

6. Психологические проблемы применения ЭВМ в процессе обучения: тез. докл. к зонал. семинару. Пенз. отд-ние о-ва психологов СССР; под ред. Л.М. Дубового. Пенза, 1990, 46 с.
7. Рудь Г. Г. и др. Как меньше уставать за дисплеем, Вестник связи, 1990, №. 10, с. 11-12.

Cătălina Croitoru, *asistent universitar*
Catedra Igienă generală, USMF „Nicolae Testemițanu”
Chișinău, str. N. Testemițanu, 26
 Tel.: 205486
 E-mail: croitoru_cc@mail.ru

Recepționat 25.06.2009

Состояние ферментной системы глутатионредуктаза – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа в крови больных с опухолями молочной железы

¹Л. А. Гаврилюк, ¹А. И. Вартичан, ²Н. Е. Ботнарюк, ¹Л. Т. Лысый, ²Н. М. Годорожа

¹Кафедра биохимии и клинической биохимии ГУМФ им. Н. А. Тестемичану

²Лаборатория маммологии Онкологического НИИ Молдовы

State of the Enzymic System Glutathione Reductase – Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase in the Patients' Blood with Mammary Tumors

The purpose of this study was a comparative investigation of the activity of antioxidative enzymes glutathione reductase and glucose-6-phosphate dehydrogenase in the blood plasma and erythrocytes in the patients with dyshormonal hyperplasiae and mammary cancer. Thirty-six patients aged 32-65 years (mean age 48.5±16.5 years) were studied before treatment and 20 healthy individuals (a control group). The results reflect the activity of a pathological process and the imbalance of the antioxidative defense in the patients with mammary tumors, and may be used for differential diagnostics as an additional biochemical test.

Key words: glutathione reductase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, mammary tumors.

Starea sistemului enzimatic glutationreductaza – glucozo-6-fosfatdehidrogenaza în serul sangvin la paciente cu tumori ale glandei mamare

Lucrarea este consacrată cercetării activității enzimelor antioxidante – glutationreductaza și glucozo-6-fosfatdehidrogenaza în serul sanguin și în eritrocitele pacienților cu hiperplazii dishormonale și cancer de glandă mamară. Au fost examinați 36 de pacienți cu vârsta între 32-65 de ani (media – 48,5±16,5 ani) până la tratament și 20 de persoane sănătoase (grupul de control). Rezultatele reflectă activitatea procesului patologic și dezechilibrul sistemului antioxidant la pacienți cu tumori ale glandei mamare și pot fi utilizate în diagnosticul diferențial în calitate de test biochimic.

Cuvinte-cheie: glutationreductaza, glucozo-6-fosfatdehidrogenaza, tumori ale glandei mamare.

Введение

Растущая опухоль изменяет иммунореактивность организма, понижает иммунологические функции, выработку антител и других естественных иммунных факторов. Рост клеток опухоли сопровождается изменением регуляции свободно-радикальных процессов и содержания перекисей в липидах клеточных мембран [6].

Биоантиоксиданты являются ингибиторами перекисного окисления липидов (ПОЛ) клеточных мембран и факторами, необходимыми для деления и дифференцировки клеток. Водорастворимый антиоксидант-глутатион и его ферментная редокс-система играют важную роль в этих процессах и в метаболизме клеток [4, 11]. Глутатион, глутатионзависимые ферменты (глутатионредуктаза, глутатионпероксидаза и др.) выполняют важную функцию в интегративной системе организма, способствуя клеточной адаптации к окислительному стрессу [10]. Координация этого ответа выполняется частично через антиоксидант, который был найден в промоторах многих генов, и индуцируется окислительным и химическим стрессом [7]. Активация гена ведёт к вовлечению антиоксидантов и детоксикационной способности здоровых клеток, находящихся под влиянием

многих агентов, предупреждающих их трансформацию и развитие рака [12].

