

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

На правах рукописи

МИРОНОВА КСЕНИЯ АЛЕКСАНДРОВНА

УДК 611.018.5-008.8+616.33-002.44-006.6

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

14.03.03 – патологическая физиология

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат медицинских наук, доцент
Бакурова Елена Михайловна

*Экземпляр идентичный всем
существующим у Учёного секретаря
Диссертационного совета Д 01.022.05
Стрельченко Ю. И.*

Донецк - 2022

СОДЕРЖАНИЕ

	Стр.
СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	5
РАЗДЕЛ 1. ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ДИСМЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В КЛЕТКАХ КРОВИ ПРИ РАКЕ (обзор литературы).....	14
1.1 Современные взгляды о значении эндогенной интоксикации в патогенезе рака.....	14
1.2 Особенности эритропоэза и иммунитета у онкобольных.....	16
1.3 Функциональные и метаболические нарушения в эритроцитах при опухолевом дисэритропоэзе.....	18
1.4 Иммунометаболизм. Метаболизм глюкозы и опухолевый иммунитет.....	21
1.5 Патохимическая роль лактатдегидрогеназы, глюкозо-6- фосфатдегидрогеназы и аденозиндезаминазы при раке различных локализаций.....	24
РАЗДЕЛ 2. МАТЕРИАЛЫ И МОТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	35
2.1 Общая характеристика больных и принципы формирования групп в исследовании.....	35
2.2 Методы подготовки материала для исследований.....	39
2.2.1 Лабораторные методы разделения цельной крови на фракции.....	39
2.2.2 Биохимические методы исследования.....	41
2.2.3 Методы исследования стабильности мембран клеток крови	47
2.3 Статистическая обработка полученных результатов исследования.....	50
РАЗДЕЛ 3. ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ ОБМЕНА ГЛЮКОЗЫ И АДЕНОЗИНА В ЭРИТРОЦИТАХ, ЛИМФОЦИТАХ И ПЛАЗМЕ КРОВИ.....	52
РАЗДЕЛ 4. ПОКАЗАТЕЛИ ДЕЗОРГАНИЗАЦИИ МЕМБРАН КЛЕТОК КРОВИ ПРИ РАКЕ РАЗЛИЧНЫХ ЛОКАЛИЗАЦИЙ.....	65
4.1 Исследование содержания веществ низкой и средней молекулярной массы (ВНиСММ) эритроцитов и плазмы крови в норме и при раке.....	65
4.2 Изучение уровня аденозина в эритроцитах и плазме крови в норме и при раке.....	73
4.3 Исследование осмотической резистентности и сорбционной	

способности эритроцитов в норме и при раке.....	79
4.4 Исследование удельного веса нежизнеспособных лимфоцитов в норме и при раке.....	85
РАЗДЕЛ 5. АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ ОБМЕНА ГЛЮКОЗЫ И АДЕНОЗИНА В ПЛАЗМЕ И КЛЕТКАХ КРОВИ ПРИ РАКЕ ЖЕЛУДКА, КИШЕЧНИКА, ЛЕГКИХ.....	91
5.1 Активность ферментов углеводного и нуклеотидного обменов в эритроцитах и лимфоцитах крови при раке легких, желудка и кишечника.....	91
5.2 Возрастные особенности активности ферментов углеводного и нуклеотидного обменов в эритроцитах и лимфоцитах крови при раке легких, желудка и кишечника.....	96
5.3 Особенности активности ферментов углеводного и нуклеотидного обменов в эритроцитах и лимфоцитах крови при раке легких, желудка и кишечника в зависимости от стадии патологического процесса.....	102
5.4 Показатели активности ферментов обмена глюкозо-6-фосфата и аденозина в плазме крови при раке легких, желудка и кишечника в зависимости от возраста и стадии заболевания.....	108
РАЗДЕЛ 6. ВЗАИМОСВЯЗЬ ИЗМЕНЕНИЙ МЕТАБОЛИЗМА КЛЕТОК КРОВИ И ПОКАЗАТЕЛЕЙ СТАБИЛЬНОСТИ ИХ МЕМБРАН У ОНКОБОЛЬНЫХ.....	120
РАЗДЕЛ 7. ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	134
ВЫВОДЫ.....	147
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	149
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	150

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АДА	аденозиндезаминаза
АК	аденокарцинома
АОС	антиоксидантна система
АТФ	аденозинтрифосфорная кислота
АФК	активные формы кислорода
ВНиСММ	вещества низкой и средней молекулярной массы
Г6ФДГ	глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа
ГПО	глутатионпероксидаза
2,3 -ДФГ	2,3-дифосфоглицерат
ЛДГ	лактатдегидрогеназа
НМКРЛ	немелкоклеточный рак легких
ОРЭ	осмотическая резистентность эритроцитов
ОФ	окислительное фосфорилирование
ПФЦ	пентозофосфатный цикл
РЖ	рак желудка
РК	рак кишечника
РЛ	рак легких
РШМ	рак шейки матки
РЯ	рак яичника
ССЭ	сорбционная способность эритроцитов
СМВ	среднемолекулярные вещества
ТХУ	трихлоруксусная кислота
ЦТК	цикл трикарбоновых кислот
НIF	специфические факторы, которые индуцируют гипоксию
Нб	гемоглобин
НТС	гематокрит

ВВЕДЕНИЕ

В патогенезе рака важную роль имеют фактор гипоксии, функциональная активность иммунокомпетентных клеток. Поэтому изучение метаболических нарушений именно в эритроцитах и лимфоцитах имеет важное значение для прогноза, оценки состояния больного, а также эффективности лечения при раке различных локализаций.

