

В.М. Николаев, Е.В. Цыпандина, Е.К. Румянцев,
С.И. Софронова, Ф.В. Винокурова, С.Д. Ефремова,
Е.Н. Александрова, Ф.Г. Иванова, П.М. Иванов, С.А. Федорова

ОЦЕНКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ СИСТЕМЫ ГЛУТАТИОНА В ОРГАНИЗМЕ БОЛЬНЫХ РАКОМ ЛЕГКОГО

DOI 10.25789/YMJ.2018.64.04

УДК 616-006.66: 577.115.4

В данной работе проведено исследование изменений показателей системы глутатиона у больных раком легкого и лиц, не имеющих онкопатологии. Рассмотрены этнические особенности общей ферментативной активности глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы, глутатион-S-трансферазы и концентрации восстановленного глутатиона.

Ключевые слова: глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза, глутатион-S-трансфераза, восстановленный глутатион, ТБК-активные продукты, система глутатиона.

The paper reports a study of changes in the indicators of the glutathione system in patients with lung cancer and those without cancer. The ethnic characteristics of the total enzymatic activity of glutathione peroxidase, glutathione reductase, glutathione-S-transferase and the concentration of reduced glutathione are considered.

Keywords: glutathione peroxidase, glutathione reductase, glutathione-S-transferase, reduced glutathione, TBA-active products, glutathione system.

Введение. Глутатион – внутриклеточный трипептид, состоящий из аминокислот: L-глутамата, L-цистеина и L-глицина, он присутствует в клетках всех эукариот, в т.ч. в клетках опухоли. Концентрация глутатиона в клетках очень высока, достигает от 1 до 10 mM [15]. Основными резервуарами этого трипептида в клетке служат: цитозоль (90%), митохондрии (10%) и небольшой процент падает на долю эндоплазматического ретикулума [13]. Обмен глутатиона протекает достаточно быстро, например, в печени крыс период его полужизни составляет всего 2–3 ч [4].

Глутатион легко вступает в реакции с электрофильными соединениями (канцерогены, лекарственные препараты), снижая при этом их токсичность [14]; в ядре он способствует репарации поврежденной ДНК [3]; обезвреживает свободные радикалы и пероксиды

[11]; обеспечивает активный транспорт аминокислот [6]; участвует в модуляции иммунного ответа [8], регулирует редокс-статус тиоловых белков NFκB, каспазы, которые участвуют в апоптозе [12]. Следует отметить, что глутатион имеет очень важное значение в защите клеток, однако высокая концентрация глутатиона в опухолевых клетках способна увеличить их выживаемость, повышая их устойчивость к химиотерапевтическим препаратам и свободнорадикальному окислению [5].

Эффективность химиотерапевтического лечения часто зависит от индивидуальных генетических особенностей пациента, его чувствительности к фармацевтическим препаратам [9, 16]. В немногочисленных литературных источниках указывается, что азиаты тяжелее переносят химиотерапию, по сравнению с европейцами [7]. В связи с этим мы решили оценить влияние этнической принадлежности на показатели системы глутатиона у больных раком легкого и лиц, не страдающих онкопатологией.

Целью настоящего исследования является оценка уровня показателей глутатиона в организме больных раком легкого русских и якутов.

Материалы и методы исследования. Обследовано 50 чел. больных раком легкого, поступивших в Якутский республиканский онкологический диспансер. Диагноз рак легкого подтверждался гистологически. Больные были разделены на две группы по этническому признаку: первая группа – якуты, вторая – русские. Контрольная группа подобрана с учетом возраста, пола и этнической принадлежности и

включала 50 чел. Основным критерием отбора в контрольную группу было отсутствие онкологических заболеваний. Материалом исследования была венозная кровь, которую брали натощак из локтевой вены.

Концентрацию показателей системы глутатиона определяли в эритроцитах, а уровень ТБК-АП – в сыворотке крови с помощью спектрофотометра «СФ-2000». Содержание восстановленного глутатиона определяли по реакции с 5,5-дифитиобис(2-нитробензойной кислотой) при 412 нм и выражали в мкМ/гHb [2]. Активность глутатионредуктазы определяли по скорости окисления NADPH+ в присутствии окисленного глутатиона при 340 нм и выражали в мкMGSSG/мин*гHb. Активность глутатион-S-трансферазы определяли при 340нм по скорости образования конъюгатов с 1-хлор-2,4-динитробензолом в присутствии восстановленного глутатиона и выражали в мкМ GSH/мин*гHb [10]. Активность глутатионпероксидазы определяли при 412 нм в реакции расщепления гидроперекиси третичного бутила, используя в качестве субстрата восстановленный глутатион. Активность фермента выражали в мкМ GSH/мин*гHb [1]. Уровень ТБК-АП определяли путем реакции конечных продуктов свободнорадикального окисления липидов с тиобарбитуровой кислотой с образованием окрашенного триметинового комплекса, который измеряли при длине волны 532 нм, и выражали в мкМ/л [17].

