

УДК 612.112.94:613.165.6.

**ВЛИЯНИЕ УФ-СВЕТА НА АКТИВНОСТЬ ГЕКСОКИНАЗЫ  
И ГЛЮКОЗО-6-ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ЛИМФОЦИТОВ  
ДОНОРОВ И БОЛЬНЫХ ОСТРЫМ ПАНКРЕАТИТОМ**

**О. В. Башарина, В. Г. Артюхов, М. Г. Зеленецкая, И. А. Коробкина, Я. Г. Спахова**

*ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»*

Поступила в редакцию 01.03.2016 г.

**Аннотация.** Исследовано влияние УФ-света (240 – 390 нм) в дозе 755 Дж/м<sup>2</sup> на активность ключевых ферментов пентозофосфатного пути и гликолиза в лимфоцитах крови здоровых доноров и больных острым панкреатитом. В ходе суточной инкубации УФ-облученных лимфоцитов здоровых доноров выявлено повышение в них активности гексокиназы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, более выраженное в присутствии аутологичной плазмы крови.

Активность гексокиназы в лимфоцитах больных ОП повышена, активность Г6ФДГ находится в пределах нормальных значений. У здоровых доноров и больных ОП динамика изменения активности как гексокиназы, так и Г6ФДГ в ходе суточной инкубации лимфоцитов без плазмы крови имеет разнонаправленный характер.

*Ключевые слова:* лимфоциты, УФ-облучение, гликолиз, гексокиназа, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, аутологичная плазма, острый панкреатит

**Abstract.** Influence of UV-light (240—390 nm) in doze 755 J/m<sup>2</sup> on activity of key enzymes of the pentose phosphate pathway and glycolysis in the blood lymphocytes of healthy donors and patients with acute pancreatitis was investigated. During daily incubation of UV-irradiated lymphocytes of healthy donors revealed an increase in the activity of hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase, more pronounced in the presence of autologous plasma.

The activity of hexokinase in lymphocytes of patients with acute pancreatitis increased, activity G6P-DH is within the normal values. In healthy donors and patients with acute pancreatitis dynamics of change of activity of hexokinase as well as G6PDH during daily incubation of lymphocytes without plasma has multidirectional nature.

**Keywords:** lymphocytes, UV-light, hexokinase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, autologous plasma, acute pancreatitis.

Ультрафиолетовое облучение крови (УФОК) применяется в медицине как универсальный метод лечения заболеваний, для которых характерны иммунодефицит, нарушение реологических свойств крови, развитие воспаления, ослабление процессов синтеза АТФ. Эти факторы в той или иной мере присутствуют при любом заболевании воспалительного генеза. Их устранение с помощью УФОК приводит к улучшению состояния больных, ремис-

сии или выздоровлению. В настоящее время метод аутотрансфузии УФОК используется для лечения весьма широкого спектра заболеваний, в том числе и панкреатита [1, 2]. Известно, что УФ-облучение крови стимулирует в ней свободнорадикальные процессы, активизирует процессы внутриклеточного метаболизма, улучшает утилизацию глюкозы тканями [3, 4]. Однако до настоящего времени остаются малоизученными многие аспекты физико-химических механизмов лечебного эффекта фотомодифицированной крови.

---

© Башарина О. В., Артюхов В. Г., Зеленецкая М. Г., Коробкина И. А., Спахова Я. Г., 2016

УФ-свет как модулятор функциональной активности лимфоцитов приводит к изменению метаболизма клеток. Для полного понимания изменений метаболических путей в УФ-облученных лимфоцитах необходимо изучить более подробно процесс гликолиза и пентозофосфатный путь (ПФП).

Гексокиназа – ключевой фермент гликолиза, катализирующий перенос фосфата с АТФ на субстрат. Оба пути превращения углеводов (гликолиз и пентозофосфатный путь) тесно связаны: глюкозо-6-фосфат, образующийся в первой реакции гликолиза гексокиназой, может затем вступать как в реакции окисления до пировиноградной кислоты в процессе гликолиза, так и подвергаться окислению глюкозо-6-фосфатдегидрогеназой (Г6ФДГ) в реакции пентозофосфатного пути.

### МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Объектом исследования явились лимфоцитарные клетки крови доноров и больных острым панкреатитом. УФ-облучение суспензии лимфоцитов (1 мл,  $1 \cdot 10^6$  клеток/мл) проводили в термостатируемой ( $20 \pm 1$  °С) кювете светом лампы типа ДРТ-400 через светофильтр УФС-1 (240-390 нм). Интенсивность излучения – 151 Дж/(м<sup>2</sup>·мин), доза облучения – 755 Дж/м<sup>2</sup>. Лимфоциты инкубировали в питательной среде RPMI-1640 в присутствии гентамицина в отсутствие и в присутствии аутологичной плазмы крови (18 %) при 37 °С ( $[\text{CO}_2] = 5\%$ ) в течение 24 часов. Для определения активности ферментов клетки лизировали путем гипотонического шока. Об активности Г6ФДГ судили по скорости восстановления НАДФ. Активность гексокиназы определяли энзиматическим методом, в качестве сопрягающего фермента добавляли Г6ФДГ и НАДФ. Исследуемые реакции тестировали по увеличению оптической плотности при 340 нм. Измерения проводили на спектрофотометре Shimadzu UV-2401 PC.

Статистическую обработку результатов исследований проводили с помощью пакета программ "Excel". Отличия в контрольных и опытных сериях экспериментов анализировали с помощью метода попарных сравнений, используя t-критерий Стьюдента. Отличия считали достоверными при уровне значимости  $p \leq 0,05$ . Полученные результаты представляли как среднее значение показателя  $\pm$  доверительный интервал.

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Показано, что в ходе суточной инкубации активность гексокиназы лимфоцитов здоровых до-

норов повышается, причем это повышение более выражено в УФ-облученных лимфоцитах (рис.1). Уровень активности гексокиназы в лимфоцитах здоровых доноров, инкубированных в течение 24 часов в питательной среде без плазмы крови, статистически значимо не отличается от контрольных величин.

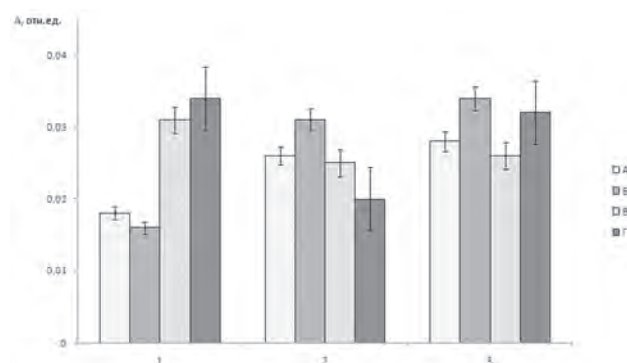


Рис. 1. Влияние УФ-света на активность (А, отн. ед.) гексокиназы лимфоцитов. Обозначения: 1 – лимфоциты без инкубации; 2 – клетки через 24 часа инкубации; 3 – инкубация в присутствии плазмы крови; А и В – необлученные, Б и Г – фотомодифицированные (755 Дж/м<sup>2</sup>) лимфоциты; первые два столбца (А и Б) в каждой группе – лимфоциты здоровых доноров, два последних (В и Г) – больных ОП

В ходе инкубации как нативных, так и УФ-облученных клеток активность ГК увеличивается, при этом, как было показано ранее, активность ЛДГ в УФ-облученных лимфоцитах также возрастает [4, 5], что свидетельствует об активации анаэробного гликолитического пути утилизации глюкозы в условиях окислительного стресса, вызванного воздействием УФ-света. Однако одновременно с этим наблюдается и повышение активности ферментов митохондрий (сукцинатдегидрогеназы и цитохром с оксидазы), что указывает на активацию также и аэробного дыхания в фотомодифицированных лимфоцитах. Выявленное нами повышение активности ГК указывает на активацию окисления глюкозы в инкубированных клетках, причем в большей степени в фотомодифицированных клетках после их инкубации.