Актуальность темы. Рак легких (РЛ), рак желудка (РЖ) и рак кишечника (РК) занимают лидирующие позиции в структуре заболеваемости и смертности от рака в мире [22, 138, 143, 183, 186, 188, 190, 203, 206]. Формированию индивидуальных агрессивных свойств опухоли способствуют дисфункция лимфоцитов, инфильтрирующих ее строму и гипоксия [133, 138]. Дисметаболические процессы в клетках крови вызывают развитие их дисфункции [67, 138]. Дисфункция внутренних гомеостатических механизмов в эритроцитах может приводить к развитию анемии [67], отягощающей течение основного заболевания. При этом, анемия, ассоциированная с хроническими заболеваниями, присутствует у 40% больных с солидными новообразованиями [195]. Чаше анемический синдром сопровождает развитие опухолей изученных нами локализаций. Так при раке легкого анемия наблюдается в 71% случаев [195], у больных раком желудка еще до начала лечения, по данным разных авторов, встречается с частотой от 21% до 73% [24]. Анемия коррелирует со стадией заболевания, чаще развивается на поздних стадиях заболевания.

В поддержании иммунологического гомеостаза ведущая роль принадлежит клеткам лейкоцитарного ряда, на иммунофункциональную активность которых влияют ключевые ферменты, регулирующие основные звенья метаболизма углеводов и нуклеотидов.

Кроме анемии, следствием злокачественного опухолевого процесса является развитие таких синдромов как кахексия [36, 58, 75], лактоацидоз [50, 51, 91], синдром повышенной вязкости крови [66, 117]. Все это взаимосвязанные процессы, развивающиеся на фоне, так называемого, синдрома старения

эритроцитов, в основе которого лежат дисметаболические процессы. Патогенез таких синдромов тесно связан с развитием эндогенной интоксикации [146, 147, 149]. Активация протеолиза, при канцерогенезе, способствует увеличению уровня молекул низкой и средней массы [149]. Актуальным на наш взгляд является кооперативное исследование показателей мембранной дисфункции и нарушений метаболизма клеток крови у больных одной нозологии для выявления наиболее информативных метаболических критериев прогноза/развития синдрома анемии и иммунной дисфункции. В данном исследовании параллельно с ВНиСММ, показателями обменов клеток крови были исследованы осмотическая резистентность эритроцитов (ОРЭ), сорбционная способность эритроцитов (ССЭ). Учитывая, что развитие мембранной дисфункции клеток крови – универсальный механизм интоксикации избытком ВНиСММ, параллельно изучались показатели функционального состояния мембран лимфоцитов. В частности, особенности мембранной проницаемости лимфоцитов по интенсивности поглощения трипанового синего.

Роль дезорганизации клеточной мембраны и ее взаимосвязь с нарушением метаболизма углеводов и нуклеотидов, учитывая системное влияние опухоли, в развитии у онкобольных таких синдромов как анемия и иммунная дисфункция изучены недостаточно.

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

Предполагаем, что данное исследование поможет решить ряд задач, как научного, так и практического характера.

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.B. 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 диссертации утверждена 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, Г6ФДГ, 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 выводение 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 Г6ФДГ. 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 мембраносвязанных ферментов (АДА и Г6ФДГ) 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 ГОО 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 побеждать...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).

РАЗДЕЛ 1

ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ДИСМЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В КЛЕТКАХ КРОВИ ПРИ РАКЕ

(обзор литературы)

1.1 Современные взгляды о значении эндогенной интоксикации в патогенезе рака

Понятие «эндогенная интоксикация» формировалось на протяжении последних 50-70 лет. Носит системный характер. Является базовым фактором, опосредующим специфические нарушения метаболизма, как следствие, функциональных нарушений в отдельных тканях и органах. В последние годы этой проблеме было посвящено много работ [4, 33, 40, 54, 60, 61, 73, 82, 84].

У большинства больных течение онкологического заболевания сопровождается формированием эндотоксического синдрома [54, 60, 61, 73, 84]. Эндотоксикация может быть специфична по инициирующим факторам, но всегда универсальна по характеру ее развития [40]. Эндотоксемия при онкологических заболеваниях имеет смешанную природу и обусловлена иммунодепрессией, усилением патологических процессов, поражением или нарушением функции органов детоксикации, повреждающим действием лучевой терапии, применением цитостатических препаратов [40]. Хирургическое вмешательство, химиолучевое лечение способствует прогрессированию эндотоксикоза. Так, усиление эндогенной интоксикации наблюдали у больных РЖ в раннем послеоперационном периоде [60, 61].

Характерная для онкопатологии активация процессов свободнорадикального окисления (СРО), приводит к накоплению токсических веществ, которые относят к эндотоксинам. Перечень эндотоксинов был подробно изучен в работах таких авторов, как М.Я. Малахова и др. [33, 54, 82].

Одним из ведущих механизмов развития эндотоксикоза является активация процессов СРО, что с одной стороны играет роль неспецифической защиты организма, с другой - способно приводить к существенным повреждениям клеточных мембран, органов и систем [61, 83, 194].

В норме уровень молекул средней массы (МСМ) зависит от многих факторов – пол, возраст, физические нагрузки, регион проживания/экологическая обстановка. Для этого целесообразно установить «собственную» норму.