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью пакета прикладных статистических

ЯНЦ КМП: **НИКОЛАЕВ Вячеслав Михайлович** – к.б.н., гл.н.с.-руковод. отдела, доцент Якутской ГСХА, Nikolaev1126@mail.ru, **ЕФРЕМОВА Светлана Дмитриевна** – м.н.с., esd64@mail.ru, **ВИНОКУРОВА Фекла Васильевна** – н.с., vfekla@gmail.com, **ЦЫПАНДИНА Евгения Викторовна** – м.н.с., tsypandina93@mail.ru, **РУМЯНЦЕВ Егор Константинович** – м.н.с., tzeentch1993@mail.ru, **СОФРОНОВА Саргылана Ивановна** – к.м.н., гл.н.с.-руковод. отдела, sara2208@mail.ru, **ИВАНОВ Петр Михайлович** – д.м.н., с.н.с., yncmp@yandex.ru; **АЛЕКСАНДРОВА Елена Николаевна** – зав. отд. Якутского респ. онкологич. диспансера, elenaku75@mail.ru; **ИВАНОВА Феодосия Гаврильевна** – к.м.н., зав. отд. ЯРОД, feodossiaiv@inbox.ru; **ФЕДОРОВА Сардана Аркадьевна** – д.б.н., зав. науч.-иссл. лаб. СВФУ им. М.К. Аммосова, sa.fedorova@s-vfu.ru.

программ SPSS for Windows 10.0. Применяли стандартные методы вариационной статистики: вычисление средних величин, стандартных ошибок, 95% доверительного интервала. Достоверность различий между средними оценивали с помощью критерия t Стьюдента для независимых выборок. Данные в таблицах представлены в виде $M \pm m$, где M – средняя, m – ошибка средней. Вероятность справедливости нулевой гипотезы принимали при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Согласно полученным нами данным в группе относительно здоровых людей, не страдающих онкопатологией, содержание восстановленного глутатиона было равно $2,32 \pm 0,09$ мкМ/гHb. Концентрация восстановленного глутатиона изменялась в зависимости от этнической принадлежности: в первой группе она составляла $2,50 \pm 0,05$ мкМ/гHb, во второй – $2,04 \pm 0,06$ мкМ/гHb, т.е. у якутов была выше на 18,4%, по сравнению с русскими.

Активность глутатионредуктазы была равна $6,8 \pm 0,30$ мкМGSSG/мин*гHb. Уровень среднего значения активности глутатионредуктазы в первой группе ($7,5 \pm 0,10$ мкМGSSG/мин*гHb) был на 20% выше ($p < 0,05$), чем во второй ($6,01 \pm 0,30$ мкМGSSG/мин*гHb).

Активность глутатион-S-трансферазы была равна $2,44 \pm 0,07$ мкMGSH/мин*гHb. Нами наблюдается уменьшение активности глутатион-S-трансферазы в первой группе ($2,20 \pm 0,06$ мкМ GSH/мин*гHb) на 9% по сравнению со второй группой ($2,42 \pm 0,03$ мкМ GSH/мин*гHb).

Уровень глутатионпероксидазы был равен $6,10 \pm 0,005$ мкMGSH/мин*гHb. В зависимости от этнической принадлежности отмечались различия в активности фермента: в первой группе ($6,50 \pm 0,009$ мкMGSH/мин*гHb) она была достоверно выше (на 35,4%), чем во второй ($4,20 \pm 0,002$ мкМ GSH/мин*гHb).

Концентрация показателя перекисного окисления липидов – ТБК-АП – была равна $1,61 \pm 0,10$ мкМ/л и зависела от этнической принадлежности. Так, в первой группе этот показатель соответствовал $1,71 \pm 0,16$ мкМ/л, во второй – $1,38 \pm 0,28$ мкМ/л, т.е. в первой группе уровень ТБК-АП был выше на 19,3% ($p < 0,05$).