Глутатионредуктаза является единственным ферментом, восстанавливающим окисленный глутатион (GSSG) в его восстановленную форму (GSH), составляющую около 90-95% от общего содержания глутатиона в клетках организма. Функционирование глутатионредуктазы невозможно без наличия её кофермента НАДФН⁺, который генерируется в процессе апоптотического окисления глюкозы в пентозо-фосфатном пути. Взаимосвязь этих антиоксидантных ферментов позволяет поддерживать антиоксидантный статус клеток организма. Принимая во внимание агрессивность кислорода, возникновение реакционноспособных радикалов (O₂⁺, OH⁻), способствующих ПОЛ мембран в эритроцитах, представляет интерес исследование состояния активности этих сопряжённых ферментов.

Литературные сведения о состоянии активности глутатионредуктазы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы у пациентов с опухолями молочной железы противоречивы и в основном относятся к показателям сыворотки крови или тканей [8, 13].

Цель исследования

Провести сравнительный анализ уровней активности глутатионредуктазы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и их взаимосвязи в плазме и эритроцитах периферической крови больных с опухолями молочной железы.

Материал и методы

Исследование было проведено на 36 пациентах в возрасте от 32 до 65 лет (средний возраст $48,5 \pm 16,5$ года), первично поступивших в отделение маммологии Онкологического НИИ для обследования. Контрольную группу составили 20 человек соответствующего возраста. Пациенты, согласно поставленному диагнозу, были разделены на 2 группы: больные с доброкачественными образованиями (дисгормональной гиперплазией молочной железы, ДГМЖ, $n=24$) и больные ($n=12$) с злокачественными новообразованиями (раком молочной железы, РМЖ). Все исследования проводили до начала курса лечения. Кровь брали утром до еды с антикоагулянтом, центрифугировали при 600 вращениях/мин в течение 10 минут для получения плазмы и фракции эритроцитов. Эритроциты отбирали со дна пробирок, отмывали дважды 0,9% раствором NaCl, осаждали центрифугированием (10 мин), подвергали гемолизу дистиллированной водой, повторно центрифугировали (все процедуры были выполнены с использованием охлаждённых растворов). На спектрофотометре "Humalyzer 2000" (Германия) с помощью микрометодов определяли активность глутатионредуктазы (ГР, КФ 1.6.4.2) методом E. Conn и A. Vennessland (5) в нашей модификации [1] и активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ, КФ 1.1.1.44) – методом И.Ф.Сейц и И.С.Лугановой [3] в плазме и гемолизатах. Содержание белка определяли по методу А. Лоури [9]. Статистическую обработку полученных результатов проводили по методу Стьюдента с использованием пакета прикладных программ Microstat: Microsoft Excel 2003. Коэффициенты корреляции рассчитывали по методу Спирмена [2].

Результаты исследования и их обсуждение

Глутатионредуктаза (ГР). Активность энзима в плазме крови (рис. 1) у больных с ДГМЖ в плазме крови была равной 128,82 МЕ/л ($152,79\%$; $p < 0,05$) по сравнению

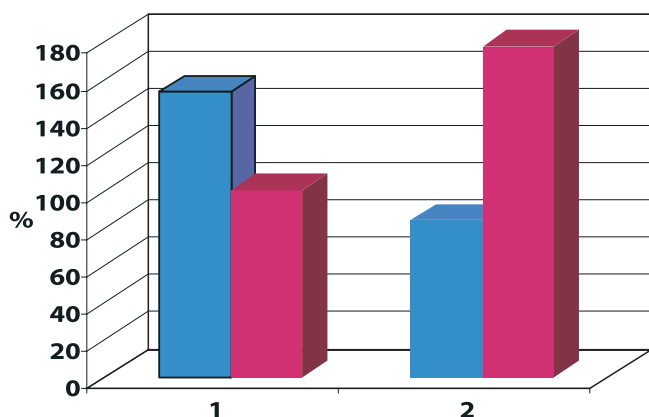


Рис. 1. Активность ГР и Г6ФДГ в плазме крови пациентов с опухолями молочной железы (МЕ/л).