Вещества низкой и средней молекулярной массы (ВНиСММ) в повышенной концентрации обладают нейротоксичностью, подавляют активность лактатдегидрогеназы, транскетолазы, пируваткиназы, нарушают синтез адениловых нуклеотидов, способны вызвать вторичную иммунодепрессию, влияют на все виды обмена в организме [54, 82].

Состояние эндогенной интоксикации у онкогинекологических больных зависит от тяжести заболевания. В исследовании коллектива авторов [60] было показано, что у больных с осложненным онкопроцессом (асцитная форма рака яичников (РЯ), РЯ IV стадии, рецидив РЯ, рак шейки матки (РШМ) с метастазами, при рецидиве РШМ) происходят серьезные нарушения в системе эндотоксикоза. Авторы связывают это с патологической биологической активностью эндогенных продуктов и дисфункцией систем естественной детоксикации и биотрансформации [60]. Менее выраженные изменения в системе эндотоксикоза, а зачастую и их отсутствие, отмечали в случае ремиссии опухолевого процесса.

Весьма существенное воздействие оказывают МСМ на функционирование клеточного звена системы иммунитета. Ими угнетаются процессы бласттрансформации лимфоцитов и розеткообразования, что приводит к развитию вторичного, метаболически обусловленного, иммунодефицита [4].

Было показано [4], что включение энтеросорбентов в комплексное лечение различных заболеваний приводит к значительному уменьшению концентрации токсинов средних и малых размеров, продуктов ПОЛ в плазме крови и тем самым снижает токсическую нагрузку на фагоциты и иммунокомпетентные клетки, что

способствует сохранению иммунологической реактивности на субкомпенсированном уровне и уменьшает аутосенсibilизацию больных.

На модели, основных переносчиков ВНиСММ - эритроцитов, ранее изучено их влияние на мембранную дисфункцию, в частности, снижение деформабельности, повышение агрегации эритроцитов [194, 210]. Однако, кооперативные взаимосвязи между повышением уровней ВНиСММ и нарушением реологических свойств крови, процессов микроциркуляции и дисметаболическими процессами в клетках крови изучены недостаточно.

Проявлением перегрузки гликокаликса мембран клеток крови эндотоксинами ВНиСММ может быть развитие их осмотической хрупкости и гемолиза.

1.2 Особенности эритропоэза и иммунитета у онкобольных

Дисэритропоэз – один из возможных факторов, обеспечивающих опухоли возможность роста.

Состояние дисэритропоэза и его крайнее проявление - анемия, часто сопутствуют опухолевым заболеваниям и являются одним из факторов ухудшающих прогноз [2, 3, 14, 190, 211].

Изменения в системе крови при онкогенезе наиболее часто выражаются развитием анемии, которая сочетается с нейтрофильным или эозинофильным лейкоцитозом, тромбоцитозом или тромбоцитопенией [17, 36].

Рак ассоциированная анемия (РАА) является распространенным признаком, встречающимся у более чем 30% раковых пациентов при постановке диагноза до начала противоопухолевой терапии [190]. РАА оказывает существенное влияние на выживаемость, прогрессирование заболевания, эффективность лечения и качество жизни пациентов [211]. Она чаще выявляется у пациентов с запущенной стадией заболевания, где представляет собой специфический симптом опухолевого заболевания как следствие хронического воспаления. Ключевую

роль в этиопатогенезе РАА играют провоспалительные цитокины, такие как фактор некроза опухоли (ФНО- α), интерлейкин-1, -6 (ИЛ-1, -6), интерферон- γ (ИФН- γ) и другие, высвобождающиеся как опухолевыми, так и иммунными клетками [211]. Они способствуют изменениям в пролиферации эритроидных предшественников, продукции эритропоэтина (ЭПО), выживанию циркулирующих эритроцитов, баланса железа, окислительно-восстановительного статуса и энергетического обмена, которые могут привести к анемии.

Согласно данным литературы пациенты с раком легких и яичников имели самую высокую частоту (73,5 и 67,9% соответственно) и тяжесть РАА. Более того, уровень Hb обратно коррелирует с уровнями маркеров воспаления, гепсидина, ферритина, ЭПО, активных форм кислорода (АФК) [211].

В связи с выше изложенным, актуальным является поиск критериев для оценки раннего развития анемии у онкобольных. Такими чувствительными критериями могут быть изменения метаболических показателей эритроцитов. Эритроциты вовлекаются в патологический процесс и претерпевают изменения структуры и функции. Микроокружение клеток в периферическом русле оказывает различное влияние на биохимические системы, ответственные за сохранение целостности мембран эритроцитов, при этом усиливая или ослабляя их генетически детерминированную резистентность. От структурной организации мембран красных кровяных клеток во многом зависят их агрегационная активность и деформируемость, являющиеся важнейшими компонентами в микроциркуляции. Нарушения реологических свойств крови, микроциркуляции, приводит к развитию вторичной тканевой гипоксии [46]. Гипоксия – весомый фактор в патогенезе онкозаболевания, приводит к комплексной модификации функций биологических мембран, затрагивающей как липидный бислой, так и мембранные ферменты [46, 151, 168, 250], в частности, изучаемые нами. Состояние гликокаликса эритроцитов имеет важное значение в функционировании клеток и взаимосвязано с биохимическими особенностями их метаболизма.

Связанная с раком анемия может быть ассоциирована с иммунной супрессией [63], что повышает восприимчивость к инфекции и снижает противоопухолевую эффективность. Фактически метаболическое повреждение после гипоксии является причиной функционального дефицита лимфоцитов [37].

Интенсивность иммунного дефекта пропорциональна стадии рака [47] и количеству воспалительных цитокинов, в частности IL-6, и других белков острой фазы [75].

