

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ ДОНЕЦКОЙ НАРОДНОЙ РЕСПУБЛИКИ
ГОСУДАРСТВЕННАЯ ОБРАЗОВАТЕЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ВЫСШЕГО
ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ «ДОНЕЦКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМ. М. ГОРЬКОГО»

На правах рукописи

МИРОНОВА КСЕНИЯ АЛЕКСАНДРОВНА

УДК 616.33-006-092:612.015.1

**ОСОБЕННОСТИ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ ОБМЕНА
ГЛЮКОЗЫ И АДЕНОЗИНА В КЛЕТКАХ КРОВИ
У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЛЕГКИХ, ЖЕЛУДКА И КИШЕЧНИКА**

14.03.03 – патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Донецк – 2022

Работа выполнена в Государственной образовательной организации высшего профессионального образования «Донецкий национальный медицинский университет имени М. Горького» (ГОО ВПО ДОННМУ ИМ. М. ГОРЬКОГО) Министерства Здравоохранения Донецкой Народной Республики

Научный кандидат медицинских наук, доцент **Бакурова Елена**
руководитель: **Михайловна**, ГОО ВПО ДОННМУ ИМ. М. ГОРЬКОГО, доцент
кафедры биологической химии

Официальные **Золотухин Сергей Евгеньевич**, доктор медицинских наук
оппоненты: (14.03.03), профессор, Республиканский травматологический
центр Министерства здравоохранения Донецкой Народной
Республики, г. Донецк, заведующий отделом координации
научных исследований и прогнозирования

Шатова Ольга Петровна, кандидат медицинских наук
(14.03.03), доцент, Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования
«Российский национальный исследовательский медицинский
университет имени Н. И. Пирогова» Министерства
здравоохранения Российской Федерации, г. Москва, доцент
кафедры биохимии и молекулярной биологии

Ведущая Республиканский онкологический центр имени профессора
организация: Г. В. Бондаря Министерства здравоохранения Донецкой
Народной Республики, г. Донецк

Защита состоится 08 апреля 2022 года в 12:00 на заседании
Диссертационного совета Д 01.022.05 при ГОО ВПО
ДОННМУ ИМ. М. ГОРЬКОГО по адресу: 283003, г. Донецк, пр-т Ильича, 16.
Тел.: (062) 344-41-51, факс: (062) 344-41-51, e-mail: spec-sovet-01-022-05@dnmu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГОО ВПО
ДОННМУ ИМ. М. ГОРЬКОГО по адресу: 283003, г. Донецк, пр. Ильича, 16.

Автореферат разослан февраля 2022 года

Ученый секретарь
Диссертационного совета Д 01.022.05
д. мед. н., доцент

Ю. И. Стрельченко

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Рак легких (РЛ), рак желудка (РЖ) и рак кишечника (РК) занимают лидирующие позиции в структуре онкологической заболеваемости, как на Донбассе, так и в мире (Седаков И.Е., 2018; Christakoudi S., 2020). Формированию индивидуальных агрессивных свойств опухоли способствуют дисфункция лимфоцитов, инфильтрирующих ее строму, и внутриопухолевая гипоксия (Бережная Н.М., 2018; Ніконов В.В., 2019). Нарушения внутренних гомеостатических механизмов в эритроцитах могут приводить к развитию анемии (Kuhn V., et al, 2017), отягощающей течение основного заболевания. По некоторым данным анемия, ассоциированная с хроническими заболеваниями, присутствует у 40% больных с солидными новообразованиями (Князькова И.И., 2016; Madeddu C., 2018; Bohlius J., 2019; Massacesi L., 2020).

Нарушения функций клеток крови сопряжены с изменениями их метаболизма (Kosenko E.A., 2017; Kuhn V., et al, 2017). Следовательно, актуальным является поиск биохимических критериев, опосредующих дисфункцию клеток крови при раке. В клетках крови метаболизм глюкозы непосредственно сопряжен с энергообменом и активностью антиоксидантной системы. Вероятно, что чувствительными показателями нарушений метаболизма могут стать изменения активности ферментов ключевых путей потребления глюкозы – лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ).

В регуляции процессов жизнедеятельности клетки чрезвычайно важен обмен аденозина. Его иммуносупрессорный эффект в лимфоцитах – один из широко исследуемых. Уникальны эффекты аденозина по регуляции газотранспортной функции эритроцитов (Gladwin T. M., 2011; Zhang Y., Xia Y., 2012). Установлено, что активность аденозиндезаминазы (АДА), контролирующей клеточные уровни аденозина, сопряжена с формированием патологических форм эритроцитов (Zhang Y., Xia Y., 2012).

Кроме анемии, следствием системного влияния злокачественного опухолевого процесса на организм является кахексия (Doly, 2020; Kasprzak A. 2021; Maccio A., 2021), лактоацидоз (Hu X., 2017; Prado-Garcia, 2020; Hamada T., 2020) и повышенная вязкость крови (van Dorst D.Ch., 2021; Kucukal E., 2020). Патогенез таких синдромов тесно связан с эндогенной интоксикацией (Горошинская И.А., 2018; Гильмутдинова И.Р., 2020; Бурлака Ю.Б., 2016). Активация протеолиза при канцерогенезе способствует увеличению уровня молекул низкой и средней массы (ВНиСММ) (Горошинская И.А., 2018). Возможно, что универсальным фактором патогенеза синдромов анемии и иммуносупрессии может быть дисфункция мембран форменных элементов крови вследствие увеличения числа транспортируемых катаболитов. При этом возрастает нагрузка на системы трансмембранного активного транспорта. Следовательно, активная работа ионных насосов может обеспечиваться достаточными уровнями АТФ, значит пути обмена глюкозы и аденилата могут активироваться и представлять интерес для исследователей.

Таким образом, кооперативное изучение показателей метаболизма клеток крови и функциональных показателей их мембран позволит расширить представление о патогенетических механизмах дисфункции этих клеток при раке различной локализации.

Степень разработанности темы. В научной литературе хорошо освещены исследования, посвященные прогностической ценности ферментов углеводного и нуклеотидного обменов в сыворотке крови при различной патологии. Меньшее число публикаций посвящены изучению метаболических путей обмена углеводов и нуклеотидов в клетках крови. Хорошо известно, что пути потребления глюкозы суть важны для всех клеток организма. Имеются публикации об аденозине как о сигнальной молекуле, обладающей множеством регуляторных эффектов, помимо его ключевой роли в развитии синдрома ТКИД (Борзенко Б.Г., Contreras-Aguilar MD, TvariJonaviciute A, Monkeviciene I, Figueiredo A.V. и др.). В тоже время роль аденозина в функционировании эритроцитов освещена в единичных работах (Gladwin T. M., Zhang Y., Xia Y.), значит, дальнейшие исследования особенностей его обмена в клетках крови актуальны. Клеточная дисфункция сопряжена с эндогенной интоксикацией у онкобольных. Нами впервые при раке различных локализаций предпринята попытка комплексного изучения показателей обмена глюкозы и аденозина в эритроцитах и лимфоцитах вместе с показателями эндогенной интоксикации (ВНиСММ) и жизнеспособности клеток крови. Это расширит представления о патогенетических механизмах клеточной дисфункции у онкобольных, будет способствовать разработке оптимальных подходов к ее коррекции.

Связь работы с научными программами, планами, темами. Работа выполнена в соответствии с основным планом НИР ГОО ВПО Донецкого национального медицинского университета им. М. Горького, и является фрагментом НИР кафедры биологической химии «Метаболизм экзогенных и эндогенных предшественников ДНК, особенности их распределения в тканях и клетках крови в патогенезе разных типов пролиферации» (№ государственной регистрации 0108U001351, шифр работы УН 08.01.05). Тема и научный руководитель диссертации утверждены на заседании Ученого совета ГОО ВПО ДонНМУ им. М. Горького от 28.02.2017 года, протокол № 1.

Цель и задачи исследования. Целью работы было изучение особенностей активности ферментов обмена глюкозы (ЛДГ и Г6ФДГ) и аденозина (АДА) в эритроцитах, лимфоцитах и показателей состояния их клеточной мембраны в патогенезе рака легких, желудка и кишечника. Выявить универсальные биохимические показатели, определяющие декомпенсацию процессов обмена клеток крови, сопряженные с их дисфункцией и снижением жизнеспособности.

Для достижения этой цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Исследовать показатели дезорганизации мембран при патологии, определяя наличие перегрузки гликокаликса по уровню ВНиСММ, сорбционную способность мембраны эритроцитов и их осмотическую резистентность.
2. Исследовать жизнеспособность лимфоцитов, изучив особенности проницаемости их мембран для витального красителя в динамике.

3. Изучить активность ферментов путей потребления глюкозы – ЛДГ, Г6ФДГ и аденозина – АДА в эритроцитах и лимфоцитах при раке легких, желудка и кишечника.
4. Исследовать особенности обмена глюкозы и аденозина в плазме и в клетках крови в зависимости от клинической стадии опухолевого процесса.
5. Сопоставив метаболические изменения в клетках крови при патологии и показатели стабильности их мембран, выявить возможные критерии прогноза развития анемии и оценки жизнеспособности иммунных клеток у онкобольных.
6. Определить универсальные, значимые факторы патогенеза синдромов анемии и иммунной дисфункции, развивающихся при раке.

