

Э. В. КЛОЧКО, Л. В. КОВАЛЬЧУК, К. Е. КРУГЛЯКОВА, И. Ф. СЕЙЦ,
И. С. ЛУГАНОВА, М. Н. БЛИНОВ, академик Н. М. ЭМАНУЭЛЬ

СВОБОДНЫЕ РАДИКАЛЫ И ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ ОБМЕН В ЛЕЙКОЦИТАХ ПРИ ЛЕЙКОЗАХ

Как свидетельствуют многочисленные экспериментальные данные, содержание свободных радикалов в опухолевой ткани значительно отличается от их уровня в здоровой гомологичной ткани (¹⁻⁵) и др.). Сведения о причинах изменения концентрации свободных радикалов в процессе злокачественного роста практически отсутствуют. Вместе с тем, изучение свободно-радикальных состояний в опухоли могло бы предоставить существенную информацию при исследовании возможных механизмов малигнизации.

Результаты сравнительного изучения спектров электронного парамагнитного резонанса, полученных на модельных системах (окисление — восстановление витаминов В₂, К, С, коэнзима Q₁₀, флавонов и др.) и спектров э.п.р. целых тканей позволяют думать, что сигнал электронного парамагнитного резонанса биологической ткани обусловлен активными центрами ферментов, ответственных за транспорт электронов в окислительно-восстановительных ферментативных системах (⁶⁻⁸) и др.). Подчеркивается также, что определенный вклад в сигнал э.п.р. биологической ткани вносится системой окислительного фосфорилирования (^{9, 10}).

Процесс злокачественного перерождения сопровождается нарушением основных метаболических процессов, которые могут быть связаны с изменением свободно-радикальных состояний. Существует точка зрения, что в раковых клетках повреждается дыхательная цепь и, в частности, может наблюдаться ослабление сопряжения дыхания и фосфорилирования (¹¹). По некоторым данным нарушение процессов энергетического обмена может иметь место и при действии различных канцерогенных соединений (^{12, 13}) и др.). Не исключено, что наблюдаемое нами повышение уровня свободных радикалов в лейкоцитах при развитии лейкозного процесса может быть обусловлено нарушением энергетического обмена клеток (¹⁴).

В данной работе было изучено изменение концентрации свободных радикалов в лейкоцитах людей, больных хроническим лимфолейкозом и хроническим миелолейкозом, при различных экспериментальных воздействиях на энергетическую систему.

Для исследования влияния различных метаболических ядов на энергетический обмен и содержание свободных радикалов были использованы интактные лейкоциты. Измерение сигнала э.п.р. производили на лиофилизированных препаратах лейкоцитов на установке ЭПР-2 ИХФ и на влажных препаратах лейкоцитов на установке ЭПР ИВС в Ленинграде. Методика выделения и лиофилизации лейкоцитов описана ранее (¹⁴). Выделенная взвесь лейкоцитов инкубировалась в среде кребсрингерфосфат + + сыворотка донора (1:1) с соответствующими метаболическими ядами при температуре 37° в течение 30 мин. Для измерения сигнала э.п.р. клетки промывали физиологическим раствором при повторном центрифугировании при 600 об/мин. Одновременно определяли дыхание клеток манометрически на приборе Варбурга, гликолиз по содержанию молочной кислоты, уровень АТФ в гексокиназной реакции (¹⁵).

Всего было изучено содержание свободных радикалов при действии метаболических ядов в лейкоцитах не начавших курс лечения 60 больных хроническим лимфо- и миелолейкозом и 20 доноров. В качестве метаболических ядов использовали монобромацетат, фторид натрия, 2,4-динитрофенол и олигомицин.

На рис. 1 представлены спектры э.п.р. лиофилизированных и влажных препаратов лейкоцитов. Интенсивность сигнала с g -фактором 2,003 во влажных препаратах оказалась слабее, чем в лиофилизированных ($8 \cdot 10^{16}$ и $2 \cdot 10^{16}$ мол/л, соответственно). Ранее было показано, что в случае лиофилизированных и влажных препаратов лейкоцитов наблюдается повышение уровня свободно-радикальных состояний в «лейкемических» лейкоцитах относительно нормы (14).

Кроме того, при измерении сигнала э.п.р. во влажных клетках при хроническом лимфолейкозе

наряду с типичным для биологических объектов асимметричным синглетом с g -фактором 2,003 в некоторых случаях обнаруживается не наблюдавшийся ранее широкий сигнал с g -фактором 2,09 (рис. 1в). Объяснение природы этого сигнала требует специальных экспериментов и может оказаться существенным при изучении метаболических особенностей «лейкемических» лейкоцитов.

