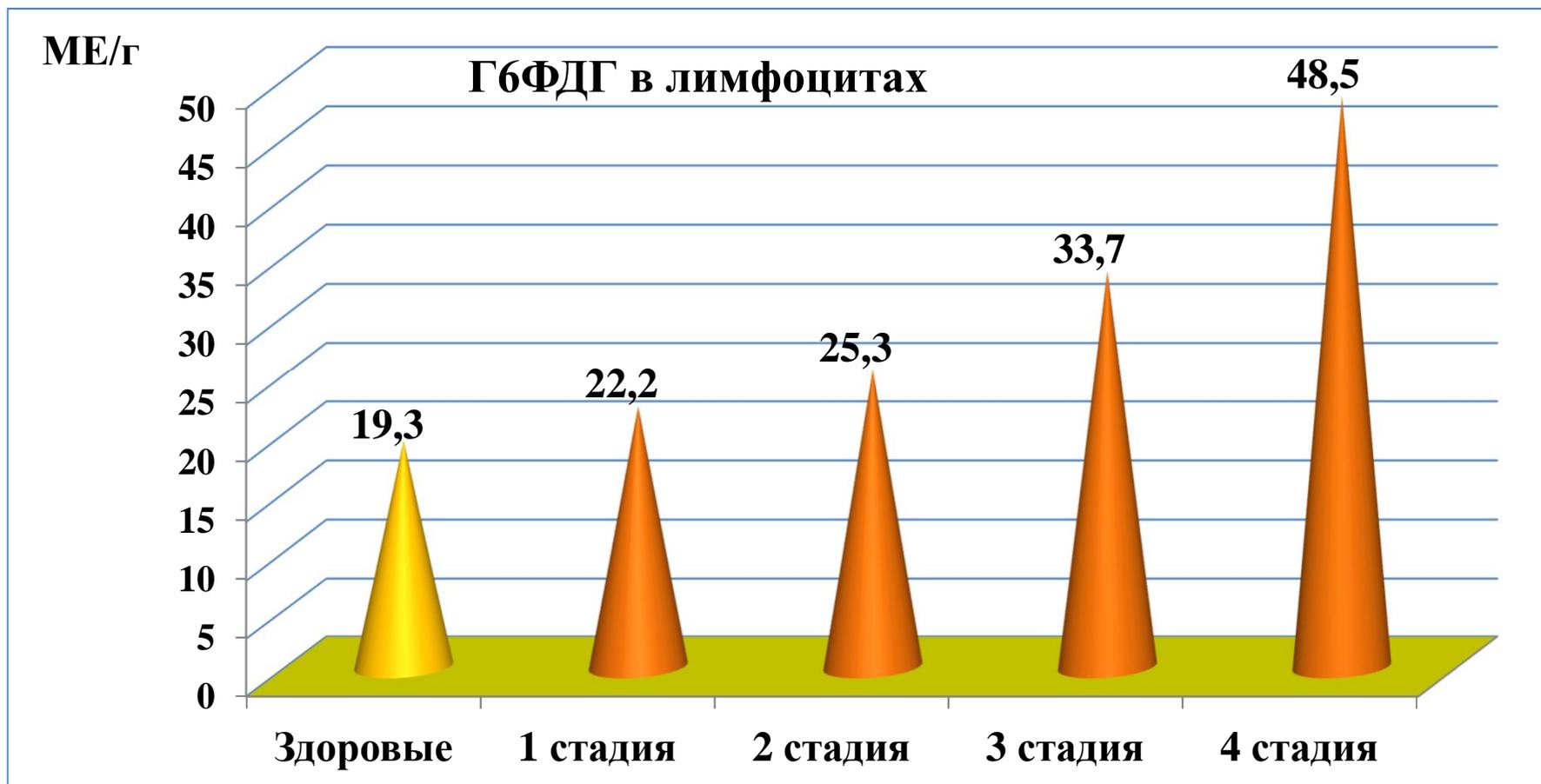
I- 117,3% ; II- 168,2% (p<0,01); III- 163,0% (p<0,01); IV- 204,7% (p<0,001).



Активность Г6ФДГ в лейкоцитах у больных лимфогранулематозом

Примечание. МЕ –международные единицы; МЕ/г белка – удельная активность фермента.