Авторы предлагают рассматривать нарушенные функции лимфоцитов как комплекс функциональных изменений, среди которых чрезвычайно важными являются иммуносупрессивное действие макрофагальных цитокинов и изменения энергетического обмена, которые способны вызывать состояние окислительного стресса сопряженного с дисметаболическими процессами в клетках крови.

1.3 Функциональные и метаболические нарушения в эритроцитах при опухолевом дисэритропоэзе

Образование красных кровяных клеток (эритроцитов) начинается с плюрипотентных стволовых клеток костного мозга [162]. Эти стволовые клетки претерпевают пролиферацию и дифференцировку в клетки, коммитированные предшественниками, а затем в прогрессивно созревающие предшественники и, наконец, зрелые эритроциты, лейкоциты и тромбоциты.

Недавние протеомные исследования показывают, что Hb составляет от 95 до 97% цитозольного белка эритроцитов. Большинство других цитозольных белков участвуют в нейтрализации окислителей (пероксиредоксин 2, каталаза, супероксиддисмутаза и глутатионпероксидаза), а также в метаболизме глюкозы и синтезе АТФ (как анаэробный гликолиз, так и ПФП) [111, 139, 148, 162, 171]. Глюкоза является основным метаболическим субстратом [163] эритроцитов и метаболизируется двумя основными путями: гликолитическим или

«производящим энергию» путем и ПФП, или «защитным» путем. В нормальных условиях примерно 90% глюкозы проходит через гликолиз, а гораздо меньшая фракция проходит через ПФП [163]. Однако доля глюкозы, вступающей в ПФП, может значительно увеличиваться в условиях повышенного окислительного стресса. Основными продуктами гликолиза являются АТФ - источник энергии для многочисленных мембранных переносчиков и метаболических реакций, НАДН - необходимый кофактор для восстановления метгемоглобина цитохромом b5-редуктазой [201] и 2,3-ДФГ - модулятор сродства гемоглобина к кислороду [130, 205]. Зрелые эритроциты не способны к синтезу пуринов или пиримидинов *de novo*, хотя многие ферменты метаболизма нуклеотидов присутствуют в эритроцитах [139]. В настоящее время известно, что последние важны для сохранения эритроцитов *in vitro*, также признано, что нарушения метаболизма пуринов и пиримидинов связаны с наследственной гемолитической болезнью.

Окислительно-восстановительные реакции гемоглобина, связанные как с эндогенным самоокислением гемоглобина, так и с экзогенными реактивными формами, которые проникают в эритроциты, являются источником образования АФК, которые могут повредить белок и фосфолипиды эритроцитов [225, 256]. Эти накопленные повреждения вызывают нарушение обмена веществ, которое усугубляет ситуацию, снижая способность клеток нейтрализовать токсичные соединения и восстанавливать окисленный гемоглобин. Следует отметить, что повышенная скорость образования АФК происходит в условиях гипоксии, когда повышенная фракция Нb связана с эритроцитарной мембраной [38, 209]. Это способствует повреждению мембранных белков и цитоскелета, регулирующего форму, деформируемость, и в конечном итоге распознавание для удаления макрофагами.

Связь между взаимодействиями гемоглобина с мембраной и окислительными процессами эритроцитов обеспечивает уникальный способ специфического отключения окислительного стресса в эритроцитах. Потребности больших концентраций антиоксидантов для нейтрализации образующихся АФК, компенсируются ингибированием взаимодействия гемоглобина с мембраной. Эти

взаимодействия предотвращают окислительные процессы в эритроцитах, путем активации антиоксидантных ферментов и образованию большого количества антиоксидантов. Такой механизм снижения оксидативного стресса эритроцитов замедляет старение эритроцитов и ослабляет патологические эффекты, связанные с окислительным стрессом эритроцитов.

ПФП метаболизирует от 5 до 10% глюкозы, используемой эритроцитами, и это имеет решающее значение для защиты эритроцитов от окислительного повреждения [177]. В отличие от лимфоцитов, ПФП в эритроцитах является единственным источником восстановленного НАДФН, кофактора, важного для метаболизма глутатиона [177, 226, 237, 261]. Красные кровяные тельца содержат относительно высокие концентрации восстановленного глутатиона (GSH), сульфгидрилсодержащего трипептида (глутамилцистеинилглицина), который действует как внутриклеточный восстанавливающий агент, который защищает клетки от окислительного повреждения.

Плазма крови больных раком оказывает гемолитическое действие на эритроциты.

Осморезистентность обратно коррелирует с гемолизом эритроцитов.

Осмотическая хрупкость отражает способность клетки поглощать воду в гипотонической среде. Степень устойчивости эритроцитов к лизису в результате снижения концентрации NaCl в окружающей их среде является основой теста осмотической хрупкости. Осмотическая хрупкость широко используется для выяснения механизмов влияния различных факторов на осмотические свойства мембран эритроцитов, т.е. для оценки функции клеточной мембраны [12]. Тест на ОРЭ также полезен для диагностики некоторых гематологических заболеваний, например гемолитической анемии, наследственного сфероцитоза и эллиптоцитоза, дефицита глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и серповидно-клеточной анемии [29, 43, 83]. Низкое осмотическое сопротивление может приводить к внутрисосудистому гемолизу, что сокращает продолжительность жизни эритроцитов [34].

Этот тест – неспецифический метод оценки компенсированности механизмов защиты от свободных радикалов. Процесс перекисного окисления ненасыщенных связей липидов мембран, вызванный пероксидным радикалом, приводит к хрупкости и лизису эритроцитов [194, 238].