В зависимости от этнической принадлежности у относительно здоровых лиц изменяются показатели системы глутатиона. В группе якутов отмечают более высокие показатели концентрации восстановленного глутатиона (18%), активности глутатионредуктазы

(20%) и глутатионпероксидазы (35,4%). Также нами отмечена интенсификация свободнорадикального окисления липидов в организме якутов, о чем свидетельствует повышение концентрации ТБК-АП на 19,3%.

В организме больных раком легкого концентрация восстановленного глутатиона была достоверно ниже (на 28,8%) по сравнению с лицами, не страдающими онкопатологией, и равнялась $1,65 \pm 0,01$ мкМ/гHb. Это, вероятно, может быть обусловлено высокой скоростью потребления и низкой скоростью его восстановления. Поддержание достаточно высокого уровня восстановленного глутатиона путем восстановления его дисульфидной формы обеспечивается глутатионредуктазой. Активность глутатионредуктазы в группе больных была меньше на 36,7%, чем в контрольной, и составляла $4,30 \pm 0,05$ мкMGSSG/мин*гHb. Следовательно, регенерация глутатиона в эритроцитах крови больных раком легкого на должном уровне не происходит. Наиболее вероятной причиной этого явления может быть недостаточная регенерация НАДФН+Н + в пентозофосфатном пути. Активность глутатион-S-трансферазы фактически не отличалась от контроля и была равна $2,42 \pm 0,01$ мкМ GSH/мин*гHb. Активность глутатионпероксидазы понижалась на 68,8% ($1,9 \pm 0,001$ мкМ GSH/мин*гHb), чем в группе контроля. У больных раком легкого отмечалось достоверное повышение свободнорадикального окисления липидов. Среднее содержание ТБК-АП в крови больных раком легкого было на 32,6% выше контрольного значения и равнялось $2,39 \pm 0,32$ мкМ/л.

В группе больных концентрация восстановленной формы глутатиона, а также активность глутатионредуктазы не имели достоверных различий в зависимости от этнической принадлежности. В первой группе больных содержание восстановленного глутатиона ($1,64 \pm 0,01$ мкМ/гHb) было на 34,4% меньше ($P < 0,05$), по сравнению с контрольной группой, во второй группе больных – на 18,6% ниже ($P < 0,05$) ($1,66 \pm 0,009$ мкМ/гHb). Активность глутатионредуктазы в первой группе больных была на 10,5% ниже ($6,71 \pm 0,09$ мкMGSSG/мин*гHb), а во второй группе больных на 13,0% выше контроля ($6,9 \pm 0,15$ мкMGSSG/мин*гHb).

Достоверных различий в активности фермента, выполняющего детоксикационную функцию, у больных раком легкого в зависимости от этнической принадлежности нами обнаружено не было. Активность глутатион-S-тран-

сферазы в первой группе больных была на 7,1% ($2,37 \pm 0,15$ мкМ GSH/мин*гHb), во второй группе на 3,0% ($2,49 \pm 0,25$ мкМ GSH/мин*гHb) выше контрольного значения.

Оценка состояния ферментативного звена антиоксидантной защиты в крови больных раком легкого показала, что активность глутатионпероксидазы в обеих группах больных достоверно уменьшалась. В первой группе активность глутатионпероксидазы была на 70,7% меньше контроля ($1,90 \pm 0,005$ мкМ GSH/мин*гHb); а во второй группе – на 52,4% ($2,00 \pm 0,012$ мкМ GSH/мин*гHb).

При этом интенсивность свободнорадикального окисления в организме онкобольных увеличивалась, о чем свидетельствует увеличение содержания ТБК-АП – у пациентов первой группы до $2,35 \pm 0,12$ мкМ/л, что было на 27,2% выше контроля ($P < 0,01$), второй группы – до $2,45 \pm 0,25$ мкМ/л, что превышает показатели контроля на 43,6% ($P < 0,05$).

Выводы. Таким образом, результаты проведенного нами исследования показали, что у больных раком легкого показатели системы глутатиона изменяются в зависимости от этнической принадлежности. Среди больных концентрация восстановленного глутатиона у якутов снижалась на 34,4%, русских – на 18,6%, активность глутатионпероксидазы – на 70,7 и 52,4% соответственно. Активность глутатионредуктазы в организме больных раком легкого уменьшалась у якутов на 10,5%, а у русских повышалась на 13,0%. Полученные нами результаты свидетельствуют об истощении системы глутатиона в группе онкобольных якутской этнической принадлежности, что, вероятно, является причиной тяжелой переносимости химиотерапии.