Объект исследования: метаболические процессы в клетках крови и их связь с жизнеспособностью клеток при раке различных локализаций.

Предмет исследования: особенности обмена глюкозы и аденозина в эритроцитах и лимфоцитах крови, взаимосвязь с показателями их мембранной стабильности при раке легких, желудка и кишечника.

Научная новизна исследования. Впервые установлена связь нарушений ферментативных показателей обмена глюкозы и аденозина эритроцитов и лимфоцитов с уменьшением периода их активной циркуляции в системном кровотоке. Как в лимфоцитах, так и в эритроцитах крови выявлена отрицательная обратная связь изменений активности АДА с показателями дезорганизации мембран и снижением их жизнеспособности, также установлена ее корреляция со стадиями рака у больных со злокачественной патологией различной локализации. Предложено считать АДА универсальным ферментативным показателем низкой жизнеспособности и дисфункции клеток крови. Установлено, что при нарушении гомеостаза ВНиСММ, циркулирующих в крови, в её клетках меняется интенсивность процессов потребления глюкозы и повышается клеточный уровень сигнальной молекулы аденозина. Это общие дисметаболические факторы патогенеза, как анемии, так и иммуносупрессии. Выявлены биохимические показатели декомпенсации обменных процессов (сочетанное резкое снижение активности АДА и Г6ФДГ), связанные с гибелью клетки, развитием анемии.

Теоретическая и практическая значимость полученных результатов. В диссертации представлены теоретическое обоснование и практическое решение актуальной научной проблемы – при раке различных локализаций выявлены универсальные биохимические показатели, определяющие декомпенсацию процессов метаболизма клеток крови, сопряженных с их дисфункцией и снижением жизнеспособности. Полученные результаты расширяют представления об иммунной дисфункции и патогенезе анемии, ассоциированных с раком. Они внедрены в учебный процесс кафедр патологической физиологии, биологической химии, патологической анатомии и используются в образовательной деятельности. На их основании разработан индивидуальный способ прогнозирования развития анемии при раке. Практическое значение также имеет усовершенствованный метод определения удельного веса нежизнеспособных лимфоцитов при окраске их витальным

красителем. Он может применяться в клинике для мониторинга цитотоксичности при проведении химио- и лучевой терапии. Определили, что известные токсические эффекты аденозина в развитии лимфоцитарной дисфункции, характерны и для дисфункции эритроцитов. Это может помочь обосновать новые терапевтические мишени в лечении анемии.

Методология и методы исследования. Методы исследования: биохимический (определение активностей ферментов – ЛДГ, ГбФДГ, АДА, концентрации метаболитов – аденозина, уровней ВНиСММ), патофизиологический (определение осмотической резистентности эритроцитов, ССЭ), инструментальный (показатели гемоглобина, окрашивание лимфоцитов), статистический. Методология включала в себя классический патофизиологический эксперимент, анализ и синтез полученных данных, индуктивные (на основании частных фактов к формулировке общих закономерностей) и дедуктивные (на основании общих закономерностей выведение частных предположений) логические операции.

Положения, выносимые на защиту:

1. Для рака изученных локализаций характерно нарастание циркулирующих катаболитов, при этом их спектры в плазме крови и на поверхности эритроцитов отличаются. Это сопровождается нарастанием показателей мембранной дисфункции и низкой жизнеспособности эритроцитов.
2. Повышение содержания окрашенных витальным красителем лимфоцитов свидетельствует об увеличении удельного веса нежизнеспособных клеток. Следовательно, при раке повышение концентраций ВНиСММ способствует перегрузке гликокаликса и дестабилизации мембран, как эритроцитов, так и лимфоцитов крови.
3. При раке различных локализаций для клеток крови характерно повышение потребления глюкозы, что проявляется активацией ЛДГ и изменением активности ГбФДГ. Снижение в них активности АДА сопровождается нарастанием клеточных концентраций аденозина и его токсических эффектов. Выявленные дисметаболические процессы, развивающиеся в ответ на перегрузку гликокаликса циркулирующими ВНиСММ в эритроцитах, подобны нарушениям обмена в лимфоцитах.
4. Снижение интенсивности катаболизма аденозина коррелирует с клинической стадией заболевания и показателями, характеризующими снижение периода циркуляции клеток в системном кровотоке. Как в эритроцитах крови, так и в лимфоцитах выявлены отрицательные корреляционные связи между активностью АДА и ССЭ; с содержанием нежизнеспособных лимфоцитов при РЛ, так и при РЖ, РК. Это указывает на АДА, как на ферментативный показатель низкой жизнеспособности и дисфункции клеток крови.
5. В условиях эндогенной раковой интоксикации выраженное угнетение в клетках крови активности мембранносвязанных ферментов (АДА и ГбФДГ) на фоне снижения эффективности гликолиза способствуют развитию клеточной дисфункции. Данные нарушения указывают на утрату

адаптивного характера изменений обмена. В эритроцитах ведут к снижению уровней гемоглобина и развитию анемии.

6. Аналогичные метаболические нарушения в лимфоцитах также коррелировали с нарастанием их нежизнеспособных клеток. Это позволило определить универсальные биохимические показатели, определяющие декомпенсацию процессов обмена клеток крови, сопряженных с их дисфункцией и снижением жизнеспособности.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность полученных результатов основывается на том, что все исследования выполнены на метрологически поверенном оборудовании. Проведена экспертиза и составлен акт проверки первичной документации. Математический анализ проводился с помощью лицензионной программы MedStat v. 5.2 (Copyright © 2003-2019) и «STATISTICA 6.0» (StatSoft, USA). Выбор статистических методов анализа проводили с учетом характера распределения первичных данных. Материалы диссертации заслушаны, обговорены и рекомендованы к представлению в Диссертационный совет Д 01.022.05 на апробационном семинаре по патологической физиологии ГОУ ВПО ДОННМУ ИМ. М. ГОРЬКОГО, протокол № 4 от 08 октября 2021 г.

Основные результаты диссертации были представлены на XVI конференции «Актуальные проблемы патофизиологии» (Санкт-Петербург, 2010); 45-м съезде польского биохимического общества (Польша, Висла, 2010); 6-м конгрессе патофизиологов Украины (Крым, 2012); 7-й Львовско-Люблинской конференции экспериментальной и клинической биохимии (Львов, Украина, 2013); 17-м ЕССО европейском конгрессе по проблемам изучения рака (Нидерланды, 2013); I и II международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Химические проблемы современности» (Донецк, 2015, 2016, 2019); XVII международной научно-практической конференции «Современные концепции научных исследований» (Москва, 2015); II Петербургском онкологическом форуме «Белые ночи – 2016» (Санкт-Петербург, 2016); XX международной медико-биологической конференции молодых исследователей (Санкт-Петербург, 2017); IV межрегиональной научно-практической конференции «Диагностика и лечение анемий в XXI веке» (Рязань, 2017), III всероссийской конференции «Успехи молекулярной онкологии» (Москва, 2017); всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Современные достижения химико-биологических наук в профилактической и клинической медицине», XXVI всероссийской конференции молодых ученых с международным участием (Санкт-Петербург, 2020); международной научно-практической конференции: «Наука и инновации в XXI веке: актуальные вопросы, открытия и достижения» (РФ, Таганрог, 2020); IV и V международном медицинском форуме Донбасса «Наука побеждает... Болезнь» (Донецк, 2020, 2021). Работа была представлена на конкурсе работ молодых ученых, аспирантов и студентов «Литвиненковские чтения – 2018» 23 января 2018 г. (диплом 3-й степени).

Личный вклад диссертанта. Представленные в диссертационной работе экспериментальные данные получены лично автором либо при его

непосредственном участии на всех этапах исследований, включая планирование и проведение экспериментов, обработку, оформление и публикацию результатов.

Публикации. По материалам диссертации опубликована 21 научная работа, в том числе: статья в журнале *Scopus*, пять статей – в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК (из них три – без соавторов), четыре статьи – в научных журналах и сборниках (из них одна – без соавторов) и девять тезисов – в материалах конгрессов, форумов и конференций, получен патент на полезную модель и рационализаторское предложение.

Структура и объем работы. Диссертационная работа изложена на русском языке на 183 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, шести разделов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка использованной литературы. Работа иллюстрирована 30 рисунками и 27 таблицами. Список использованной литературы содержит 262 научных источника (из них 171 – латиницей).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы. Исследование изучаемых показателей проводили в эритроцитах, лимфоцитах и плазме крови у 111 больных раком легких (РЛ, $n=45$), раком желудка (РЖ, $n=33$) и кишечника (РК, $n=33$) в возрасте от 45 до 74 лет (средний возраст $60,5 \pm 8,3$). Параллельно проводили исследования в венозной крови, непосредственно оттекавшей от пораженного органа.