Деформируемость эритроцитов жизненно важна для функции эритроцитов и играет важную роль в микроваскулярном кровотоке [12, 78]. Более жесткие эритроциты могут нарушить микроциркуляцию и доставку кислорода. При этом стратегии улучшения деформируемости эритроцитов могут устранить гемическую гипоксию с прямыми клиническими последствиями. Следует предположить, что существенное значение в патогенезе ОРЭ, а значит и других клеток крови, имеет изменение их метаболизма.

1.4 Иммунометаболизм. Метаболизм глюкозы и опухолевый иммунитет

Иммунометаболизм становится критической детерминантой патофизиологии рака [140, 232].

Иммунная система играет решающую роль в поддержании здоровья организма, не только путем защиты организма-хозяина от патогенных агентов, включая бактерии, грибки и вирусы, но также путем устранения старых, мутантных или мертвых клеток в организме [92, 165].

Иммунные клетки играют ключевую роль в прогрессировании и лечении рака [125, 169].

Лимфоциты, которые в основном состоят из Т-клеток, В-клеток и НК-клеток, являются ключевыми эффекторными клетками иммунной системы. Между тем, лимфоциты регулируют иммунную систему посредством активации, цитотоксичности и секреции цитокинов [125].

Т-клетки самые многочисленные и являются одними из важнейших клеток опухолевого иммунитета. На противоопухолевую активность Т-клеток большое

влияние оказывает клеточный метаболизм. Следовательно, в процессе развития опухоли метаболическое перепрограммирование клеток неизбежно влияет на противоопухолевую активность Т-клеток [180, 191]. Обычно анаэробный гликолиз является ключом к поддержанию иммунной функции Т-клеток [165]. Когда уровень глюкозы в крови в норме, Т-клетки активируют переносчик глюкозы 1, а затем способствуют захвату глюкозы и анаэробному гликолизу при стимуляции антигенами [161]. Ключевую роль в трансмембранных процессах имеет состояние плазматических мембран, которое определяет клеточный метаболизм и жизнеспособность.

Как упоминалось ранее, эффект Варбурга опухолевых клеток значительно увеличивает содержание лактата в микроокружении опухоли, провоспалительном агенте, который активирует путь IL-23 / IL-17, что приводит к воспалению, ангиогенезу и ремоделированию клеток. Между тем, увеличение содержания молочной кислоты в микроокружении опухоли приводит к снижению значения pH, а экспрессия аргиназы I в макрофагах увеличивается после подкисления микроокружения, таким образом, подавляя пролиферацию и активацию Т-клеток [191].

Epstein и др. (2014) обнаружили, что в нормоксических условиях гликолиз обеспечивает быструю потребность в энергии, в первую очередь для поддержки мембранной транспортной активности, которая усиливается при делении, росте и миграции клеток, в то время как медленное окислительное фосфорилирование (ОФ) митохондрий обеспечивает хроническую потребность в энергии в первую очередь для синтеза макромолекул. Установлено, что аэробный гликолиз необходим для опосредования защитных эффектов интерферона гамма (ИФН- γ) [141].

Т-клетки используют глюкозу для поддержания своих энергетических потребностей и синтеза биосинтетических предшественников.

Опухоли могут создавать микросреду, которая мешает метаболизму и эффекторным функциям Т-лимфоцитов, избегая иммунного контроля.

Нейтрофилы как часть иммунных клеток важны для обеспечения иммунной защиты организма. Однако при раке нейтрофилы могут нарушать функцию Т-клеток за счет АФК, тем самым способствуя прогрессированию опухоли [150].

Кроме того, переключение на гликолиз позволяет использовать промежуточные продукты гликолиза и ЦТК в качестве ключевых источников молекул углерода для биосинтеза нуклеотидов, аминокислот и липидов. Таким образом, гликолиз способствует устойчивому росту, быстрой клеточной пролиферации и производству большого количества эффекторных молекул, что в конечном итоге вызывает достаточный иммунный ответ.

Активированные лимфоциты поддерживают ОФ для производства АТФ, что увеличивает выживаемость и продолжительность жизни лимфоцитов и имеет важное значение для иммунной памяти. Т-клетки памяти также используют глюкозу и другие виды топлива для синтеза триглицеридов, которые затем используются в β -окислении [165].

Переключение метаболизма глюкозы генерирует АФК, которые стимулируют выработку воспалительных ферментов, цитокинов и хемокинов, таких как IL-6, хемоаттрактантный белок-1 моноцитов, TNF- α и индуцибельная NO-синтаза (iNOS). iNOS является важным метаболическим регулятором иммунного ответа, поскольку NO ингибирует ОФ и окислительный метаболизм, тем самым способствуя гликолитическому и провоспалительному фенотипу [165, 199].

Внеклеточный лактат напрямую увеличивает уровни АФК [187, 196] в нейтрофилах, васкулогенных стволовых клетках CD34 + и раковых клетках.

Регуляция метаболических процессов иммунных клеток зависит от транскрипционных факторов: Akt, mTOR, индуцируемого гипоксией фактора 1 α (HIF 1 α) и, в меньшей степени, SIRT [133, 195].