с активностью энзима в плазме крови здоровых людей (84,87 МЕ/л).

Активность ГР в плазме пациентов с РМЖ была 85,21 МЕ/л. Расчёт активности энзима относительно содержания белка в плазме крови (удельная активность) показал такую же картину (рис. 2).

Активность ГР у пациентов с ДГМЖ почти в 2 раза была выше активности энзима у пациентов с РМЖ.

Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (Г6ФДГ). Результаты исследований активности энзима в плазме крови пациентов с ДГМЖ, представленные на рис 1, свидетельствовали о незначительном снижении – до 45,33 МЕ/л ($84,22\%$; $p > 0,05$) по сравнению с активностью в плазме крови контрольной группы (53,82 МЕ/л). У пациентов с РМЖ активность энзима была значительно повышенной – до 95,54 МЕ/л ($177,52\%$; $p < 0,05$). Результаты расчёта удельной активности Г6ФДГ (рис. 2) имели такую же тенденцию. Активность энзима в плазме больных с РМЖ (6,42 МЕ/г) почти в 2 раза превышала ферментативную активность в плазме больных с ДГМЖ (3,67 МЕ/г).

Пентозофосфатный путь апотомического окисления глюкозы является единственным полиферментным комплексом, где происходит образование пентозы (рибозо-5-фосфата), необходимой для синтеза нуклеотидов. Нуклеотиды используются для синтеза нуклеиновых кислот (ДНК, РНК), коферментов (НАД, ФАД и др.), макроэргов (АТФ, ГТФ), циклических мононуклеотидов (3',5'-цАМФ и 3',5'-цГМФ), являющихся вторичными посредниками между гормонами и внутриклеточными энзимами. Также пентозофосфатный путь генерирует около 70% НАДФН⁺, который необходим для обезвреживания токсинов и лекарств монооксигеназной цепью микросомального окисления при участии цитохрома P₄₅₀, для синтеза жирных кислот, липидов, холестерина, стероидных гормонов, желчных кислот. Наблюдаемое существенное повышение активности Г6ФДГ в плазме крови больных РМЖ, вероятно, отражает метаболические потребности растущей опухоли и организма больного.

Полученные данные согласуются с результатами исследования антиоксидантного профиля в крови пациентов с доброкачественными (фиброаденома) и

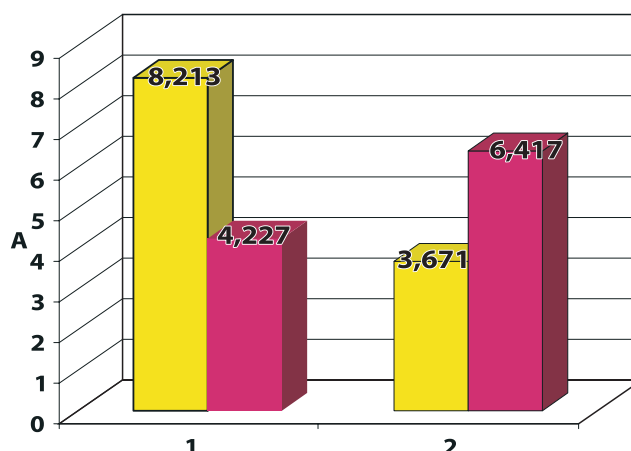


Рис. 2. Активность ГР и Г6ФДГ в плазме крови пациентов с опухолями молочной железы (МЕ/г)