Все больные были обследованы в РОЦ им. Г.В. Бондаря. Пациенты были проинформированы и дали согласие на использование крови в исследовательских целях. По данным гистологического исследования среди случаев РЖ и РК преобладали аденокарциномы (95%), у больных с РЛ – плоскоклеточный рак (80%). По Т-критерию (размер первичного опухолевого узла): 38% больных РЛ с Т1-2, 62% с Т3-4; 39% больных РЖ с Т1-2, 61% с Т3-4; 33% больных РК с Т1-2, 67% с Т3-4.

Группу контроля составила кровь 52 условно здоровых человек, не имевших заболеваний легких или органов ЖКТ воспалительного или пролиферативного характера (16 женщин и 36 мужчин). Как правило, это были лица, проходившие плановое грыжесечение и пластику на базе отделений хирургического профиля ДОКТМО им. М. И. Калинина.

Выделение клеток из крови доноров проводили методом седиментации в градиенте плотности фиколл-урографина (VoymA., 1968).

Определение активности ферментов осуществляли спектрофотометрическим методом. Активность ЛДГ определяли по скорости окисления НАДН при длине волны 340 нм (Ещенко Н.Д., 1982). Активность Г6ФДГ – по скорости восстановления НАДФН₂ при длине волны 366 нм (Путилина Ф.Е., Соидзе С.Д., 1982). Определение АДА основано на регистрации интенсивности дезаминирования аденозина (Н. Fritz, 1978). Молярная концентрация аденозина определялась путем регистрации

оптической плотности в супернатанте эритроцитов и плазме после осаждения белков трихлоруксусной кислотой при длине волны 260 нм (Малахова М.Я., 1995 в нашей модификации). Уровень ВНиСММ определяли путем регистрации их в супернатанте в ультрафиолетовом диапазоне (238-310 нм) (М.Я. Малахова, 1995). ОРЭ определяли по методу Лимбека (1957). ССЭ – путем регистрации оптической плотности до и после инкубации эритроцитов с 0,025% метиленовым синим («Chemapol», Чехия) (Тогайбаев А.А., Кургузкин А.В., Рикун И.В., Карибжанова Р.М. Лабораторное дело, 1988). Состояние плазматической мембраны или жизнеспособность лимфоцитов исследовали путем окрашивания 0,5 % раствором трипанового синего и дальнейшим подсчетом окрашенных клеток под световым микроскопом в камере Горяева (Talwar G., 1983). Нами предложено внедрение в практику дополнительного времени инкубации лимфоцитов с витальным красителем – 30 мин с последующим подсчетом окрашенных клеток.

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с использованием непараметрических критериев программного пакета MedStat v. 5.2 и «STATISTICA 6.0» (StatSoft, USA).

Результаты исследования и их обсуждение. Выявлено повышение уровня ВНиСММ как в эритроцитах, так и в плазме крови при раке различных локализаций. В эритроцитах при РЛ на 156% ($p=0,002$), РЖ на 167% ($p<0,001$) и РК на 159% ($p<0,001$), по сравнению с контролем. В плазме крови при РЛ на 140% ($p<0,001$), РЖ на 195% ($p<0,001$), РК на 182% ($p<0,001$). Это свидетельствует о накоплении в организме среднемолекулярных соединений, способных перегружать гликокаликс клеток крови, сорбируясь на поверхности их мембран. Известно, что повышение ВНиСММ характерно для синдрома эндогенной интоксикации, развивающегося при ряде заболеваний, т.ч. при раке.

Для спектрограмм плазмы крови пациентов характерно как нарастание абсолютных значений пиков поглощения, так и увеличение качественного состава за счет катаболического пула низкомолекулярных веществ (значение экстинкций в диапазоне от 238 до 258 нм) (см. рис.1). Спектры метаболитов эритроцитов отличались от плазмы, повышаясь в узком диапазоне (255 – 260 нм), но более значительно (в среднем в 1,6 – 2,3 раза) (см. рис. 2, РК (э)).

В эритроцитах венозной крови, оттекающей от органа, абсолютные величины концентраций метаболитов были максимальными. Однако для них было характерно резкое смещение влево пиков спектрограмм до 240 нм, что, вероятно, указывает на транспорт эритроцитами оттекающей от органа крови тканевых катаболитов.

Нарушения гомеостаза ВНиСММ, циркулирующих в системном кровотоке, регистрировали как при РК, так и при РЖ, РЛ. Одновременно для эритроцитов периферического кровотока (рис. 2, РК (э)) регистрировали более выраженное нарастание уровней катаболитов преимущественно пуриновой группы.

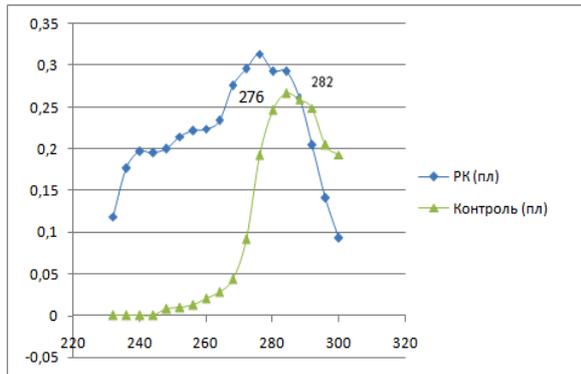


Рисунок 1 – Спектры ВНиСММ плазмы оттекающей от опухоли крови в ультрафиолетовом диапазоне (238-310 нм). Рак восходящей ободочной кишки (Т3N3M0).

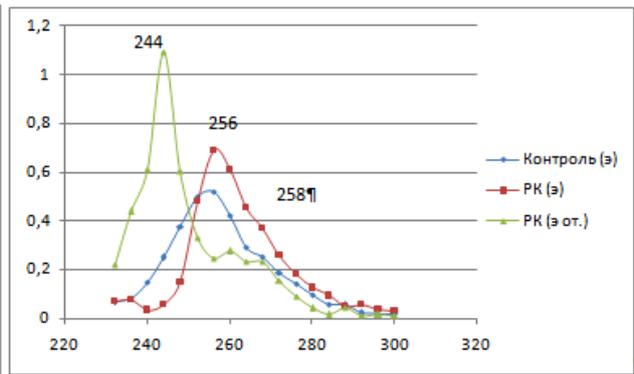


Рисунок 2 – Спектры ВНиСММ эритроцитов оттекающей от опухоли крови в ультрафиолетовом диапазоне (238-310 нм). Рак восходящей ободочной кишки (Т3N3M0).

Возможно, источниками этих соединений могли быть сами эритроциты, учитывая различия пиков с эритроцитами крови, оттекающей от органа. Наиболее вероятно, что вещества пуриновой группы эритроцитов периферической крови могли быть представлены продуктами деградации аденилата. Для уточнения данной гипотезы исследовали концентрации аденозина – его ключевого катаболита. Установлено достоверное увеличение уровней аденозина в плазме крови. При РЛ на 13%, РЖ и РК на 11% ($p < 0,05$ во всех случаях). В эритроцитах крови пациентов уровень аденозина также был выше контрольных значений: при РЛ на 12 %, РЖ и РК на 11 % ($p < 0,05$). В каждом индивидуальном случае при попарном сопоставлении в группе контроля концентраций аденозина в плазме и в эритроцитах крови между ними выявлена прямая сильная связь ($r = 0,708$, $p = 0,050$). Это свидетельствовало о прямо пропорциональном (равномерном) распределении аденозина между плазмой и гликокаликсом. Однако при раке такой корреляции не выявлено ($r = 0$, $p = 0,156$). Следовательно, у пациентов нарастание уровней аденозина сопровождалось нарушением его распределения между плазмой и эритроцитами, что может быть связано с изменениями трансмембранного транспорта.

Исследуя продукцию аденозина самой опухолью, определяли его уровни в плазме крови, непосредственно оттекавшей от пораженного органа. Достоверных отличий с уровнями нуклеозида в системном кровотоке не выявлено (соответственно $0,071 \pm 0,004$ моль/л и $0,069 \pm 0,003$ моль/л; $W=80,0$, $p > 0,05$). При этом в эритроцитах венозной крови, оттекающей от опухоли, концентрация аденозина составила $0,094 \pm 0,010$ моль/л, что также не отличалось достоверно от значений для эритроцитов периферической крови у тех же пациентов, но было выше, чем в плазме. Следовательно, основным источником сорбируемого эритроцитами аденозина могла быть не опухоль, а вероятнее сами клетки крови. Известно, что нарастание уровня аденозина взаимосвязано с образованием патологических форм эритроцитов с низкой жизнеспособностью (Zhang Y., et al., 2012), в свою очередь, ее показателями являются ОРЭ и ССЭ.

Исследуя показатели ОРЭ при РЛ, РЖ и РК, выявили изменения \min ОРЭ для пациентов с РЖ и РК. В частности, у больных РЖ \min ОРЭ увеличивалась на 18% ($p = 0,011$) и у больных РК на 24% ($p = 0,031$) по сравнению с контролем. Однако при РЛ изменения ОРЭ отсутствовали.

При изучении ССЭ использовали 0,025% раствор витального красителя метиленового синего. Удельный вес нежизнеспособных эритроцитов, выраженный в ССЭ, при раке исследуемых локализаций достоверно увеличивался в сравнении с группой контроля. При РЛ на 29%, при РЖ – на 63%, РК – на 24% ($p=0,001$) (рис.3).