Данное исследование было проведено в рамках НИР «Эпидемиологические аспекты злокачественных опухолей в условиях Крайнего Севера, разработка современных методов ранней диагностики, профилактики с использованием высокоинформативных фундаментальных методов исследования» в отделе изучения механизмов адаптации Якутского научного центра комплексных медицинских проблем.

Литература

1. Alwaleedi S.A. Alterations in antioxidant defense system in hepatic and renal tissues of rats following aspartame intake / S.A. Alwaleedi // Journal of Applied Biology and Biotechnology. – 2016. – №4(2). – P.46–52. doi: 10.7324/JABB.2016.40207

2. Analysis of GSH and GSSG after derivatization with N-ethylmaleimide / D. Giustarini, I. Dalle-Donne, A. Milzani [et al.] // *Nature Protocols*. – 2013. – №8(9). – P.1660-1669. doi: 10.1038/nprot.2013.095.
3. Bansal A. Glutathione metabolism in cancer progression and treatment resistance / A. Bansal, M.C. Simon // *Journal of cell biology*. – 2018. – №217(7). – P.2291–2298. doi: 10.1083/jcb.201804161
4. Bilinsky L.M. The role of skeletal muscle in liver glutathione metabolism during ACEtaminophen overdose / L.M. Bilinsky, M.C. Reed, H.F. Nijhout // *Journal of Theoretical Biology*. – 2015. – №376. – P.118–133. doi: 10.1016/j.jtbi.2015.04.006.
5. Corso C.R. Glutathione system in animal model of solid tumors: from regulation to therapeutic target / C.R. Corso, A. Acco // *Critical Reviews in Oncology / Hematology*. – 2018. – №128. – P.43–57. doi: <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2018.05.014>
6. Emerging regulatory paradigms in glutathione metabolism / Y. Liu, A. S. Hyde, M. A. Simpson [et al.] // *Advances in Cancer Research*. – 2014. – №112. – P.69–101. doi: 10.1016/B978-0-12-420117-0.00002-5
7. Ethnic Difference in Hematological Toxicity in Patients with Non-small Cell Lung Cancer Treated with Chemotherapy A Pooled Analysis on Asian versus Non-Asian in Phase II and III Clinical Trials / Y. Hasegawa, T. Kawaguchi, A. Kubo [et al.] // *Journal of Thoracic Oncology*. – 2011. – №11(6). P. 1881-1888. ISSN: 1556-0864/11/0611-1881
8. Glutathione fine-tunes the innate immune response toward antiviral pathways in a macrophage cell line independently of its antioxidant properties / M. Diotallevi, P. Checconi, A.T. Palamara [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2017. – №8. – P.1239. doi: 10.3389/fimmu.2017.01239
9. Hollman A.L. The Association between gene-environment interactions and diseases involving the human GST superfamily with SNP variants / A.L. Hollman, P.B. Tchounwou, H.C. Huang // *International Journal of Environmental Research and Public Health*. – 2016. – №13(4). – P.1–14. doi: 10.3390/ijerph13040379
10. Increase in blood glutathione and erythrocyte proteins related to glutathione generation, reduction and utilization in african-american old women with diabetes / G. Shan, F. Yang, L. C. Zhou [et al.] // *Journal of Science, Technology and Environment Informatics*. – 2015. – №5(1). – P.1-15. PMID: 26770888
11. Kurutas E.B. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state / E.B. Kurutas // *Nutrition Journal*. – 2016. – №15. – P.1–22. doi: 10.1186/s12937-016-0186-5
12. L-Cysteine protects intestinal integrity, attenuates intestinal inflammation and oxidant stress, and modulates NF- κ B and Nrf2 pathways in weaned piglets after LPS challenge / Z. Song, G. Tong, K. Xiao [et al.] // *Innate Immunity*. – 2016. – №22(3). – P.152–161. doi: 10.1177/1753425916632303
13. Lu S. C. Glutathione synthesis / S. C. Lu // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2013. – №1830(5). – P.3143–3153. doi: 10.1016/j.bbagen.2012.09.008.
14. Ramsay E.E. Glutathione S-conjugates as prodrugs to target drug-resistant tumors / E.E. Ramsay, P.J. Dilda // *Frontiers in Pharmacology*. – 2014. – №5. – P.1-16. doi: 10.3389/fphar.2014.00181
15. Real-Time monitoring of glutathione in living cells reveals that high glutathione levels are required to maintain stem cell function / E. M. Jeong, J. H. Yoon, J. Lim [et al.] // *Stem Cell Reports*. 2018. – №10(2). – P.600–614. doi: 10.1016/j.stemcr.2017.12.007
16. Significance of polymorphisms and expression of enzyme-encoding genes related to glutathione in hematopoietic cancers and solid tumors / S. Zmorzynski, G. Uwiderska-Kobacz, D. Koczkodaj [et al.] // *BioMed Research International*. – 2015. – P.1-6. doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/853573>
17. The concentration of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and paraoxonase activity in blood of patients with osteoarthritis after endoprosthesis implantation / D.M. Olszewska-Slonina, D. Mątewski, R. Czajkowski [et al.] // *Medical Science Monitor*. – 2011. – №17(9). – P.498–504. doi: 10.12659/MSM.881936

