

## КВАНТИТАТИВНО ОДРЕДУВАЊЕ НА АКТИВНОСТА НА ЕРИТРОЦИТНАТА ГЛУКОЗА-6-ФОСФАТ ДЕХИДРОГЕНАЗА КАЈ ДЕЦА СО ФЕРОДЕФИЦИТНА АНЕМИЈА

### QUANTITATIVE DETERMINATION OF RED BLOOD CELLS GLUCOSE-6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE ACTIVITY IN INFANTS WITH IRON DEFICIENCY ANEMIA

В. АНАСТАСОВСКА, Б. ГОШИЌ-МАРКОВСКА, О. МУРАТОВСКА

Метаболичката улога на ензимот глюкозо-6-фосфат дехидрогеназа-G6P-DH (EC.1.1.1.49) во еритроцитите примарно е поврзана со неговото редуктивен потенцијал, односно неговата способност да продуцира редуциран никотинамид аденин динуклеотид фосфат (NADPH). Оваа улога е многу значајна за еритроцитите, бидејќи како носачи на кислород, *par excellence*, имаат предиспозиција кон оштетување со кислородни радикали, одејќи во насока на формирање на метхемоглобин.

Намалувањето на активносста на ензимот доведува до хемолиза на еритроцитите. Од друга страна, литературниот податоци зборуваат за зголемена активност на G6P-DH во еритроцитите кај пациентите со разни хематолошки болести.

Целта на истражувањето е квантитативно одредување на активносста на еритроцитната G6P-DH кај нашата здрава популација и деца со феродефицитна анемија. Активносста на ензимот, изразена во  $mU/10^9Er$ , е одредувана во свеж хемолизат на еритроцитите според методата на Kornberg и соp. (1955), со китови од фирмата „Boehringer-Mannheim“.

Анализирани се вкупно 80 здрави испитаници (42 возрасни и 38 деца) и 113 деца со феродефицитна анемија, од кои 11 испитаници имаат недостиг на витаминот  $B_{12}$  и фолната киселина, пациентите на одделот за хематологија при Клиниката за детски болести, Скопје.

Кај двете групи здрави испитаници не констатиравме статистички значајни разлики во активносста на испитуваниот ензим во функција на полот и возрасста. Нема статистички значајна разлика во ензимската активност ниту помеѓу децата со феродефицитна анемија и здравите деца, од двата пола. Додека, кај децата кои, освен феродефицитна

анемија, имаат и придружен дефицит на витаминот  $B_{12}$  и фолната киселина, констатиравме мошне значајно зголемување на активносста на испитуваниот ензим во однос на контролната група - деца.

Квантитативната метода, според Kornberg и соp. (1955), за одредување на активносста на ензимот, за разлика од скрининг методите, покажа солидни аналитички карактеристики кои овозможуваат нејзино користење во редовната клиничка практика, како дијагностички параметар кај пациентите со хематолошки заболувања.

**Клучни зборови:** еритроцитна G6P-DH, феродефицитна анемија, квантитативна метода.

#### Summary

Metabolic function of enzyme glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6P-DH, EC. 1.1.1.49) in red blood cells is associated with the redox potential it possesses, having in mind that it is initial enzyme that catalyzes the reduction of nicotinic adenine dinucleotide phosphate (NADPH) as an electron donor in many biologic systems. This is an important reaction because NADPH is a source of reducing potential for the red blood cell to resist oxidative stress and inhibit subsequent formation of met hemoglobin production. Deficiency of this enzyme produces instability of the hemoglobin molecule and consequent hemolysis. Despite this fact, many studies have described the increased activity of the G6P-DH in red blood cells in patients with hematological disorders.