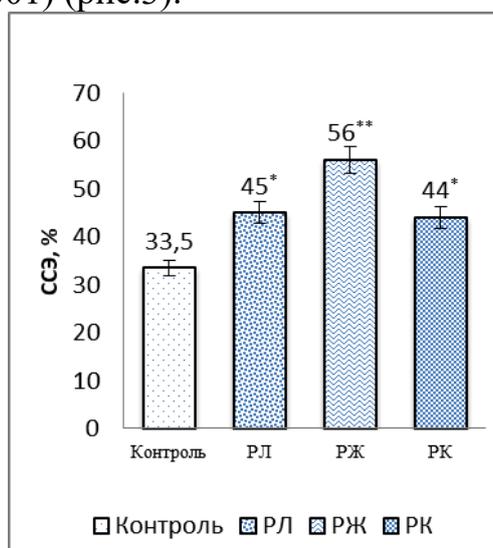


Рисунок 3 – Удельный вес нежизнеспособных эритроцитов, выраженный в ССЭ при РЛ, РЖ и РК, * $p < 0,05$ относительно группы контроля, ** $p < 0,001$ относительно группы РЛ и РК.

Насколько выявленные изменения специфичны для эритроцитов, проследили, исследуя подобные нарушения в лимфоцитах одних и тех же образцов крови.

Результаты эксперимента по исследованию особенностей проницаемости мембран лимфоцитов больных РЖ, РК, РЛ для витального красителя (трипанового синего) (рис. 4) показали достоверное увеличение в начальный момент времени уровней нежизнеспособных клеток лишь при РК и РЖ. При РК в 2,9 раза (составляло $10,0\% \pm 4,4\%$); при РЖ в 1,7 раз ($7,3\% \pm 1,2\%$) по сравнению с контролем ($3,9\% \pm 1,0\%$) ($p < 0,05$). При РЛ достоверных отличий не выявлено ($5,1\% \pm 0,6\%$; $p > 0,05$). При предложенном нами динамическом наблюдении проводили повторный подсчет окрашенных клеток в этой же системе спустя 30 минут инкубации. Наблюдали достоверное повышение числа нежизнеспособных клеток по сравнению с их окрашиванием в начальный момент времени: при РЖ – на 74 %, при РК – на 20 %, при РЛ – на 38 % (в каждом случае $p < 0,001$), (в контроле на 29 %). Наша модификация повышает чувствительность метода, позволяет верифицировать субпопуляции клеток с дисфункцией гликокаликса.

Изменение проницаемости мембран было изучено также в лимфоцитах оттекающей от опухоли крови на примере РК. В начальный момент времени

процентное содержание нежизнеспособных лимфоцитов периферической и оттекающей от опухоли крови достоверно не отличалось. Спустя 30 мин инкубации клеток с красителем, по сравнению с результатами окрашивания в начальный момент времени, процент нежизнеспособных клеток достоверно увеличился в 3 и 34 раза соответственно ($p < 0,001$) (рис. 5). Что указывает на более выраженное токсическое влияние опухоли на клетки системы иммунитета в региональном кровотоке.

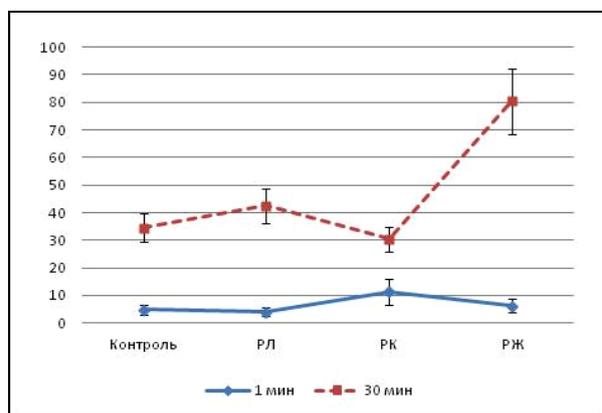


Рисунок 4 – Динамика изменения удельного веса нежизнеспособных лимфоцитов в норме и при раке.

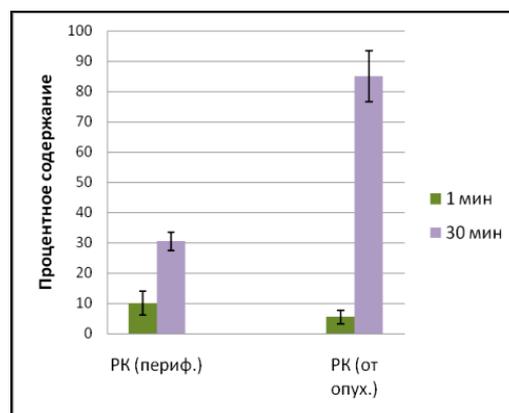


Рисунок 5 – Изменение проницаемости мембран лимфоцитов периферической и оттекающей от опухоли крови, окрашенных трипановым синим.

Таким образом, было установлено, что при раке различных локализаций повышение концентраций ВНиСММ способствует перегрузке гликокаликса и дестабилизации мембран как эритроцитов, так и лимфоцитов крови. Это сопровождается нарастанием удельного веса их нежизнеспособных клеток. Возможно, ведет к напряженности эритро- и лимфопоэза.

Для исследования особенностей метаболизма, сопровождающих выявленные нарушения, определяли активность ферментов обмена глюкозы (ЛДГ и Г6ФДГ) и аденозина (АДА) как в эритроцитах, так и лимфоцитах крови.

Установлено, что активность ЛДГ в эритроцитах значительно повышалась - при РЛ в 3,6 раза ($p < 0,001$), при РЖ и РК – в 3,7 раза ($p < 0,001$). В лимфоцитах она также увеличивалась, но менее интенсивно - в 1,4 раза при РЛ ($p = 0,008$); в 2,5 раза при РЖ ($p = 0,003$), но не отличалась достоверно от значений активности в контроле при РК ($p = 0,877$). В эритроцитах крови активность Г6ФДГ достоверно не отличалась от контроля. В лимфоцитах выявлено незначительное повышение активности по сравнению с контролем лишь при РЛ ($p = 0,046$) и при РК ($p = 0,034$).

В эритроцитах при РЛ, РЖ и РК активность АДА снижалась в 1,4 раза, 2 раза и 1,6 раза соответственно (для всех локализаций $p < 0,001$). Для лимфоцитов было характерным более резкое снижение активности фермента.

При РЛ – в 2,6 раза, при РЖ в 3,6 раза и при РК – в 6,9 раз (в каждом случае $p < 0,001$).

Нами установлена обратная зависимость между активностью АДА и процентным содержанием нежизнеспособных лимфоцитов во всех группах. Коэффициент корреляции активности АДА и нежизнеспособностью лимфоцитов в при РЛ $r = -0,806$ ($p = 0,009$), при РЖ $r = -0,814$ ($p = 0,008$) и при РК $r = -0,725$ ($p = 0,027$). Снижение активности мембранносвязанной АДА ведет к накоплению избыточного, токсичного аденозина и может способствовать его проапоптозному эффекту и нарушению иммунного ответа.

Также выявлена отрицательная обратная связь активности АДА эритроцитов и нарастанием уровней нежизнеспособных красных клеток крови (оценивались по ССЭ): между активностью АДА и ССЭ при РЖ ($r = -0,636$, $p = 0,01$), при РК ($r = -0,522$, $p = 0,03$), при РЛ ($r = -0,622$, $p = 0,01$).

Выявлено, что при раке различной локализации отмеченные изменения активности ферментов клеток крови однотипны. Отклонения показателей активности ферментов в лимфоцитах подобны таковым в эритроцитах, однако каждая клетка обладает своими особенностями.

Для более корректного анализа взаимосвязи изменений метаболизма клеток крови с опухолевым процессом изучили особенности ферментативной активности в клетках и плазме крови в зависимости от стадии процесса.

На всех стадиях изменения активности ферментов в клетках крови достоверно отличались от контроля (рис. 6). Однако корреляция со стадией заболевания установлена лишь для АДА эритроцитов и лимфоцитов. Ее характеризует отрицательная обратная связь как для эритроцитов ($r = -0,610$ ($p < 0,01$); $r = -0,451$ ($p = 0,05$); $r = -0,623$ ($p < 0,01$)), так и для лимфоцитов ($r = -0,612$, $p < 0,01$).

На всех стадиях изменения активности ферментов в клетках крови достоверно отличались от контроля. Однако корреляция со стадией заболевания установлена лишь для АДА эритроцитов и лимфоцитов (рис. 6.). Ее характеризует отрицательная обратная связь как для эритроцитов ($r = -0,610$ ($p < 0,01$); $r = -0,451$ ($p = 0,05$); $r = -0,623$ ($p < 0,01$)), так и для лимфоцитов ($r = -0,612$, $p < 0,01$).