Активность гексокиназы в лимфоцитах большинства больных ОП (у 21 из обследованных 26) значительно выше, чем у здоровых доноров; высокая активность данного фермента свидетельствует об усилении процесса гликолиза в активированных лимфоцитах большинства больных ОП. Непосредственно после воздействия УФ-света на

клетки больных ОП не происходит достоверных изменений активности данного фермента. Как у нативных, так и у фотомодифицированных клеток, инкубированных в течение суток, наблюдается снижение активности гексокиназы по отношению к интактным клеткам непосредственно после выделения.

Таким образом, выявляются разнонаправленные изменения активности гексокиназы (и, следовательно, интенсивности гликолиза) при инкубации лимфоцитов больных ОП и здоровых доноров.

В ходе суточной инкубации в питательной среде в присутствии плазмы крови активность гексокиназы у нативных клеток здоровых доноров увеличивается, причем в УФ-облученных лимфоцитах степень активации выше (см. рис.1). Активность гексокиназы в лимфоцитах больных ОП после инкубации с плазмой повышается до исходного уровня, но при этом в меньшей степени, чем у здоровых доноров.

Как следует из полученных результатов, в фотомодифицированных лимфоцитах интенсивнее протекает окисление глюкозы. В связи с этим важно установить, какие клеточные процессы используют продукты окисления глюкозы. Ранее нами было показано [4], что при этом активируется аэробный гликолиз. Роль Г6ФДГ, ключевого фермента пентозофосфатного пути, в клеточном метаболизме хорошо изучена. Однако сведения об участии Г6ФДГ в лимитировании свободнорадикальных процессов, усиливающихся при развитии патологических состояний, ограничены. Выявлено, что в лимфоцитах после воздействия УФ-света активируется синтез ряда белков (СОД, СДГ, ЦО, ИЛ-1 $\beta$  и некоторых мембранных рецепторов) [6, 7]. Так как функции Г6ФДГ связаны с обеспечением клеток рибозофосфатом, необходимым для синтеза нуклеиновых кислот, представлялось целесообразным исследовать активность Г6ФДГ после УФ-облучения лимфоцитов.

Показано, что воздействие УФ-света на лимфоциты не приводит к статистически значимому изменению активности Г6ФДГ непосредственно после облучения. После суточной инкубации нативных клеток достоверных изменений также не происходит, в то время как в УФ-облученных клетках после инкубации активность Г6ФДГ увеличивается (рис. 2).

Активность Г6ФДГ в нативных клетках больных ОП достоверно не отличается от исследуемого параметра у здоровых доноров.

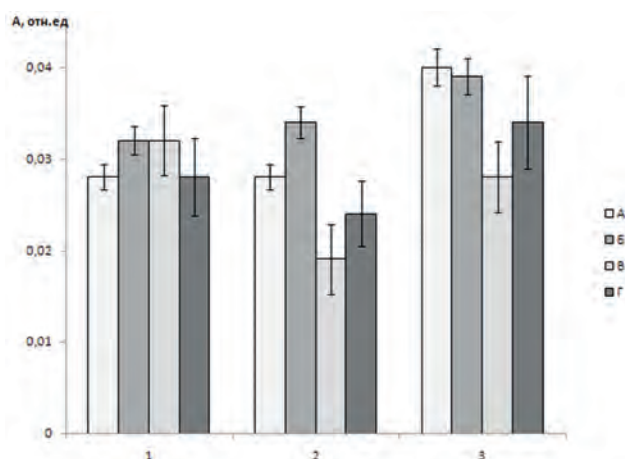


Рис. 2. Влияние УФ-света на активность (А, отн. ед.) Г6ФДГ лимфоцитов. Обозначения те же.