The aim of this study was to determine in quantitative terms, the activity of enzyme G6P-DH in red blood cells in human healthy subjects and in children with ferrodeficient anemia. Enzyme activity, expressed as  $mU/10^9Er$ , was determined in fresh blood hemolysates by the method of Kornberg et al. (1955), using "Boehringer-



Mannheim" diagnostic assay kits that measures the increased level of NADPH at 340 nm (HITACHI U-1100). Eighty healthy volunteers (adults and infants) and 113 infants with diagnostic iron deficiency anemia (with and without vitamin B<sub>12</sub> and folic acid deficiency) were used in this experiment. Volunteers were all patients of the Department of Hematology, Pediatric Clinic, Clinical Centre, Skopje.

The results obtained indicated no significant association between the values of the enzyme activity and gender and age. There was no significant difference of the enzyme activity between healthy infants and infants with iron deficiency anemia. On the contrary, in children with iron deficiency anemia associated with B<sub>12</sub> and folic acid deficiency, there was a significant enhancement in the enzyme activity in comparison to the controls.

Testing the reproducibility and sensitivity of the quantitative method for determination of enzyme activity, described by Kornberg et al. (1955), revealed more analytical characteristics than the scanning methods formerly used in laboratories. This method is recommended for frequent use in clinical practice as a diagnostic parameter in patients with hematological disorders.

**Key words:** red blood cells, G6P-DH, iron deficiency, quantitative method

Пентозо-фосфатниот циклус како единствен извор на редуциран никотинамид аденин динуклеотид фосфат (NADPH) во еритроцитите, има значајна улога во механизмот за нивна заштита од оксидирачки фактори. Глукозо-6-фосфат дехидрогеназата-G6P-DH (EC.1.1.1.49) ја катализира првата реакција од овој циклус, односно оксидацијата на глукозо-6-фосфатот во 6-фосфоглуколат (1,2).

Дефицитот на овој ензим во еритроцитите резултира со нивна намалена или целосна неспособност да генерираат NADPH (2). Како резултат на тоа, NADPH-зависниот ензим глутатион редуктаза во еритроцитите е неспособен да го претвори оксидираниот глутатион во редуциран (3), а со тоа недостасува супстрат неопходен за нормална активност на глутатион пероксидазата (4). Ова функционално губење на глутатион пероксидазата доведува до зголемената осетливост на G6P-DH дефицитните еритроцити на редокс активните системи кои генерираат H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Акумулацијата на H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> во еритроцитите резултира со нарушување на редукциониот потенцијал, при што нивната мембрана станува пермеабилна за оксиданси кои инфлукутираат во клетката, го денатурираат хемо-

глобинот кој преципитира давајќи Heinz-ови телца. Во исто време се инактивираат ензимите, се намалува концентрацијата на АТР, се нарушува функционирањето на јонската пумпа, предизвикувајќи дисбаланс во транспортот на јоните и зголемување во концентрацијата на Na<sup>+</sup> во еритроцитите, што предизвикува инфлукс на вода и нивна хемоллиза (5).

### Цели на истражувањето

Поттикнати од значајната улога на G6P-DH во заштитата на еритроцитите од оксидативен стрес и последиците од неговиот недостиг, цел на овој труд е да се одреди квантитативно неговата активност кај нашата здрава популација и деца со феродефицитна анемија, со и без дополнителен недостиг на витаминот B<sub>12</sub> и фолната киселина.

### Материјал и методи

Испитани се 42 возрасни индивидуи, на возраст од 30 до 50 години (кредарители од Републичкиот завод за трансфузиологија-Скопје) и 38 деца од двата пола, на возраст од 5 до 15 години (од кардиолошката амбуланта на Клиниката за детски болести-Скопје), со уредни биохемиски параметри како контролни групи.

Во испитувањето беа вклучени 113 пациенти со докажан дефицит на железо во циркулацијата и депоата, од одделот за хематологија при Клиниката за детски болести, од кои 11 испитаници имаат и придружен дефицит на витаминот B<sub>12</sub> и фолната киселина.