Корреляционный анализ не выявил связей между активностью ферментов углеводного обмена в эритроцитах и лимфоцитах со стадией патологического процесса. На примере эритроцитов, коэффициенты корреляции для ЛДГ и Г6ФДГ при РЛ, РЖ и РК равны соответственно: $r = 0,46$ ($p = 0,45$), $r = 0,08$ ($p = 0,61$), $r = -0,04$ ($p = 0,78$) и $r = 0,13$ ($p = 0,40$), $r = -0,02$ ($p = 0,89$), $r = 0,31$ ($p = 0,06$). Отрицательным значениям r указывают на снижение ферментативной активности на более поздних стадиях болезни.

При раке установлено повышение активности изученных ферментов в плазме крови. Однако зависимость от распространенности (стадии) процесса для всех локализаций установлена лишь для активности ЛДГ, соответственно, для РЛ, РЖ и РК: $r = 0,42$ ($p = 0,02$), $r = 0,30$ ($p = 0,31$), $r = 0,30$ ($p = 0,31$). Для АДА при РЖ и РК: $r = -0,40$ ($p = 0,03$) и $r = -0,40$ ($p = 0,029$). Активность Г6ФДГ

плазмы крови не зависела от стадии РЛ, РЖ и РК: $r = 0,02$ ($p = 0,93$), $r = -0,07$ ($p = 0,83$), $r = 0,07$ ($p = 0,83$).

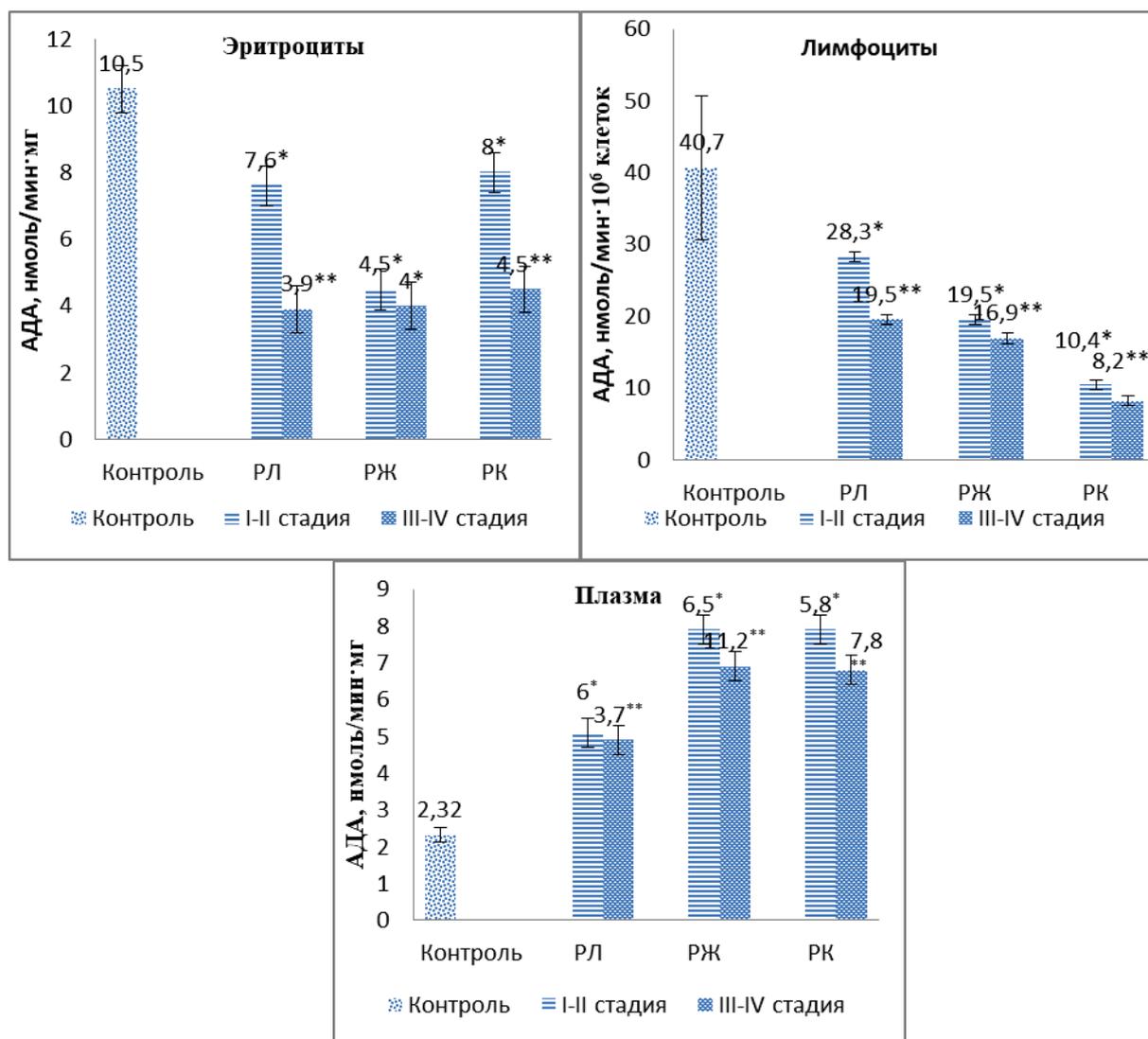


Рисунок 6 – Активность АДА в эритроцитах, лимфоцитах и плазме крови при РЛ, РЖ и РК.

Для активности АДА клеток крови была установлена обратная связь со стадией процесса. Известно, что дефицит АДА - фактор патогенеза иммуносупрессии при ТКИД, низкая активность в лимфоцитах при раке также сопровождается их дисфункцией (Борзенко Б. Г., 1988). В эритроцитах нарастание концентрации аденозина сопряжено с повышением числа патологических форм эритроцитов со сниженной жизнеспособностью (Gladwin T. M., 2011, Zhang Y., Xia Y., 2012). Следовательно, наши результаты согласуются с данными других авторов. Указывают на то, что перегрузка гликокаликса мембран клеток крови катаболитами и ее дезорганизация, сопряжены со снижением активности АДА, развитием клеточной дисфункции и гибелью клетки (согласно корреляции АДА и ССЭ). Установленные нами нарушения метаболизма клеток крови способствуют, как развитию гемической гипоксии, так и лимфоцитарной дисфункции.

Ранее мы указывали на неоднородность показателей углеводного обмена в эритроцитах у больных раком различных локализаций, не связанную со стадией процесса и патоморфологическим типом опухоли. Все показатели обработали методом кластерного анализа и сопоставили с индивидуальными уровнями гемоглобина эритроцитов, т.к. он непосредственно реализует их газотранспортную функцию.

Для корректного их сопоставления были выбраны кластеры активности Г6ФДГ, чьи абсолютные значения минимальны среди остальных показателей. Значения активности ЛДГ, АДА и других показателей жизнеспособности эритроцитов и лимфоцитов соответствовали индивидуальному значению Г6ФДГ, формирующему тот, или иной кластер. Были сформированы две группы: I-я – основная (кластер 1) и II-я (кластер 2) (см. таблицу).

Таблица – Активность ферментов углеводного обмена (Г6ФДГ, ЛДГ) и пуринового обмена (АДА) в эритроцитах по результатам кластерного анализа, нмоль/мин·мг белка, (Me ± ошибка медианы (95% ДИ))

	Кластеры	ЛДГ	Г6ФДГ	АДА
Конт- роль	(n=34)	2,69 ± 0,15 (2,19 - 3,28)	0,10 ± 0,01 (0,05 - 0,13)	12,8 ± 1,7 (9,42 - 9,65)
РЛ	I (n=18)	10,79 ± 0,67 (9,58-14,33) p<0,001↑↑	0,16 ± 0,06 (0,12-0,37) p<0,001↑	8,37 ± 1,5 (4,7-10,5) p<0,001↓
	II (n=16)	4,1 ± 0,75 (2,62-6,41) p=0,012↑	0,04 ± 0,01 (0,032-0,07) p=0,006↓	2,7 ± 0,5 (2,7-3,95) p<0,001↓↓
РЖ	I (n=20)	12,0 ± 0,4 (10,2-12,4) p<0,001↑↑	0,35 ± 0,04 (0,15-0,48) p<0,001↑↑	8,5 ± 0,6 (8,4-9,8) p<0,001↓
	II (n=14)	6,58 ± 0,87 (3,94-8,2) p<0,001↑	0,06 ± 0,01 (0,02-0,07) p=0,013↓	3,2 ± 0,5 (2,4-4,3) p<0,001 ↓↓
РК	I (n=20)	10,27 ± 0,39 (9,57-10,93) p<0,001↑↑	0,29 ± 0,07 (0,19-0,54) p<0,001↑↑	9,4 ± 0,9 (8,0-10,9) p<0,001↓
	II (n=14)	7,85 ± 0,83 (5,12-8,96) p<0,001↑	0,06 ± 0,01 (0,04-0,08) p=0,023 ↓	3,95 ± 0,60 (3,46-6,9) p<0,001 ↓↓

Примечание: для достоверных изменений указано: ↑ - выше, ↓ - ниже контроля.