Р.З. Алексеев, А.С. Гольдерова, С.Н. Мамаева,
Н.А. Николаева, М.Т. Бузинаева

ОЦЕНКА ИЗМЕНЕНИЯ ЭРИТРОЦИТОВ МЕТОДОМ РАСТРОВОЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ У ЛИЦ, УМЕРШИХ ОТ ПЕРЕОХЛАЖДЕНИЯ

DOI 10.25789/YMJ.2018.64.05

УДК 612.117.6; 614.873.23

В статье представлены результаты исследования морфологии эритроцитов умерших от различных причин смерти (ранения, переохлаждение) методом растровой электронной микроскопии. Полученные данные показывают, что появление определенных форм эритроцитов трупного материала зависит от причин смерти. Так, при смерти от колото-резаной и огнестрельной ран эритроциты принимают акантоцитарные формы, а при переохлаждении – эхиноцитарные формы. В проведенном *in vitro* эксперименте при небольших отрицательных температурах в образцах крови наблюдается появление акантоцитов. Исходя из полученных в данной работе результатов, а также на основе свойства эритроцита эхиноцитарной формы, имеющего возможность восстанавливаться, можно косвенно утверждать, что вероятность восстановления жизнедеятельности организма замерзших не исключается.

Ключевые слова: эритроциты, холод, переохлаждение, электронная микроскопия.

The paper presents results of study of red blood cells (RBC) morphology of deceased from various causes (injury, hypothermia) by using scanning electron microscopy. The obtained data show that the appearance of certain forms of cadaveric erythrocytes depends on the causes of death. Therefore, when death is caused by stabbing and gunshots RBC take acanthocyte forms and in cases of fatal hypothermia – echinocyte forms. *In vitro* experiment at small negative temperatures the appearance of acanthocytes in blood samples is observed. Based on the obtained data and on the ability of echinocyte to return to normal form, it can be concluded that the probability of restoring the vital activity of the frozen organisms are possible.

Keywords: red blood cells, hypothermia, scanning electron microscopy.

АЛЕКСЕЕВ Рево Захарович – д.м.н., проф., с.н.с. ЯНЦ КМП, arzrevo@mail.ru; ФТИ СВФУ им. М.К.Аммосова; **ГОЛЬДЕРОВА Айталиа Семеновна** – д.м.н., проф., hoto68@mail.ru; **МАМАЕВА Саргылана Николаевна** – к.ф.-м.н., доцент, sargylana_mamaeva@mail.ru; **НИКОЛАЕВА Надежда Анатольевна** – ассистент кафедры; **БУЗИНАЕВА Мария Телектесовна** – к.м.н., зав. лаб. БСМЭ МЗ РС(Я).

Введение. Общее охлаждение и отморожения являются одними из тяжелых видов холодовой травмы, зачастую они приводят к высокому уровню инвалидизации и летальному исходу пострадавших [1]. В настоящее время в мире до конца не изучены вопросы смерти от общего охлаждения в условиях сверхнизких температур (ниже -40°C). В реальных условиях

лиц, умерших от переохлаждения (по внешним признакам), без проведения реанимационных мероприятий доставляют в морг. Однако немаловажным моментом считается, что в течение первых 2 сут пострадавшие находятся в состоянии холодового анабиоза (очень редкий пульс, низкое АД) и вероятность восстановления жизнедеятельности организма не исключается.