Активноста на ензимот, изразена во mU/10<sup>9</sup>Er, е одредувана според квантитативната метода на Kornberg и сор. (1955) со китови од фирмата „Boehringer-Mannheim“, во свеж хемолizat од еритроцити (6,7). Принципот на методата се темели врз реакцијата катализирана од G6P-DH, при што брзината на создавање на NADPH е мерка за нејзината активност. Промената на апсорбанцата на 340 nm бранова должина е читана на спектрофотометар HITACHI U-1100.

Во функција на биохемиската слика на испитаниците беа одредувани и следниве хематолошки параметри: број еритроцити (x10<sup>12</sup>/L), содржина на хемоглобин (g/L), хематокрит (%), MCV (fl)-среден волумен на еритроцити, MCH (pg)-средна содржина на хемоглобин, MCHC (g/L)-средна концентрација на хемоглобин во еритроцити и број тромбоцити (x10<sup>9</sup>/L). Хематолошките



параметри се одредувани на автоматски хематолошки анализатор за *in vitro* дијагностика: SYSMEK K-1000, LTD. КОБЕ, JAPAN.

Добиените резултати статистички се обработени со компјутерската програма SPSS, а статистичката значајност е одредувана според *Student*-овиот *t* тест. Резултатите се прикажани како средни вредности  $\pm$  SD.

### Резултати

Кај контролната група машки возрасни испитаници констатиравме активност на G6P-DH во еритроцитите од  $134,57 \pm 12,14$  mU/10<sup>9</sup>Er, додека кај женските таа изнесува  $140,06 \pm 6,29$  mU/10<sup>9</sup>Er. Разликата статистички не е сигнификантна (график 1).

Активноста на испитуваниот ензим добиена кај здравите машки деца изнесува  $137,18 \pm 18,14$  mU/10<sup>9</sup>Er, а кај здравите женски деца  $140,19 \pm 21,78$  mU/10<sup>9</sup>Er. Разликата, исто така, не е сигнификантна (график 1).

Во функција на возраста кај здравите испитаници, исто така, не е констатирана статистички сигнификантна разлика во активноста на испитуваниот ензим (график 1).

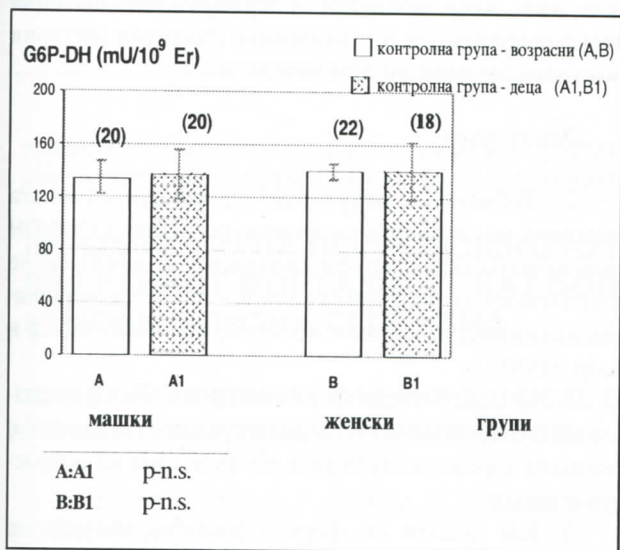


График 1. Активноста на еритроцитна G6P-DH (mU/10<sup>9</sup>Er) кај здрави индивидуи (возрасни и деца), од двајта пола.

Добиените вредности за хематолошките параметри кај контролните групи испитаници (возрасни и деца) од двата пола се во рамките на постојните литературни податоци за референтни хематолошки параметри (8,9).

Активноста на еритроцитната G6P-DH, констатирана кај машките деца со феродефицитна анемија ( $143,37 \pm 35,37$  mU/10<sup>9</sup>Er) е повисока за 4,5% во однос на контролната група, додека кај женските деца ( $145,31 \pm 28,45$  mU/10<sup>9</sup>Er) за 3,6%. Разликите не се статистички сигнификантни (график 2). Исто така, не е статистички сигнификантна и разликата од 1,3% во однос на половите кај испитаниците од оваа група.