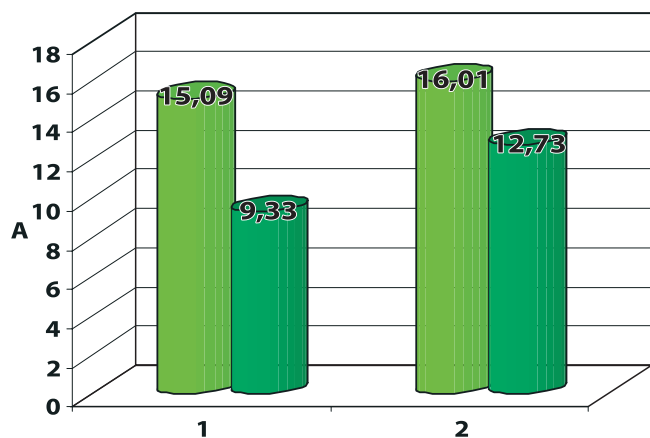


Рис. 3. Активность ГР и Г6ФДГ в эритроцитах больных с опухолями молочной железы (МЕ/г белка).

злокачественными (рак) опухолями молочной железы Kumaraguruparan R. с сотр. [8], которые показали его значительное снижение у больных раком молочной железы по сравнению с уровнем больных с доброкачественными опухолями молочной железы.

Исследование активности ГР и Г6ФДГ в эритроцитах. Результаты исследования активности сопряжённых антиокислительных ферментов представлены на рис. 3.

Нетрудно заметить более высокую удельную активность ГР в эритроцитах больных с ДГМЖ (15,09 МЕ/г; $p < 0,05$), чем у пациентов с РМЖ (9,33 МЕ/г). Эритроцитарная активность ГР у здоровых людей соответствовала 10,1 МЕ/г. Удельная активность Г6ФДГ у больных с ДГМЖ также превалировала над активностью пациентов с РМЖ, составляя 12,73 МЕ/г в сравнении с контрольной группой (11,2 МЕ/г).

Корреляционный анализ. ГР, как НАДФН-зависимый фермент, тесно связана с функционированием ключевого фермента пентозофосфатного пути, генерирующего этот коэнзим. Поиск корреляционных отношений между сопряжёнными ферментами, ГР и Г6ФДГ (табл. 1), с применением непараметрического критерия Спирмена показал, что в плазме крови у здоровых людей коэффициент ранговой корреляции $r = +0,830$ ($p < 0,001$), в эритроцитах - $r = +0,654$ ($p < 0,005$), что подтверждает функциональную связь этих ферментов с высоким уровнем надёжности. У больных с РМЖ в плазме крови ($r = +0,646$; $p < 0,025$) и эритроцитах ($r = +0,648$; $p < 0,025$) функциональная взаимосвязь ГР и Г6ФДГ также была сохранена. У больных с ДГМЖ

взаимосвязь между ГР и Г6ФДГ сохранялась только в эритроцитах ($r = +0,685$; $p < 0,025$).

Транспортируя кислород эритроцитарным липидам, ферментам и гемоглобину – акцептору кислорода, необходим высокий уровень антиоксидантной защиты от окислительного воздействия (стресса) кислорода. Важную роль в осуществлении антиоксидантной защиты эритроцита играют ГР и Г6ФДГ. ГР поддерживает высокий уровень восстановленного глутатиона, необходимого для образования глутатион-конъюгатов. Функционально связанный с ней фермент Г6ФДГ поддерживает высокий уровень активности ГР, поставляя ей НАДФН⁺. Также является хорошо известным фактом восстановление геминового железа ($Fe^{+3} \rightarrow Fe^{+2}$) в эритроцитах благодаря НАДФН⁺ – зависимой гемоглобинредуктазе.

Заключение

Полученные результаты свидетельствуют о существенных изменениях активности ГР и Г6ФДГ в плазме и эритроцитах периферической крови больных с ДГМЖ и РМЖ. Найденные отличия уровней активности антиокислительных ферментов-маркёров у больных с доброкачественными опухолями молочной железы и злокачественными (РМЖ) могут рассматриваться в качестве дополнительного биохимического теста к цитоморфологическому анализу при дифференциальной диагностике опухолей молочной железы.