Не зависимо от локализации опухоли в I-х (основных) группах активность ЛДГ имела максимально высокие значения, достоверно превышая не только контрольные значения (в 3,8 – 4,5 раза), но и значения II-й подгруппы (в 1,3 – 2,8 раз). Активность Г6ФДГ изменялась в группах по-разному (табл. 1). В I-х группах, она достоверно превышала контроль при любой локализации рака. Во II-х гр. значения её активности была минимальными, как по сравнению с контролем (ниже в 1,7 – 2,5 раза), так и с активностью в основной группе (в 4 – 5 раз).

Активность АДА снижалась во всех группах, но наиболее выражено во II-х подгруппах (в 3,2 – 4,7 раза) (табл. 1). Нами было установлено, что АДА обратно коррелирует с уровнем аденозина: при РЖ $r = -0,606$ ($p < 0,01$), при РК $r = -0,504$ ($p = 0,02$), при РЛ $r = -0,451$ ($p=0,05$).

При раке для ОРЭ установили различия с контролем по минимальной осморезистентности. В среднем в I-х группах при РЛ, РЖ и РК она была $0,45 \pm$

0,03%, т.е. повышена (гемолиз начинался на меньшей концентрации NaCl, позже, чем в контроле - $0,50 \pm 0,01\%$, $p < 0,05$), что могло быть связано с усилением эритропоэза и наличием молодых форм эритроцитов. Во II –х группах min ОРЭ понижалась: при РЛ $0,57 \pm 0,03\%$, $p < 0,05$; при РЖ $0,70 \pm 0,02\%$ и при РК $0,65 \pm 0,028\%$, $p < 0,001$. Это может быть связано с циркуляцией патологических форм эритроцитов, что хорошо согласуется со снижением активности АДА и Г6ФДГ.

ССЭ была повышена у больных при всех локализациях и составила: в I-й гр. при РЛ – $45,0 \pm 5,0\%$, РЖ $56,0 \pm 5,6\%$, РК $44,0 \pm 3,0\%$ и контроль - $33,5 \pm 4,0\%$, $p = 0,001$, во II –й группе повышение ССЭ было более выраженным при всех локализациях и в среднем составило $76,0 \pm 2,0\%$, $p < 0,001$, что считается индикатором повреждения мембран и клеточной дезорганизацией, хорошо согласуется с выявленной перегрузкой гликокаликса эритроцитов ВНиСММ и нарушениями ОРЭ.

Таким образом, не зависимо от локализации опухоли, те случаи, которые были отнесены при кластерном анализе во II-е группы, имели наиболее неблагоприятные метаболические изменения в эритроцитах, сопряженные со снижением их жизнеспособности.

В двух выделенных кластерах эритроцитов определены патогенетические связи между установленными нарушениями обмена глюкозы, аденозина и состоянием мембран клеток крови (рис. 7, 8).

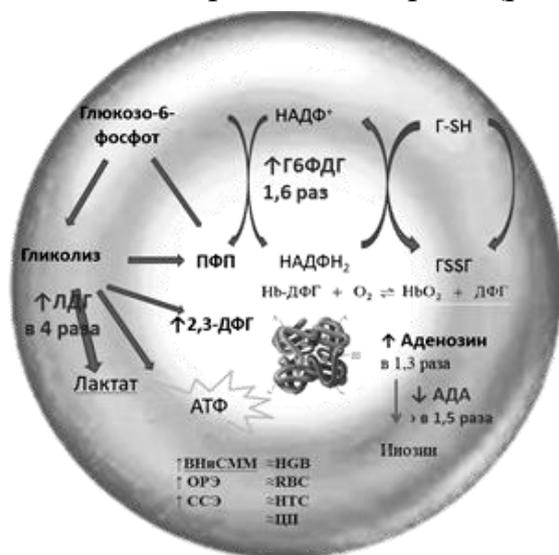


Рисунок 7 – Адаптационные сдвиги метаболизма в эритроцитах больных РЛ (кластер 1)

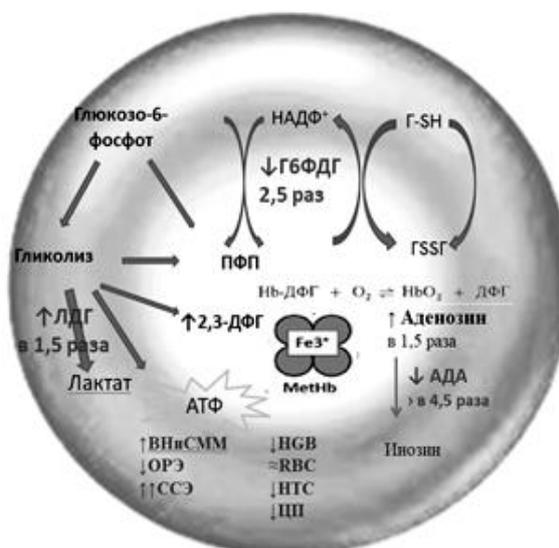


Рисунок 8 – Дезадаптация метаболизма эритроцитов больных РЛ (кластер 2)

Их систематизация позволила выявить две модели ответа эритроцитов на перегрузку их мембран циркулирующими ВНиСММ. Так метаболические изменения, характерные для основных подгрупп (кластер 1) являются компенсаторными, адаптированными под возросшие потребности в АТФ, усиление потребления водорода глюкозы для восстановления глутатиона (повышение Г6ФДГ). Некоторое снижение активности АДА способствует

формированию 2,3-ДФГ для обеспечения газотранспорта, но не за счет снижения эффективного синтеза АТФ в гликолизе (рис. 10, табл. 1). Метаболические перестройки в эритроцитах, отнесенных в кластер 2, указывают на утрату адаптивного характера изменений обмена и декомпенсацию (рис. 11, табл. 1). Вероятно, что критическим для развития декомпенсации обмена в эритроцитах кластера 2 будут дефицит НАДФН₂, а значит дисбаланс антиоксидантной системы глутатиона, как следствие усиление ПОЛ. Следовательно, дезорганизация мембраны и затруднения мембранного транспорта будут усиливаться, что подтверждается 2-х кратным нарастанием ССЭ по сравнению с контролем и нарушениями ОРЭ. При этом не происходит дальнейшего повышения активности ЛДГ, отражающей интенсивность гликолиза (единственного источника АТФ), напротив, она ниже, чем в эритроцитах, формировавших кластер 1. Учитывая резкое снижение активности мембраносвязанной АДА и ГбФДГ, можно трактовать снижение активности ЛДГ в данном кластере как результат снижения продукции ее субстратов – пирувата и НАДН₂. Этому способствуют установленное нарастание уровней аденозина (на фоне снижения АДА в 4,5 раза), стимулирующего отток гликолитического 1,3-дифосфолипидата, трансформируемого в 2,3 - ДФГ. Отток НАДН₂ необходим для восстановления метгемоглобина и его функции.

Нами проведен анализ патохимических изменений в эритроцитах больных раком с их индивидуальными данными цитометрии. По ее данным выявлено, что во 2-й группе эритроциты пациентов с РЛ имели достоверно пониженный уровень гемоглобина (HGB $108,8 \pm 5,5$ г/л) и гематокрита (НТС $34,9 \pm 1,4$ %), по сравнению с 1-й группой, что свидетельствует о развитии анемии.

Для постановки прогноза развития анемии разработали методику балльной оценки с помощью вероятностного статистического анализа Вальда. Результаты анализа показали высокую информативность одновременного определения активности АДА, ГбФДГ и ЛДГ в эритроцитах для прогноза их дисфункции и анемии.

Аналогичным образом распределялась активность ферментов и в кластерах лимфоцитов. Это указывает на то, что угнетение клеточной активности АДА и ГбФДГ - универсальные, значимые факторы патогенеза синдромов анемии и иммунной дисфункции, развивающихся на фоне нарушений гомеостаза циркулирующих ВНиСММ при раке.

ВЫВОДЫ

В диссертации проведено экспериментальное и теоретическое исследование особенностей утилизации клетками крови глюкозы, обмена аденозина, их взаимосвязи с показателями дезорганизации клеточных мембран при раке различных локализаций. Выявлены универсальные биохимические особенности, определяющие декомпенсацию процессов обмена клеток крови, сопряженные с их дисфункцией и снижением жизнеспособности.