Од друга страна, кај децата кои, покрај феродефицитна анемија, имаат и придружен дефицит на витаминот B<sub>12</sub> и фолната киселина, констатиравме мошне сигнификантно зголемување на активноста на ензимот, и тоа за 132,8% кај машките ( $319,36 \pm 60,95$  mU/10<sup>9</sup>Er) и за 106,1% кај женските деца ( $288,95 \pm 44,38$  mU/10<sup>9</sup>Er), во однос на контролната група деца од двата пола (график 2). Зголемената активност на ензимот од 10,5% во еритроцитите кај машките деца од оваа испитувана група, во однос на тие од женски пол, не е статистички значајна.

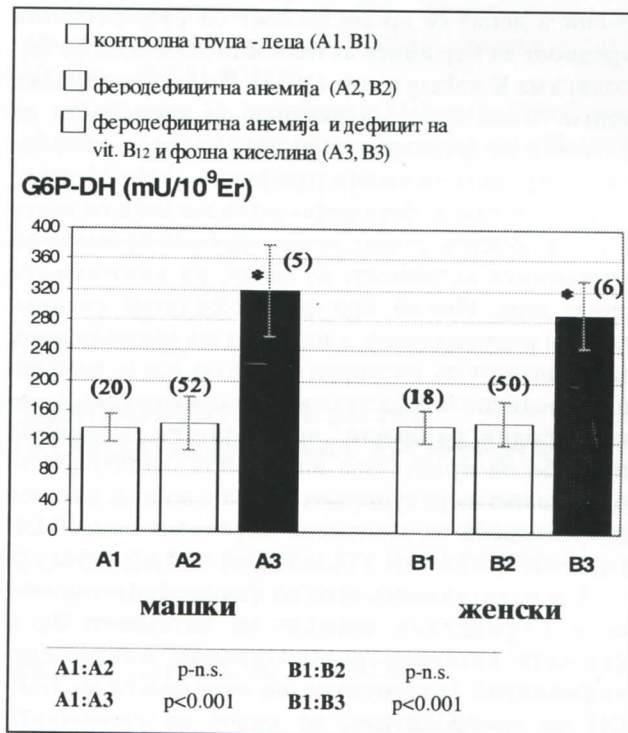


График 2. Активноста на еритроцитна G6P-DH (mU/10<sup>9</sup>Er) кај деца со феродефицитна анемија, со и без придружен недостиг на витаминот B<sub>12</sub> и фолната киселина, од двајта пола.

Резултатите од хематолошката анализа кај испитаниците со феродефицитна анемија, со и без придружен недостиг на витаминот B<sub>12</sub> и фолната киселина, се прикажани во табелата 1.



Хематолошки параметри (8±SD)	Деца со феродеф. анемија		Деца со феродеф.ан. и дефиц. на В <sub>12</sub> и фолат	
	машки	женски	машки	женски
Er (×10 <sup>12</sup> /л)	4,2±0,7	4,1±0,1	4,0±0,7	4,1±0,6
Hb (g/l)	83±16,7	87,3±21	68,9±8,4	73,9±19,4
MCV (fl)	64,4±18,1	72,3±10	53,2±6,5	57,6±10
MCH (pg)	20,2±4,3	21,5±4,7	15,1±3,1	18,2±4,4
MCHC (g/l)	320,6±6,7	297,4±5,1	282,7±3,9	315,1±4,3
Hematokrit (%)	26,4±5,4	29,3±4,9	21,2±3,8	23,3±3,9

**Табела 1.** Хематолошки параметри кај деца со феродефицитна анемија, со и без придружен недостаток на витаминот В<sub>12</sub> и фолната киселина, од двата пола.

### Дискусија

Добиените резултати за активноста на еритроцитната G6P-DH кај двете контролни групи (возрасни и деца) се во согласност со референтната вредност за нејзината активност посочена во методата на Kornberg и сор. (1955). Не констатиравме статистички значајна разлика во активноста на ензимот, во функција на полот и возраста кај нашата здрава популација (график 1).