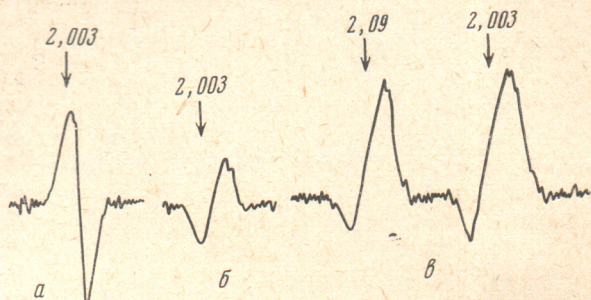


Рис. 1. Характерные сигналы э.п.р.: а — лиофилизированный препарат лейкоцитов донора, б — влажный препарат лейкоцитов донора, в — влажный препарат больного хроническим лимфолейкозом (по 10^9 клеток каждого препарата)

Т а б л и ц а 1

Дыхание, гликолиз, содержание АТФ и уровень свободнорадикальных состояний в лейкоцитах при действии метаболических ядов

	Поглощение O_2 , μ л	Прирост молочной к-ты, μ г	Содержание АТФ, μ г	Концентрация свободн. радикалов, %
1. Доноры				
а) лейкоциты + Гл	1120	7,1	154	100
б) лейкоциты + Гл + БА	1170	0	49	60
в) лейкоциты + Гл + НФ	1000	0	90	100
г) лейкоциты + Гл + ДНФ	1150	12,0	160	50
д) лейкоциты + Гл + Ол	1130	8,0	150	95
2. Хронический лимфолейкоз				
а) лейкоциты + Гл	1104	8,7	112	100
б) лейкоциты + Гл + БА	1275	0	25	50
в) лейкоциты + Гл + НФ	1300	0	75	95
г) лейкоциты + Гл + ДНФ	1320	13,0	100	50
д) лейкоциты + Гл + Ол	1150	8,0	98	90
3. Хронический миелолейкоз				
а) лейкоциты + Гл	112	0	133	100
б) лейкоциты + Гл + БА	25	0	0	60
в) лейкоциты + Гл + НФ	75	0	80	90
г) лейкоциты + Гл + ДНФ	100	9,0	122	40
д) лейкоциты + Гл + Ол	98	7,0	110	90

Примечания. Приводятся данные в расчете на 10^9 клеток. Среда — кребрингерфосфат + + сыворотка донора (1:1). Температура инкубации 37° , продолжительность инкубации 30 мин. Значения — средние из 60 опытов. Ошибка $\pm 10\%$.

Гл. — глюкоза, БА — монобромацетат, $8 \cdot 10^{-4}$ М; НФ — фторид натрия, $2 \cdot 10^{-2}$ М; ДНФ — 2,4-динитрофенол, $8 \cdot 10^{-4}$ М; Ол — олигомицин, $2 \cdot 10^{-4}$ М.

При инкубации «лейкемических» лейкоцитов с различными метаболитическими ядами оказалось, что уровень свободно-радикальных состояний значительно снижается лишь при действии на «лейкемические» лейкоциты 2,4-динитрофенола, разобщающего окислительное фосфорилирование на начальных этапах. Концентрация свободных радикалов снижалась при этом на 50% (рис. 2). Применение олигомицина, разобщающего процессы окислительного фосфорилирования на более поздних этапах, не оказывало

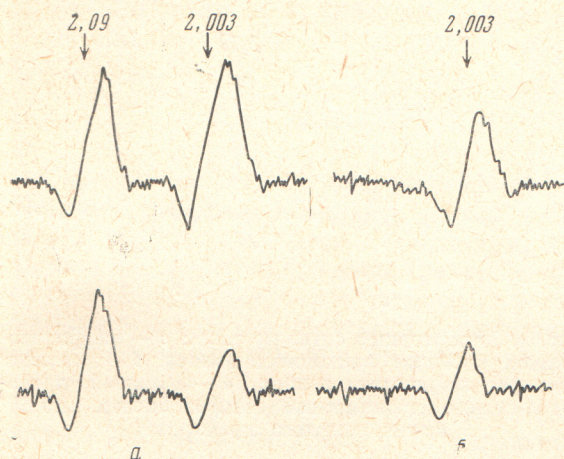


Рис. 2. Спектр сигнала э.п.р. до и после инкубации с 2,4-динитрофенолом. Среда — кребринг-фосфат + сыворотка донора (1:1). Температура инкубации 37°. Продолжительность инкубации 30 мин. Измеряемые пробы содержали 10^9 клеток. а — лейкоциты больных хроническим лимфолейкозом, б — лейкоциты больных хроническим миелолейкозом