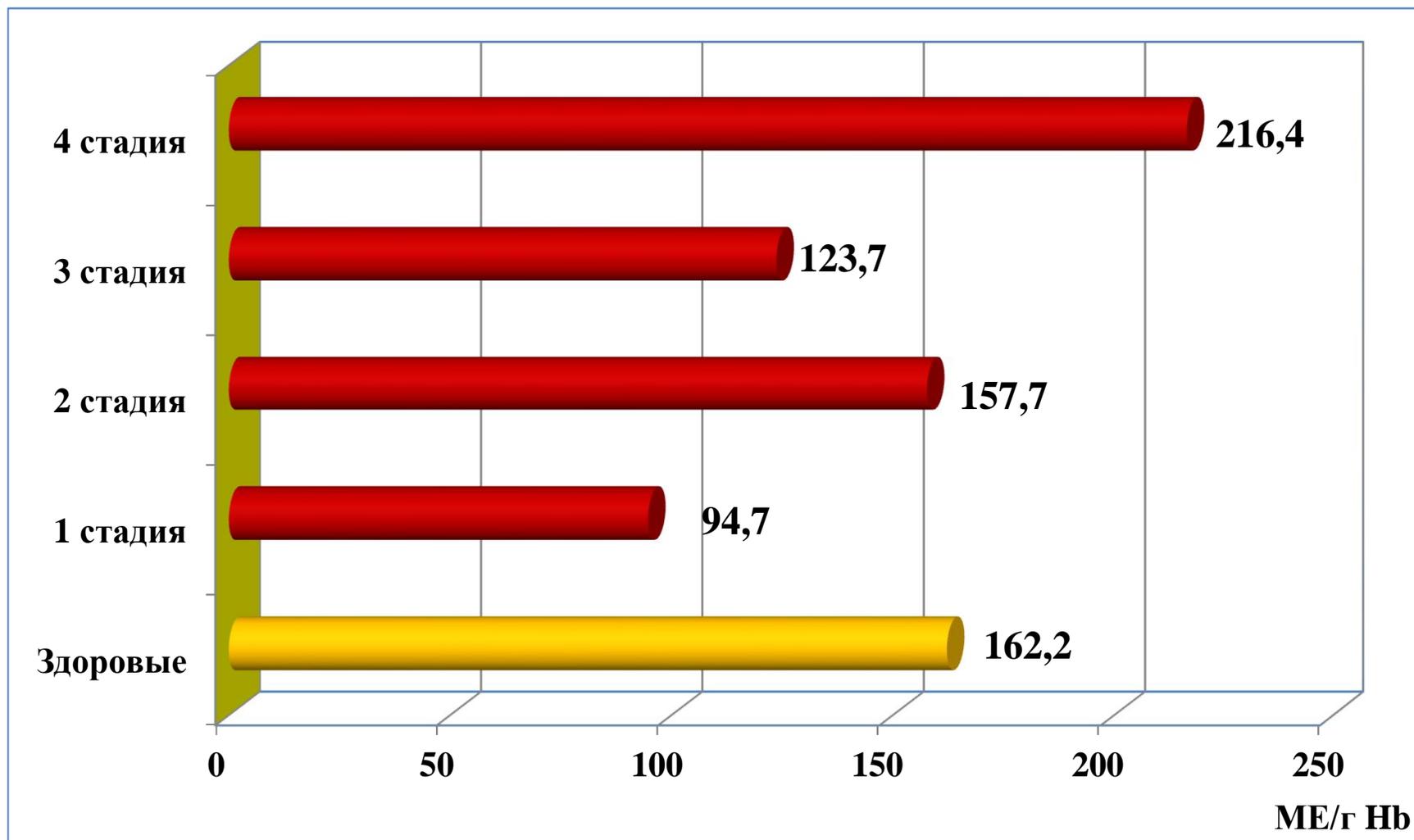
I- 64,6% ($p < 0,01$); II-145,0% ($p < 0,05$); III-141,3% ($p < 0,05$); IV-148,6% ($p < 0,05$).



**Активность Г6ФДГ в лимфоцитах у больных
лимфогранулематозом**

Примечание. МЕ – международные единицы; МЕ/г белка – удельная активность фермента.

I- 115,0%; II- 131,1%; III- 174,6% ($p < 0,01$); IV-251,3% ($p < 0,001$).



Активность Г6ФДГ в эритроцитах больных лимфогранулематозом

Примечание. МЕ –международные единицы; МЕ/г гемоглобина – удельная активность.

I- 58,4% ($p < 0,05$); II- 97,2% ; III- 76,3%; IV- 133,4% ($p < 0,05$).

Корреляционные отношения между величинами активности ГР, ГП и Г6ФДГ в лимфоцитах и лейкоцитах периферической крови здоровых и больных лимфогранулематозом людей

Энзимы/ Стадия болезни	Здоровые		Больные	
	r	p	r	p
	Л и м ф о ц и т ы			
ГР/ГП (I-II)	+0,867	<0,001	-0,117	>0,05
ГР/ГП (IV)			+0,500	>0,05
ГР/Г6ФДГ (I-II)	+0,835	<0,005	+0,690	<0,05
ГР/Г6ФДГ (IV)			+0,917	<0,005
	Л е й к о ц и т ы			
ГР/Г6ФДГ (IV)	+0,894	<0,001	+0,536	<0,025
ГР/ГП (IV)	+0,786	<0,01	+0,367	>0,05

Выводы

- 1. У больных лимфогранулематозом (болезнь Ходжкина) наблюдался дисбаланс активности глутатионзависимых ферментов, ГР и ГП, в плазме и клетках периферической крови.**
- 2. В начале заболевания наблюдалась пониженная активность ГР и ГП (I стадия) в плазме и клетках крови, которая возрастала на поздних стадиях.**
- 3. Динамика активности ГР и ГП коррелировала с активностью патологического процесса (II→IV) у больных лимфогранулематозом.**
- 4. Активность ГбФДГ повышалась в плазме, лейкоцитах, лимфоцитах и эритроцитах периферической крови, отражая активность патологического процесса.**
- 5. Поиск корреляционных взаимоотношений в лимфоцитах и лейкоцитах больных лимфогранулематозом показал их нарушение между ГР и ГП, но сохранение тесной функциональной взаимосвязи между ГР и ГбФДГ на всех стадиях болезни.**