Кај децата со феродефицитна анемија од двата пола не постои статистички значајна промена во ензимската активност, во однос на контролната група деца. Имено, при феродефицитна анемија, поради редуцираниот капацитет на еритроцитите за транспорт на кислород (10), а со тоа и намалена предиспозиција за нивно оштетување со кислородни радикали, не се јавува зголемена потреба од продукција на NADPH, неопходен за одржување на редуцирана средина во нив, а со тоа ниту потреба од зголемена активност на G6P-DH (график 2).

Кај испитуваните деца со феродефицитна анемија и придружен дефицит на витаминот В<sub>12</sub> и фолната киселина констатиравме мошне сигнификантно зголемување на активноста на G6P-DH во еритроцитите, во однос на ензимската активност кај контролната група деца (график 2). Овие испитаници се со докажан дефицит на железо во циркулацијата и депоата и констатиран придружен дефицит на витаминот В<sub>12</sub> и фолната киселина, проценет врз основа на анализата на морфологијата на еритроцитните прекурсори во коскената срцевина, каде јасно се гледа присуство на протоплазматично-јадрен асинхронизам во зрењето.

Дефицитот на витаминот В<sub>12</sub> ја инхибира синтезата на DNA индиректно преку нарушување на метаболизмот на фолатот (11). Како последица на недостигот на витаминот В<sub>12</sub> е нарушена синтезата на протопорфиринол поради што доаѓа до создавање на дефектни, помалку отпорни еритроцити. Животот на еритроцитите е скратен, што е причина за појава на симптоми на хиперхемолита, што пак, доведува до компензаторно зголемување на активноста на коскената срцевина или мобилизација на ретикулоцити од неа, кои поседуваат 10 пати поголема активност на гликолитичките ензими и на G6P-DH во однос на зрелите еритроцити (12). Со оглед на фактот дека кај пациентите со феродефицитна анемија не констатиравме статистички сигнификантна промена во активноста на еритроцитната G6P-DH, сметаме дека кај пациентите со феродефицитна анемија и придружен дефицит на витаминот В<sub>12</sub> и фолната киселина, нејзината зголемена активност се должи токму на придружниот дефицит на спомнатите витамини.

Отсуството на класични хематолошки параметри на една мегалобластна анемија, и покрај присутниот дефицит на витаминот В<sub>12</sub> и фолната киселина, кај оваа група испитаници е резултат на различниот степен на хипотрофија, констатирана кај нив, која секогаш е придружена со една плурикарентност на основните градивни материи кои учествуваат во хемопоезата (8).

### Заклучоци

1. Добиените резултати од квантитативната анализа на активноста на еритроцитната G6P-DH кај контролните групи (возрасни и деца) се во согласност со референтната вредност за нејзината активност посочена во методата на Kornberg и сор. (1955).

2. Не констатиравме статистички значајни разлики во активноста на испитуваниот ензим кај нашата здрава популација, во функција на возраста и полот.

3. Кај децата со феродефицитна анемија од двата пола нема значајна промена во активноста на G6P-DH во однос на контролните вредности.

4. Мошне сигнификантно зголемување на активноста на ензимот во еритроцитите е констатирано кај пациентите од двата пола кои, покрај феродефицитната анемија, имаат и придружен дефицит на витаминот В<sub>12</sub> и фолната киселина, во однос на контролната група. Значајна полова разлика во ензимската активност не е констатирана.



5. Квантитативна метода според Kornberg и сор. (1955) за одредување на активноста на G6P-DH во еритроцитите, за разлика од скрининг методите, покажа солидни аналитички карактеристики кои овозможуваат нејзино користење во редовната клиничка практика, како дијагностички параметар кај пациентите со хематолошки заболувања.

#### Литература

1. Luzzatto L. G6PD deficiency and hemolytic anemia, in Nathn DG and Oski GA. (ed) Hematology of infancy and childhood, W. B. SAUNDERS COMPANY, 4 th edition, 1993;1: 674-695.