заметного влияния на уровень свободно-радикальных состояний в «лейкемических» лейкоцитах. Активность гликолиза, дыхание и содержание АТФ в исследуемых лейкоцитах при применении различных ядов представлены в табл. 1. Инкубация здоровых лейкоцитов с 2,4-динитрофенолом и олигомицином не выявила значительного влияния на концентрацию свободных радикалов этих метаболитических ядов.

При различных воздействиях на гликолитические процессы в здоровых и «лейкемических» лейкоцитах изменения концентрации обнаружено не было. Уровень свободных радикалов в лейкоцитах здоровых и больных хроническими лейкозами людей не изменялся ни при подавлении активности гликолиза с помощью фторида натрия, ни при стимулировании гликолитических процессов в условиях анаэробноза (табл. 1). Более заметно влиял на концентрацию свободных радикалов монобромцетат, блокирующий гликолиз. Однако можно предположить, что в данном случае изменение уровня свободных радикалов происходит в результате повреждения системы окислительного фосфорилирования (табл. 1).

Согласно литературным данным (16), сигнал э.п.р. нормальной биологической ткани, связанный с компонентами дыхательной системы и ее сопряжения, достаточно устойчив при действии разобщителей окислительного фосфорилирования. Если предполагать, что основной вклад в сигнал э.п.р. вносится окислительными процессами, то приходится считать, что изменение гликолитической активности незначительно влияет на общий уровень свободно-радикальных состояний в лейкоцитах. Сильная зависимость концентрации свободных радикалов в «лейкемических» лейкоцитах от 2,4-динитрофенола и отсутствие эффективного действия разобщения сопряжения дыхания и фосфорилирования при инкубации с олигомицином свидетельствуют об определенной связи содержания свободных радикалов с начальными этапами окислительного фосфорилирования.

Таким образом, можно предполагать, что повышенное содержание свободных радикалов в лейкоцитах при развитии лейкозного процесса указывает на существование определенных нарушений в системе сопряжения дыхания и фосфорилирования.

Авторы выражают благодарность Э. Н. Казбекову за помощь при измерении спектров э.п.р. влажных образцов лейкоцитов.

Институт химической физики
Академии наук СССР
Москва

Поступило
23 IX 1969

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ В. Commoner, J. Townsend, Progress Report Nat. Cancer Ints. U.S.A., 1959. ² F. Truby, T. Goldsicher, Nature, 182, 1371 (1958). ³ А. Н. Сап-рин, Э. В. Ключко и др., ДАН, 167, № 1, 222 (1966). ⁴ А. Н. Саприн, К. Е. Круглякова, Н. М. Эмануэль, Междун. противораковый конгресс, Токио, Тез. докл., 1966, стр. 347. ⁵ А. Н. Саприн, Е. А. Миненкова и др., Биофизи-ка, 10, 4, 616 (1966). ⁶ А. Э. Калмансон, Усп. биол. хим., 5, 289 (1963). ⁷ Л. А. Блюменфельд, Изв. АН СССР, сер. биол., 33, 285, (1957). ⁸ Э. К. Рууге, Кан-дидатская диссертация, МГУ, 1966. ⁹ Л. М. Райхман, Л. А. Блюменфельд, Биохимия, 31, 6, 1127 (1966). ¹⁰ В. И. Жолкевич, А. Г. Четвериков, Сво-бодно-радикальные процессы в биологических системах, «Наука», 1966, стр. 175. ¹¹ О. Warburg, Science, 124, 269 (1957). ¹² В. М. Бобр, Ю. П. Козлов, Г. Е. Михайловский, ДАН, 175, № 5 (1967). ¹³ A. Graffi, A. Pisarzewski, C. Sydon, Acta biol. et med. germ., 5, 3, 307 (1960). ¹⁴ И. А. Кассирский, Н. М. Эмануэль и др., Пробл. гематол. и перелив. крови, № 8, 11 (1967). ¹⁵ М. Н. Блинов, Кандидатская диссертация, Инст. переливания крови, Л., 1966.