1.5 Патохимическая роль лактатдегидрогеназы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и аденозиндезаминазы при раке различных локализаций

Лактатдегидрогеназа (ЛДГ, L-лактат, НАД⁺ оксидоредуктаза, К.Ф. 1.1.1.27) представляет собой семейство, по крайней мере, из шести NAD + - зависимых изоферментов (LD1-LD5 и LD6 / LDH). Она признана одним из самых распространенных ферментов в природе. Ее считают ключевым ферментом гликолиза [146], также высоко консервативным непрямым регулятором гликолитического потока [137]. Принадлежит к классу оксидоредуктаз и характерна для завершающей стадии анаэробного гликолиза. ЛДГ катализирует обратимое превращение пирувата в лактат с сопутствующим окислением / восстановлением НАДН до НАД⁺ [248], необходимый для максимального гликолитического потока [137]. Активация ЛДГ - это упорядоченный последовательный процесс. Связыванию субстрата с ЛДГ предшествует образование бинарного комплекса ЛДГ / НАДН, в котором остатки His 195 и Asp 168, по-видимому, играют ключевую роль.

Активные изоформы ЛДГ (LDH_i) представляют собой гомо- или гетеротетрамерные комбинации двух субъединиц с молекулярной массой примерно 35000 Да каждый: А («М» - мышца) и В («Н» - сердце), кодируемые двумя отдельными генами, *ldha* и *ldhb*, расположенными на хромосомах 11p15.4 и 12p12.2- p12.1 соответственно [152]. Комбинации белков А и В в тетрамерные комплексы приводят к пяти изоформам B₄, A₁B₃, A₂B₂, A₃B₁ и A₄, названным от LD1 до LD5 или от LDH1 до LDH5, соответственно [248]. Третий тип субъединицы ЛДГ, известный как С, кодируется геном *ldhc* (или *ldhx*), расположенным на хромосоме 11p15.5-p15.3, и структурно относительно гомологичен субъединицам А (75,3% идентичности) и В (69,8%) [152]. Субъединица С собирается только в гомотетрамеры и, как было установлено, специфична для сперматозоидов и семенников [248]. Интересно, что широкое

распространение альтернативного сплайсинга гена *ldhc* наблюдалось также при раке человека, с высокой частотой при раке легкого, меланоме и раке груди, но никогда в здоровых контрольных тканях [248].

Хотя все изоформы катализируют одну и ту же биохимическую реакцию, они различаются по молекулярной структуре, сродству к субстрату, температурной чувствительности и тканевой специфичности [248].

Субъединица А предрасполагает изоформы ЛДГ к превращению пирувата в лактат, тогда как изоформы, в которых субъединица В преобладает кинетически, способствуют превращению лактата в пируват [152]. Созревающие ткани и ткани, которые претерпевают неопластическую трансформацию, характеризуются значительными изменениями изоферментограмм [248].

ЛДГ рекомендована в качестве общего маркера повреждения клеток или для помощи в идентификации типа поврежденных клеток [172, 233].

Уровень ЛДГ также используются для мониторинга цитотоксичности и жизнеспособности клеток в клеточных культурах [117, 144, 235].

Общепринято считать ЛДГ важным диагностическим показателем при инфаркте миокарда, заболеваниях печени, гемолитической анемии и различных типах миопатий [248]. С появлением исследований Варбурга об увеличении активности гликолиза в трансформированных клетках внимание исследователей сосредоточилось на прогностическом значении сывороточных уровней ЛДГ у онкологических больных. Однако более поздние исследования показали, что ЛДГ является неспецифическим диагностическим маркером рака [253]. Возникают трудности при попытке дифференцировать доброкачественные и злокачественные опухоли на основе общей активности ЛДГ. Однако в случаях рака крови или молочной железы предлагается определять общую активность ЛДГ как прогностический фактор [219].

Помимо уровней ЛДГ, исследуют также экспрессию мРНК с помощью ПЦР. Так, было обнаружено, что мРНК ЛДГА высоко экспрессируется при инвазивном раке и положительно коррелирует с ростом опухоли [183].

Кроме того, было продемонстрировано, что внеклеточный лактат, конечный продукт активности ЛДГ, может быть использован для оценки пролиферации и активации Т-клеток человека [156].

Значение общей активности ЛДГ - маркер при принятии решений о терапевтическом ведении пациентов с раком яичка [197, 253]. Низкая активность тканевой ЛДГ связана с высокой вероятностью полной ремиссии заболевания и хорошим прогнозом [248].

Повышенная общая активность ЛДГ наблюдается в большинстве опухолевых тканей или даже в предраковых поражениях [248]. В тоже время, общая активность ЛДГ существенно не изменяется, например, при раке легких или желудка [248]. Было высказано предположение, что на повышение активности ЛДГ влияет наличие некротических процессов в опухолевой ткани [248]. С другой стороны, известно, что раковые ткани по сравнению с нормальными тканями характеризуются наличием гораздо большего количества компонентов соединительной ткани, что, по мнению некоторых авторов, может быть причиной ложно заниженных результатов [248].

Авторами было обнаружено, что ЛДГ, наряду с количеством лимфоцитов, стадией, ответом на терапию первой линии являются прогностическими для общей выживаемости и выживаемости без прогрессирования НМРЛ [218].

Повышенный уровень ЛДГ является негативным прогностическим биомаркером потому, что он позволяет опухолевым клеткам подавлять и уклоняться от иммунной системы, изменяя микроокружение опухоли, гиперпродукцией лактата. Экспрессия ЛДГ-А и лактата макрофагами в микроокружении опухоли является основным фактором Т-клеточной иммуносупрессии [146].

Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (Г6ФДГ; К.Ф. 1.1.1.49) - это фермент, который катализирует первую и лимитирующую стадию пентозофосфатного пути, превращая D- глюкозо-6-фосфат в 6-фосфоглюконо-δ-лактон и продуцирует восстановленную форму никотинамидадениндинуклеотидфосфата (НАДФН) [96,

177, 203, 204], который играет важную роль в защите клеток от окислительного стресса, регулируя уровни восстановленного глутатиона [96]. Г6ФДГ состоит из восьми мономеров (ABCD и EFGH), комбинация которых приводит к образованию изоформ фермента. Мономерная форма Г6ФДГ содержит 515 аминокислот и имеет молекулярную массу 59 кДа. Активная форма Г6ФДГ *in vivo* представляет собой димер, для стабильности которого требуется НАДФ [177, 203, 204]. Характеристики форм фермента, по международным стандартам, различаются на основе биохимических свойств, таких как кинетическая активность, электрофоретическая подвижность, константа Михаэлиса для его субстрата глюкозо-6-фосфата и кофактора НАДФ, способности использовать различные аналоги субстратов, термостабильность и оптимумы pH. Также, некоторые авторы отмечают, что Г6ФДГ делят на 5 классов, которые отличаются ферментативной активностью – от низкой к высокой [96]. Фермент имеет тиоловые группы, принадлежащие цистеину. В частности цис 13 цис 446 определяет активность ферментов, при их отсутствии Г6ФДГ обладает низкой активностью [96].

Большинство клеток имеют резервную систему других метаболических путей, которые могут генерировать необходимый внутриклеточный НАДФН, в то время, как в эритроцитах их нет. Следовательно, дефицит Г6ФДГ становится особенно смертельным для красных кровяных телец, где любой окислительный стресс приводит к гемолитической анемии. Ингибирование Г6ФДГ приводит к увеличению клеточных уровней АФК [152]. Накопление оксидантов в клетках с дефицитом фермента сопровождается окислением белков, в том числе и гемоглобина, компонентов фосфолипидов, что приводит к потере функции и гибели клеток [261].

Наблюдается широкий спектр клинических проявлений дефицита Г6ФДГ, включая фавизм, гемолитическую анемию, хроническую несфероцитарную гемолитическую анемию, самопроизвольный аборт и гипербилирубинемия новорожденных, приводящую к ядерной желтухе новорожденных, которая может быть фатальной [96].

Г6ФДГ повсеместно экспрессируется в тканях млекопитающих, с наибольшей экспрессией в иммунных клетках и семенниках [261]. Кроме того, часто повышается при многих типах рака человека [152].

Результаты исследований зарубежных авторов показывают, что репрессия гена в В-клетках, ограничивающая скорость фермента ПФП Г6ФДГ, может служить функцией привратника для защиты от злокачественной трансформации, в то время как более высокие уровни экспрессии Г6ФДГ связаны с более агрессивным течением заболевания при злокачественных новообразованиях В-клеток [261].

Используя генетические методы, исследователи показали, что линии раковых клеток, лишённые Г6ФДГ, имеют повышенные уровни НАДФ⁺, но, тем не менее способны пролиферировать и поддерживать пулы НАДФН посредством компенсаторного потока через Малик-фермент и / или изоцитратдегидрогеназу. Иммунные клетки, особенно Т-клетки, зависят от Г6ФДГ для поддержания уровней НАДФН и эффекторной функции [118].

Было показано, что нарушение гомеостаза НАДФН при ингибировании Г6ФДГ Т-клеток не влияло на первоначальную активацию или рост, но значительно подавляло продукцию провоспалительных цитокинов [152].

Известно, что нарушения в эритроцитах у пациентов с дефицитом Г6ФДГ чаще всего из-за более низких уровней фермента, чем из-за снижения каталитической функции. В отличие от Т-клеток, зрелые эритроциты лишены ядра и не могут экспрессировать новый белок. Таким образом, уровни Г6ФДГ постепенно теряются на протяжении жизни эритроцитов (~ 120 дней), при этом более старые эритроциты сохраняют <10% от своей исходной активности Г6ФДГ.

В исследовании [152], авторы предлагают использовать иммуногистохимический метод изучения экспрессии Г6ФДГ, а также определение активности фермента в сыворотке как прогностический маркер, который отрицательно коррелировал с иммунной активностью и мог использоваться для прогнозирования иммунотерапевтического ответа.

Раковые клетки демонстрируют более высокую экспрессию Г6ФДГ, чем нормальная ткань. Установлено, что онкогенные сигналы связаны с регуляцией активности ПФП через Г6ФДГ. Так, цитоплазматический опухолевый супрессор p53 напрямую взаимодействует с Г6ФДГ и ингибирует его активность, что приводит к снижению как активности ПФП, так и генерации НАДФН [202]. Интересно также отметить, что эпидермальный фактор роста и фактор роста тромбоцитов увеличивают активность Г6ФДГ. Таким образом, Г6ФДГ считают ключевым контроллером активности ПФП, регулируемым многими онкогенами, обеспечивающим преимущество раковых клеток в пролиферации и выживании.

Существует интересная эпидемиологическая гипотеза о том, что дефицит Г6ФДГ обратно коррелирует с заболеваемостью раком и смертностью. Недавно в масштабном когортном исследовании стран Африки к югу от Сахары было зарегистрировано значительное снижение риска колоректального рака среди лиц с дефицитом тканевой Г6ФДГ [96]. Эти эпидемиологические данные предоставляют важную информацию для терапевтической стратегии Г6ФДГ при раке человека.