2. Beutler E. G<sub>6</sub>PD deficiency. Blood, 1994;84(11):3613-3636.

3. Johnson MR, Ravindranath Y, El-Alfy M and Goyette JrG. Oxidant damage to erythrocyte membrane in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: Correlation with in vivo reduced glutathione concentration and membrane protein oxidation. Blood, 1994;83(4):1117-1123.

4. Johnson RM, Goyette JrG, Ravindranath Y and Ho Y-S. Red cell from glutathione peroxidase-1-deficient mice have nearly normal defenses against exogenous peroxides. Blood, 2000; 96(5): 1985-1988.

5. Jacobasch G, Rapoport SM. Hemolytic anemias due to erythrocyte enzyme deficiencies. Mol Aspects Med., 1996;17(2):143-170.

6. Kornberg A et al. Methods in enzymology I. Academic Press, New York. 1995;323.

7. Lohr GW and Waller HD (1974). Glucose-6-phosphatase Dehydrogenase, 1974; 636 in Bergmeyer H. U. ed. Methods of enzymatic analysis, 2<sup>nd</sup> English ed. (transl. from 3<sup>rd</sup> German ed.), Verlag Chemie Weinheim and Academic Press, Inc., New York and London. 4 vols.

8. Dacie JV and Levis SM. Practical Haematology, Churchill and Livingstone, 1991; 7<sup>th</sup> Ed.

9. Lubin BH. Reference values in infancy and childhood, in Nathn, D. G. and Oski, G. A., (ed): Hematology of infancy and childhood, W. B. SAUNDERS COMPANY, 1993;1:4 th ed.

11. Gaetani GF, Galiano S, Canepa L, Ferraris AM, Kirkman HN. Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes. Blood, 1989;73:334.

12. Стојчевски Т и сор. Хематологија. 5. Мегалобластни анемии, МЕДИС информатика. Скопје, 1995;91-104.

13. D amić M. Praktikum iz biohemije. Određivanje glukoza-6-fosfat dehidrogenaze. Naučna knjiga-Beograd, 1989;443-448.

КЛИНИКА ЗА НЕФРОЛОГИЈА - КЛИНИЧКИ ЦЕНТАР,  
ИНСТИТУТ ЗА КАРДИОВАСКУЛАРНИ ЗАБОЛУВАЊА - КЛИНИЧКИ ЦЕНТАР

## ВЛИЈАНИЕТО НА НЕФРОЛОШКОТО ПРЕДДИЈАЛИЗНО СЛЕДЕЊЕ ВРЗ РАНИОТ МОРТАЛИТЕТ КАЈ БОЛНИ КОИ ЗАПОЧНУВААТ ХРОНИЧНА ХЕМОДИЈАЛИЗНА ПРОГРАМА

### IMPACT OF PREDIALYSIS NEPHROLOGICAL CARE UPON EARLY MORTALITY IN PATIENTS INITIATING MAINTENANCE HEMODIALYSIS

О. СТОЈЧЕВА-ТАНЕВА, Ѓ. СЕЛИМ, Л. СТАМАТОВ, Б. ТАНЕВА, А. ШИКОЛЕ, Љ. СТОЈКОВСКИ,  
К. ЗАФИРОВСКА

*Морбидитетот и морталитетот кај болните со терминална хронична бубрежна слабост е многу висок во споредба со општата популација. Покрај другите фактори асоцирани со дијализата кои се причина за тоа, мора да се наведе и праењето и квалитетот на преддијализната нефролошка грижа на која досега не и беше дадена адекватна важност.*

*Оваа студија има за цел да го процени раниот морталитет, во првиот месец по вклучувањето на хронична хемодијализа, кај сите инцидентни болни примени на Клиниката за нефрологија во текот на 2001 година и да се процени неговата корелација со преддијализното нефролошко следење. Обработени се 189 болни кои беа вклучени на хронична хемодијализа во 2001 година, 93*