Литература

1. Герасимов А. М., Королёва Л. А., Брусов О. С. Ферментативные механизмы торможения перекисного окисления в различных отделах головного мозга крыс. Вопросы медицинской химии, 1976, том. 22, № 1, с. 89-94.
2. Гублер Е. В., Генкин А. А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. Ленинград: Медицина, 1973.
3. Сейц И. Ф., Луганова И. С. Метод определения активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в лейкоцитах. Биохимия клеток крови. М., 1967, с. 113-114.
4. Aruoma O. I. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. J. Am. Oil. Chem. Soc., 1998, Vol. 75, p. 199-212.
5. Conn E., Vennesland A. Glutathione reductase of wheat germ. J. Biol. Chem., 1951, Vol. 192, p. 17-30.
6. Dreher D., Junod A. F. Role of oxygen-free radicals in cancer development. Eur. J. Cancer, 1996, Vol. 32A, p. 30-38.
7. Hayes J. D., Ellis E. M., Neal G. E. Cellular response to cancer chemopreventive agents: contribution of the antioxidant responsive element for the adaptive response to oxidative and chemical stress. In: Cellular Responses to Stress (Eds. C.P. Downes, C.R. Wolf and D.P. Lane). Biochemical Society Symposium, Portland Press, London, 1999, Vol. 64, p. 141-168.

Таблица 1

Корреляционные взаимоотношения между величинами активности ГР и Г6ФДГ в плазме и эритроцитах периферической крови больных с ДГМЖ и РМЖ

Группы обследуемых	Число пар (n)	Плазма крови		Эритроциты	
		Коэффициент Спирмена (r)	Уровень надёжности	Коэффициент Спирмена (r)	Уровень надёжности
Здоровые	20	+0.830	$p < 0.001^*$	+0.654	$p < 0.005^*$
Больные с ДГМЖ	24	-0.234	$p > 0.05$	+0.685	$p = 0.025^*$
Больные с РМЖ	12	+0.646	$p < 0.025^*$	+0.648	$p < 0.025^*$

Примечание: символ * - достоверность.

8. Kumaraguruparan R., Subapriya R., Kabalimoorthy J., Nagini S. Antioxidant profile in the circulation of patients with fibroadenoma and adenocarcinoma of the breast. *Clin. Biochem.*, 2002, Vol. 35, N. 4, p. 275-279.
9. Lowry A. H., Rosebrough H. Y., Farr A. L., Rendall R. Y. Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951; 193: 265.
10. Mantovani G., Maccio A., Madeddi C. Reactive oxygen species, antioxidant mechanisms and serum cytokine levels in cancer patients: impact of an antioxidant treatment. *J. Cell. Mol. Med.*, 2002, Vol. 6, N. 4, p. 570-582.
11. Parker L. Cell regulation by thiol antioxidants: from glutathione to lipoate to anethole dithiolethione. In: Parker L., Traber M.G. and Xin W. *Proceedings of the International Symposium on Natural Antioxidants*. AOCS Press, Champaign, IL.-1995, p. 223-235.
12. Trachootham D., Lu W., Ogasawara M. A. Redox regulation of cell survival. *Antioxid. Redox Signal.* 2008, Vol. 10, N. 8, p. 1343-1374.
13. Yeh C. C., Hou M. F., Wu S. H. A study of glutathione status in the blood and tissues of patients with breast cancer. *Cell. Biochem. Funct.*, 2006, Vol. 24, N. 6, p. 555-559.