1. При раке исследуемых локализаций установлено нарастание катаболического пула циркулирующих низкомолекулярных веществ, как в плазме (в 1,4 – 2 раза; $p < 0,001$), так и на поверхности сорбированных их мембран клеток крови. Для эритроцитов было характерно повышение концентраций преимущественно пуриновой группы ВНиСММ, сопровождавшееся нарастанием удельного веса нежизнеспособных клеток (по результатам исследования ССЭ: повышение при РЛ на 29% ($p=0,001$), РЖ – на 63% ($p=0,001$), РК – на 24% ($p=0,001$)). Это в сочетании со снижением ОРЭ (при РЖ ($p = 0,011$) и при РК ($p = 0,031$)) характеризует наличие структурных изменений мембран и подверженность гемолизу.
2. При изучении особенностей проницаемости мембран лимфоцитов в динамике выявили увеличение содержания нежизнеспособных клеток. Следовательно, при раке различных локализаций повышение концентраций ВНиСММ способствует перегрузке гликокаликса и дестабилизации мембран, как эритроцитов, так и лимфоцитов крови.
3. При раке различных локализаций для эритроцитов характерно повышение активности ЛДГ (соответственно, в 3,6 раз при РЛ, в 3,7 раз при РЖ и РК, $p < 0,001$). В лимфоцитах оно менее интенсивное. Выраженных изменений активности Г6ФДГ в клетках крови не обнаружено. Лишь при РК и РЛ в лимфоцитах она незначительно повышалась в 1,4 раза ($p = 0,046$ и $p = 0,034$, соответственно). При раке активность АДА в клетках крови снижается: в эритроцитах при РЛ, РЖ и РК - в 1,4 раза, 2 раза и 1,6 раза ($p < 0,001$); значительно в лимфоцитах, соответственно, в 2,6 раза, 3,6 раза и 6,9 раз (для всех локализаций $p < 0,001$). Это сопровождается нарастанием клеточных концентраций аденозина и способствует проявлению его цитотоксичности. Патохимические изменения в клетках крови в ответ на перегрузку гликокаликса их мембран циркулирующими ВНиСММ подобны. Однако каждый тип клеток имеет свои особенности.
4. В плазме крови при раке выявлено повышение активности ферментов обмена глюкозы и аденозина. Однако лишь для активности ЛДГ установлена корреляция со стадией процесса (соответственно, для РЛ, РЖ и РК: $r = 0,423$ ($p = 0,02$), $r = 0,303$ ($p = 0,31$), $r = 0,303$ ($p = 0,31$)). При всех исследуемых локализациях рака, как в эритроцитах, так и лимфоцитах активность АДА коррелировала со стадиями процесса, была связана с нарастанием концентраций аденозина. Установленные её отрицательные обратные связи с ССЭ и уровнями нежизнеспособных лимфоцитов при всех исследуемых локализациях рака, позволяют считать АДА ферментативным показателем низкой жизнеспособности и дисфункции клеток крови.
5. Кластерный анализ характеризует 2 модели клеточного ответа на нарушения гомеостаза циркулирующих в кровотоке ВНиСММ – изменения обмена, адаптирующие клетку к новым условиям, и его декомпенсацию. На нее указывают: снижение активности АДА (более чем в 3 раза) и Г6ФДГ на фоне незначительного повышения активности ЛДГ. Эти нарушения сопровождались нарастанием нежизнеспособных клеток (повышение ССЭ в 2 раза по сравнению с контролем в среднем до $76,0 \pm 2,0 \%$, $p < 0,001$),

достоверным снижением концентрации гемоглобина, т.е. развитием анемии. Подобным образом распределялись показатели лимфоцитов.

6. Системный кластерный анализ всех исследуемых показателей при РЛ, РЖ, РК позволил выявить некоторые универсальные биохимические факторы патогенеза синдромов анемии и иммунной дисфункции, развивающихся на фоне нарушений гомеостаза циркулирующих ВНиСММ при раке.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. В качестве раннего прогностического теста развития анемического синдрома у онкобольных при различных локализациях опухолевого процесса предлагаем исследовать особенности активности эритроцитарных АДА, ГбФДГ, ЛДГ. Согласно методу последовательного анализа Вальда одновременное снижение активности АДА (более чем в 4,5 раза) и ГбФДГ (в 2,5 раза и более) на фоне повышения активности ЛДГ (в 1,5 раза и более) позволяет считать тест положительным в прогнозе развития анемии.
2. Для скрининга иммунной дисфункции, явлений гемической гипоксии может быть применен метод обработки витальным красителем и регистрация удельного веса нежизнеспособных клеток. Для эритроцитарной массы – ССЭ с 0,025% раствором метиленового синего, для лимфоцитарной – с помощью трипанового синего. Для повышения чувствительности последнего рекомендуем повторную регистрацию через 30 минут инкубации с красителем. Методы могут применяться для мониторинга цитотоксичности при проведении химио-лучевой терапии.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО МАТЕРИАЛАМ ДИССЕРТАЦИИ

Статья в журнале Scopus:

1. Bakurova E.M. Disorders of purines and pyrimidines metabolism in human gastrointestinal tract cancer (EU, POLAND) / Bakurova E.M., **Mironova K.A.**, Borzenko B.G. // Curr. Issues Pharm. Med. Sciences. – 2013. - Vol. 26, № 4. – P. 369 – 371. *(Автором проведен эксперимент)*

Статьи в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК

2. Особенности системы антирадикальной защиты и углеводный обмен эритроцитов у больных язвенной болезнью /Б.Г. Борзенко, Е.М. Бакурова, Я.Г. Жебеленко, С.А. Зуйков, **К.А. Миронова** // Загальна патологія та патологічна фізіологія. – 2010. – Т.5, №3. – С. 186-189. *(Автором проведен фрагмент биохимического эксперимента)*
3. Борзенко Б. Г. Патогенетические особенности метаболизма клеток крови при различном течении язвенной болезни у человека / Б.Г. Борзенко, Е.М. Бакурова, **К.А. Миронова** и др. // Таврический медико-биологический вестник. – 2012. - Том 15. - № 3, ч. 2 (59). - С.47-50 *(Автором проведен фрагмент биохимического эксперимента)*
4. Миронова К.А. Нарушения гомеостаза аденозина у онкобольных / **Миронова К.А.** // Новообразование. – 2017. – Т. 16, №. 1. С. 51-54. ISSN 2521-117X.

5. Миронова К.А. Взаимосвязь между метаболическими нарушениями в лимфоцитах и их жизнеспособностью у онкобольных / **Миронова К.А.** // Университетская клиника. – 2017. – Т. 13, № 1. – С. 20-23.
6. Миронова К.А. Патохимические изменения в клетках крови и нарушение функционального состояния мембран у онкобольных / **Миронова К.А.** // Университетская клиника. – 2017. – Т. 1. - № 4 (25). – С. 127-130.
Статьи в научных журналах и сборниках:
7. Миронова К.А. Особенности обмена аденозина и лактата в клетках крови при аденокарциноме/ **Миронова К.А.** // Евразийский союз ученых. – 2015. – № 8-3 (17). – С. 148-152.
8. Миронова К.А. Нарушение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в клетках крови у пациентов с онкопатологией / **Миронова К.А.**, Бакурова Е.М. // Сборник Материалов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Современные достижения химико-биологических наук в профилактической и клинической медицине». – РФ, Санкт-Петербург. – 2020. С. 126-131.
9. Миронова К.А. Связь изменений активности дегидрогеназ обмена глюкозы со стадией заболевания при немелкоклеточном раке легких / **Миронова К.А.**, Бакурова Е.М., Турсунова Ю.Д. // Сборник статей по итогам Международной научно-практической конференции: «Наука и инновации в XXI веке: актуальные вопросы, открытия и достижения». – РФ, Таганрог. – 2020. – С. 29-31.
10. Age -Specific Features of the Enzymatic Proliferation Markers upon the Cancer of Different Localisations / B.G. Borzenko, E.M. Bakurova, **K.A. Mironova**, et.al. – ebook. // Highlights on Medicine and Medical Research: ebook: Print ISBN: 978-93-90888-62-7, eBook ISBN: 978-93-90888-70-2 // DOI: 10.9734/bpi/hmmr/v10/7417D. - 2021. - Chapter 9. - Vol. – 10. - P. 63-71.
Тезисы в сборниках и материалах конференций, конгрессов, форумов
11. Cellular interactions during gastrointestinal cancer development / Borzenko B.G., Bakurova E.M., **Mironova K.A.** et.al. //17th-ECCO -38th- ESMO – 32nd-ESTRO European Cancer Congress. Programme book (Европейский конгресс, Нидерланды). Amsterdam, the Netherlands. – 2013. – P. 259.
12. Миронова К.А. Нарушения метаболизма в лимфоцитах при различной локализации опухолевого процесса / **Миронова К.А.**, Борзенко Б.Г., Ищенко Р.В. // Российский биотерапевтический журнал. – 2016. – Т. 15.- №1. – С.67.
13. Миронова К.А. Взаимосвязь между активностью аденозиндезаминазы и жизнеспособностью лимфоцитов у онкобольных / **Миронова К.А.** // Фундаментальная наука и клиническая медицина: Тезисы XX Международной медико-биологической конференции молодых исследователей. – СПб.: Изд-во СПбГУ, Фундам. наука клин.мед. – 2017. – т. 20. – с. 366–367.
14. Миронова К.А. Дисметаболические процессы и дезорганизация гликокаликса эритроцитов при развитии анемии у онкобольных / **Миронова К.А.**, Бакурова Е.М. // Сборник материалов IV

межрегиональной научно-практической конференции «Диагностика и лечение анемии в XXI веке». Современные вопросы гематологии в педиатрической, акушерской и онкологической практике. – Рязань: ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России. – 2017. – С. 126-127.