В ходе суточной инкубации нативных клеток больных ОП происходит снижение активности фермента на 40 % по отношению к интактным клеткам, в то время как при инкубации УФ-облученных клеток активность Г6ФДГ статистически достоверно не изменяется.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Динамика изменения активности как гексокиназы (и, следовательно, интенсивности гликолиза), так и Г6ФДГ, в ходе суточной инкубации в питательной среде без плазмы клеток здоровых доноров и больных ОП имеет разнонаправленный характер.

В лимфоцитах больных ОП при действии УФ-света и инкубации клеток в присутствии плазмы крови характер изменений исследуемых параметров однонаправленный, но у больных острым панкреатитом активность ферментов остается в пределах исходных значений, а у здоровых доноров повышается, что дает возможность для активации белкового синтеза и образования НАДФН, необходимого для поддержания нормальной работы глутатионового звена антиоксидантной системы.

Учитывая высокую информативность метаболических показателей для характеристики функционального состояния лимфоцитов, а также высокую чувствительность клеток иммунной системы к воздействию различных факторов, исследование метаболизма лимфоцитов позволяет выявить, наряду с характерными чертами внутриклеточного обмена веществ, особенности реагирования иммунной системы здоровых людей и больных с деструктивно-воспалительными заболеваниями в условиях

воздействия УФ-излучения на организм человека.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Трансфузиологические операции в клинической медицине / С.П. Бякин [и др.] — М.: Наука, 2006. — 286 с.

2. Оптимизация детоксикационной терапии в экстренной хирургии / А.П. Власов [и др.] // Пермский медицинский журнал. — 2015. — Т. 32. № 1. — С. 6-11.

3. Влияние инициации процессов перекисного окисления липидов на клинико-лабораторные показатели внутриклеточного метаболизма глюкозы у больных сахарным диабетом / А.Н. Дрыгин [и др.] // Медико-биологические и социально-психологические проблемы безопасности в чрезвычайных ситуациях. — 2010. — № 2. — С. 71-74.

4. Особенности метаболизма УФ-облученных лимфоцитов / В.Г. Артюхов [и др.] // Радиационная биология. Радиоэкология. — Т. 51, № 2. — М., 2011. — С. 252-257.

5. Oligomeric proteins: modulation of UV-sensitivity and regularities of photochemical transformations / V.G. Artyukhov [et all] / Радиационная биология. Радиоэкология. — 2001. — Т. 41. № 1. — С. 78-103.

6. Влияние УФ-света на синтез некоторых белков лимфоцитами / В.Г. Артюхов [и др.] // Иммунология. — М., 2011. — Т. 30, № 3. — С. 152-154.

7. Влияние УФ-света на субпопуляционный состав и экспрессию мембранных маркеров лимфоцитов крови человека / В.Г. Артюхов [и др.] // Радиационная биология. Радиоэкология. — Т. 56, № 1. — М., 2016. — С. 73-80.

*Воронежский Государственный Университет*

*Башарина О. В., кандидат биол. наук, доцент  
кафедры биофизики и биотехнологии*

*E-mail: bov-bio@yandex.ru*

*Тел.:(473)220-85-86*

*Voronezh State University*

*Basharina O. V., PhD (Biology), Associate Professor, department of Biophysics and Biotechnology*

*E-mail: bov-bio@yandex.ru*

*Ph.:(473)220-85-86*

*Артюхов В. Г., доктор биол. наук, профессор,*

*зав. кафедрой биофизики и биотехнологии*

*Artyukhov Valery G., PhD (Biology), Full professor, Head of the Biophysics and Biotechnology department,*

*Зеленецкая М. Г., студентка кафедры биофизики и биотехнологии*

*и биотехнологии*

*Zelenetskaya M. G., student of the Biophysics and Biotechnology department*

*Коробкина И. А., студентка кафедры биофизики и биотехнологии*

*и биотехнологии*

*Korobkina I. A., student of the Biophysics and Biotechnology department*

*Спахова Я. Г., студентка кафедры биофизики*

*и биотехнологии*

*Spakhova Y. G., student of the Biophysics and Biotechnology department*