Людмила Александровна Гаврилюк, д.м.н., профессор
 Кафедра биохимии и клинической биохимии
 ГУМФ им. Н. А. Тестемицану
 Кишинэу, ул. Н. Тестемицану, 27
 Тел.: 205404
 E-mail: gavrlu@mail.md

Recepționat 17.07.2009

Eficiența hepatoprotectorilor în tratamentul steatohepatitelor

L. David

Catedra Farmacologie și Farmacologie clinică, USMF „Nicolae Testemițanu”

Efficiency of Hepatoprotectors in the Treatment of Steatohepatitis

The efficiency of different hepatoprotectors in the treatment of 42 patients with non-alcoholic steatohepatitis was studied. It was noted that the inclusion of imuheptin in the basic treatment caused a faster downward change in dolorous, dyspeptic and astheno-vegetative syndromes. At the end of the treatment, in 73,3% patients the dimensions of the liver reached normal values, a clear vascular picture could be visualized, while in the rest of the patients the dimensions of the liver decreased considerably. The normalization of biochemical indices of cytolytic and cholestatic syndromes could be observed in 73,3% of the studied individuals. Imuheptin is a remedy influences in a positive way the main pathogenetic links of non-alcoholic steatohepatitis and induces the normalization of lipid and lipoprotein exchange.

Key words: steatohepatitis, imuheptin, hepatoprotectors.

Эффективность гепатопротекторов в лечении стеатогепатитов

Изучена эффективность различных гепатопротекторов в лечении 42 больных неалкогольным стеатогепатитом. Установлено, что включение в базисную терапию имухептина способствует более раннему купированию болевого, диспептического и астеновегетативного синдромов. У 73,3% больных к окончанию курса лечения размеры печени нормализовались, определялся четкий сосудистый рисунок, у остальных - размеры печени значительно уменьшились. Нормализация биохимических показателей синдрома цитолиза и холестаза имела место у 73,3% обследованных больных. Имухептин является средством, которое благоприятным образом воздействует на ведущие звенья патогенеза неалкогольного стеатогепатита и способствует нормализации обмена липидов и липопротеидов.

Ключевые слова: стеатогепатит, имухептин, гепатопротекторы.

Introducere

Afecțiunile metabolice ale ficatului, dintre care cele mai importante sunt steatozele și steatohepatitele, constituie mai mult de 50% din structura bolilor hepatice cronice [1, 3]. Denumirea de *steatohepatită nonalcoolică (SHNA)* reflectă dezvoltarea reacției inflamatoare-necrotice pe fundalul steatozei hepatice cu picături mari. Deoarece semnele morfologice ale patologiei sunt similare celor înregistrate în hepatita alcoolică, este necesară excluderea consumului excesiv de alcool în fiecare caz analizat. SHNA mai este numită și steatohepatită, boală pseudoalcoolică a ficatului, hepatita diabeticilor ș.a. Frecvența reală a SHNA nu este cunoscută. Conform rezultatelor obținute la autopsii, steatohepatita a fost depistată în aproximativ 6% din cazuri, iar conform biopsiei ficatului efectuată în cazurile de hepatită cronică de etiologie necunoscută – la 20% dintre bolnavi [2, 3, 4, 5].

Cel mai frecvent, steatohepatita nonalcoolică se dezvoltă pe fundalul infiltrării lipidice a ficatului cu picături mari la persoane cu exces ponderal și/sau cu diabet zaharat. Steatoza ficatului este depistată la 70% dintre bolnavi, a căror masă a corpului depășește cu 110-200% masa teoretic ideală. La 20-70% dintre bolnavii cu SHNA este depistat diabetul zaharat, iar la ceilalți, în diferite perioade de evoluție a maladiei, este diagnosticată scăderea toleranței la glucoză.

Trebuie menționat că, în patogeneza leziunilor ficatului din obezitate, insulinorezistență, dislipidemie, patologii ale sistemului cardiovascular, un rol de bază aparține acumulării lipidelor în hepatocite și intensificarea proceselor de oxidare peroxidică și de formare a radicalilor liberi, cu dezvoltarea necrozei celulelor ficatului. În serul sanguin al pacienților cu steatohepatită se depistează majorarea considerabilă a proceselor OPL [3]. În același timp, scade activitatea fermenților sistemului antioxidant (SAO). Efectul hepato-