15. Миронова К.А. Аденозиндезаминаза – универсальный маркер жизнеспособности клеток крови / **Миронова К.А.** //Материалы III Всероссийской Конференции «Успехи молекулярной онкологии»/Advances in molecular oncology. – 2017. – № 4. – С.107-108.
16. Пасечник Т.А. Анализ инновационных путей решения иммунодефицита в малигнизированной ткани, опосредованного аденозином / Пасечник Т.А., **Миронова К.А.** // Материалы 80-го Медицинского Конгресса «Актуальные проблемы теоретической и клинической медицины». – Донецк. – 2018. - С. 38-39.
17. Миронова К.А. Нарушения метаболизма в лимфоцитах при раке легких //Актуальные проблемы биомедицины – 2020. / **Миронова К.А.** // Сборник тезисов XXVI Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием. – Санкт-Петербург. – 2020. С. 125-126.
18. Миронова К.А. Снижение жизнеспособности эритроцитов при раковой анемии / **Миронова К.А.** // Сборник тезисов к Международной научной конференции «Физико-химическая биология как основа современной медицины». - Беларусь, г. Минск. – 2020. – С. 112-113.
19. Миронова К.А.. Универсальный маркер жизнеспособности клеток крови / **Миронова К.А.**, Бакурова Е.М. // Научно-практический журнал «Архив клинической и экспериментальной медицины». Приложение 2. Материалы XI Международной научно-практической интернет конференции: «Состояние здоровья: медицинские, социальные и психолого-педагогические аспекты». – Донецк: ГОО ВПО ДОННМУ ИМ. М. ГОРЬКОГО. – 2020. – С. 92.

Патенты и рационализаторские предложения

20. Спосіб раннього виявлення малігнізації при виразковій хворобі шлунка. Пат. 61235 Україна: МПК А 61 В 10/00/ Жебеленко Я.Г., Бакурова О.М., Зуйков С.О., **Миронова К.О.**; заявник та патентовласник Донецький національний медичний університет ім.М.Горького. – № 2011 00022; заявл. 04.01.2011; опубл. 17.07.2011, Бюл. №13. – 4 с. (*Автором лично проведены биохимические исследования*).
21. Способ определения жизнеспособности лимфоцитов у онкобольных in vitro / **Миронова К.А.**, Бакурова Е.М., Турсунова Ю.Д. // Рац. предложение зарегистрировано в ГОО ВПО ДОННУ ИМ.М.ГОРЬКОГО от 18.10.2021, №6502.

АННОТАЦИЯ

Миронова Ксения Александровна. Особенности активности ферментов обмена глюкозы и аденозина в клетках крови у больных раком легких, желудка и кишечника. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.03.03 – патологическая физиология. Государственная образовательная организация высшего профессионального образования «Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького», МЗ ДНР, г. Донецк, 2022.

В диссертационном исследовании проведено экспериментальное и теоретическое исследование особенностей обмена эритроцитов и лимфоцитов крови онкобольных, а именно, потребления глюкозы, обмена аденозина и их взаимосвязи с показателями дезорганизации мембран клеток крови при раке легких, желудка и кишечника. Материалом служили клетки крови и плазма, выделяемые из крови периферического кровотока, а также получаемой интраоперационно из регионарных сосудов. Исследованы особенности активности ферментов лактатдегидрогеназы (ЛДГ), глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы (Г6ФДГ), аденозиндезаминазы (АДА), их взаимосвязи с показателями мембранной дисфункции (ССЭ, ОРЭ), уровнями нежизнеспособных лимфоцитов.

По характерным спектрам поглощения установили нарастание циркулирующих катаболитов в плазме крови онкобольных (ВНиСММ): при РЛ на 140% ($p < 0,001$), РЖ на 195% ($p < 0,001$), РК на 182% ($p < 0,001$). При этом эритроциты сорбировали преимущественно катаболиты пуриновой группы. Определили, что повышение концентраций ВНиСММ преимущественно пуриновой группы и непосредственно аденозина в эритроцитах крови – неблагоприятный показатель их жизнедеятельности, т.к. при этом наблюдалось нарастание удельного веса нежизнеспособных эритроцитов. Это может быть связано с усилением катаболизма АТФ. Действительно, выявили усиление потребления глюкозы в гликолизе, установив дисбаланс активностей ЛДГ и Г6ФДГ, как в эритроцитах, так и лимфоцитах крови. Выявлено, что при раке для лимфоцитарной массы крови, как и для эритроцитов, характерно увеличение содержания нежизнеспособных клеток по сравнению с контролем. Введение нами дополнительной регистрации процента этих клеток через 30 мин. инкубации с витальным красителем повышало информативность метода.

Наряду с повышением потребности клеток в глюкозе выявлено снижение активности АДА, способствующее избытку аденозина и его цитотоксичности. Действительно, обнаружена обратная зависимость между активностью АДА и процентным содержанием нежизнеспособных лимфоцитов и ССЭ эритроцитов. Лишь для АДА установлена связь со стадией рака. Это все позволяет предложить исследование АДА в качестве ферментативного показателя низкой жизнеспособности и дисфункции клеток крови.

Неоднородность показателей углеводного обмена в клетках крови позволила применить метод кластерного анализа и выявить 2 кластера,

характеризовавшие изменения метаболизма клеток крови в ответ на перегрузку их мембран ВНиСММ.

Соответственно, показатели активности, наблюдавшиеся в кластере 2, указывали на декомпенсацию обмена, т.к. коррелировали с нарастанием нежизнеспособных, следовательно, терявших свои функции клеток: незначительное повышение активности ЛДГ (при РЛ выше контрольной в 1,5 раза, при РЖ в 2,3 раза, при РК в 2,9 раза; $p < 0,001$); снижение активности Г6ФДГ (при РЛ в 2,5 раза, $p = 0,006$; при РЖ в 1,7 раза, $p = 0,013$; при РК в 1,7 раза ниже активности в контроле; $p = 0,023$); значительное снижение активности АДА более чем в 3 раза (в частности, при РЛ ниже контрольной в 4,7 раза, при РЖ и при РК в 3,2 раза; $p < 0,001$ для всех локализаций). Данная модель клеточного ответа характеризовала дезадаптацию эритроцитов. Для эритроцитов данного кластера было характерно нарастание уровней нежизнеспособных эритроцитов. Было выявлено снижение гемоглобина, что свидетельствует о развитии анемии.

Во втором кластере лимфоцитов также снижение активности АДА и Г6ФДГ коррелировали с максимальными уровнями нежизнеспособных клеток.

Таким образом, были расширены представления о патогенезе системного влияния опухоли на организм и развитии синдрома эндогенной интоксикации. Выявлены метаболические показатели, сопутствующие развитию мембранной дисфункции клеток крови, способствующие их гибели. Разработаны рекомендации по использованию биохимического теста для прогноза развития анемического синдрома у онкобольных при различных локализациях опухолевого процесса.

Ключевые слова: обмен глюкозы и аденозина, ферменты, рак, эритроциты, лимфоциты, анемия.

ABSTRACT

Kseniya A. Mironova. The enzymatic features of glucose and adenosine metabolism in blood cells in patients with cancer of the lungs, stomach and intestines. – The Manuscript.

Thesis for the PhD degree. The specialty: 14.03.03 – Pathological Physiology. – M. Gorky Donetsk National Medical University, the DPR Ministry of Health, Donetsk, 2022.

An increase in the consumption of glucose in glycolysis was established, by establishing an imbalance in the activities of lactate dehydrogenase and glucose-6-phosphatedehydrogenase (G6PDG) in both erythrocytes and lymphocytes in cancer. A decrease in adenosine deaminase (ADA) activity was revealed, which promotes an excess of adenosine and its cytotoxicity. An inverse relationship was found between the activity of ADA and the percentage of non-viable lymphocytes and erythrocytes. A relationship with the stage of cancer has been established only for ADA activity. All this allows us to propose the study of ADA as an enzymatic indicator of low viability and dysfunction of blood cells.

Systemic cluster analysis of all the studied parameters in patients with cancer of the lungs, stomach and intestine made it possible to identify universal, significant factors in the pathogenesis of anemia and immune dysfunction syndromes. Syndromes develop against the background of disturbances in the homeostasis of circulating substances of low and medium molecular weight in cancer. The inhibition of the cellular activity of ADA and G6PDH predetermined the toxic effect of adenosine and free radical oxidation, which, against the background of the intensity of energy exchange, reduced the viability of erythrocytes and blood lymphocytes in cancer patients.

Key words: glucose and adenosine metabolism, enzymes, cancer, erythrocytes, lymphocytes, anemia.

СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

2,3-ДФГ	2,3-дифосфоглицерат
АДА	аденозиндезаминаза
АОС	антиоксидантная система
АФК	активные формы кислорода
ВНиСММ	вещества низкой и средней молекулярной массы
Г6ФДГ	глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа
ЛДГ	лактатдегидрогеназа
НМКРЛ	немелкоклеточный рак легких
ОРЭ	осмотическая резистентность эритроцитов
ПОЛ	перекисное окисление липидов
ПФЦ	пентозофосфатный цикл
РЖ	рак желудка
РК	рак кишечника
РЛ	рак легких
ССЭ	сорбционная способность эритроцитов
ТХУ	трихлоруксусная кислота
ТКИД	тяжелый комбинированный иммунодефицит
НIF	специфические факторы, которые индуцируют гипоксию