Аденозиндезаминаза (АДА, (аденозинаминогидролаза К.Ф. 3.5.4.4)) – это катоболический фермент обмена пуринов, широко распространенный в тканях человека и животных. Впервые был описан Шмидтом в 1928 г.

Аденозиндезаминаза существует в различных молекулярных формах в тканях человека [102, 106, 136, 141, 215, 217]. Три формы фермента с молекулярным весом 36 000, 114 000 и 298 000 (а.е.м.). Кинетические характеристики трех растворимых молекулярных форм АДА идентичны, за исключением оптимального рН, который составляет 5,5 для промежуточных видов и 7,0-7,4 для крупных и малых форм. Аденозиндезаминазы несут основную ответственность за регуляцию уровня аденозина, хотя их роли не ограничиваются этой ферментативной функцией [136, 217, 261]. Недавно была определена структура АДА 2, выявившая поразительные различия между АДА 2 и АДА 1 как в расположении их каталитического центра, так и в их общей архитектуре [261].

АДА 2 содержит открытый каталитический центр, что объясняет, почему АДА 2 имеет в 100 раз меньшее значение K_m для дезаминирования аденозина по сравнению с АДА 1 [261].

Интерес к функции АДА 1 был вызван открытием, что почти 15% наследственных иммунодефицитов вызваны мутациями и потерей функции в гене АДА 1 [94, 105, 158, 207]. Эти расстройства общеизвестны как тяжелый комбинированный иммунодефицит (ТКИД), который связан с уменьшением количества циркулирующих Т- и В-клеток из-за внутриклеточного накопления токсичных уровней аденозина, вызывающих апоптоз [94, 158, 200]. Исследования, посвященные роли второй изоформы АДА тормозятся из-за низкого содержания этого фермента в тканях человека. После расшифровки структуры АДА 2 было обнаружено, что кодирующий ее ген (CECR1), принадлежит новому семейству факторов роста аденозиндезаминазы (ADGF). Иммунные расстройства, такие как системная красная волчанка, туберкулез и ВИЧ-инфекция сопровождаются резким увеличением активности АДА 2, а уровень АДА 2 в плевральной жидкости используется в качестве маркера туберкулеза [142, 143, 214]. Кроме того, концентрация АДА 2 в сыворотке коррелирует с прогрессированием роста опухоли, что определяет АДА 2 как удобный биомаркер для мониторинга лечения больных раком [215].

Аденозин образуется внутри- и внеклеточно путем деградации адениновых нуклеотидов. В нормальных физиологических условиях внутри- и внеклеточные уровни аденозина находятся в наномолярном диапазоне, но они повышаются до миллимолярных концентраций в стрессовых условиях, таких как гипоксия, ишемия и повреждение клеток. Внутриклеточно аденозин образуется преимущественно путем дефосфорилирования аденозинмонофосфата (АМФ), катализируемого внутриклеточной 5'-нуклеотидазой [119, 124, 176, 223, 247, 255]. Гидролиз s-аденозил-гомоцистеина также способствует внутриклеточному образованию аденозина [262]. Внутри клетки аденозин метаболизируется двумя ферментами-аденозинкиназой (АДК) и аденозиндезаминазой (АДА). АДК фосфорилирует аденозин до АМФ и имеет решающее значение для регуляции

внутриклеточных уровней аденозина и поддержания внутриклеточных уровней адениновых нуклеотидов. АДА катализирует необратимое превращение аденозина в инозин. Внутриклеточный гомеостаз аденозина поддерживается также двунаправленными эквilibрирующими нуклеозидными транспортерами (ЭНТ) в плазматической мембране за счет облегченной диффузии аденозина в направлении градиента концентрации [262].

Внутриклеточные уровни АТФ находятся в миллимолярном диапазоне, поэтому, когда клеточная мембрана повреждена или лизирована, внеклеточные уровни АТФ существенно повышаются. Внеклеточные адениновые нуклеотиды дефосфорилируются эктонуклеотидазами. Эктонуклеотидазы, такие как CD39, гидролизуют АТФ и АДФ до АМФ. ЭКТО-5' - нуклеотидаза (CD73) катализирует дефосфорилирование АМФ до аденозина [119, 247, 255]. Внеклеточный аденозин влияет на физиологические и патологические процессы в клетках-мишенях, передавая сигналы через четыре различных рецептора, включая ADORA1, ADORA2A, ADORA2B и ADORA3 [262]. Все четыре рецептора связаны с G-белком, и каждый из них имеет определенное сродство к аденозину и различное распределение в клетках и тканях. ADORA1 и ADORA3 связаны с ингибирующим G-белком (G_i), который ингибирует аденилатциклазу, что приводит к снижению уровня циклического АМФ [132, 255]. Пара ADORA2A и ADORA2B связана со стимулирующим G-белком (G_s), который активирует аденилатциклазу, что приводит к повышению уровня цАМФ [132, 149]. Таким образом, аденозин является сигнальным нуклеозидом [149], который вызывает множество физиологических и патологических эффектов, вовлекая мембранные рецепторы во многих клетках.

Признано, что аденозин отражает энергетический потенциал эритроцитов [224]. В работах Чжан и др. была раскрыта функциональная роль аденозиновой сигнализации в регуляции продукции 2,3-ДФГ, специфического для эритроидов метаболита, который индуцирует высвобождение O_2 из Нв. Было установлено, что аденозин непосредственно индуцирует уровни 2,3-ДФГ в зрелых мышинных эритроцитах.

Аденозин-опосредованная индукция 2,3-ДФГ в нормальных эритроцитах человека связана с ADORA2B-опосредованной активацией ПК А [134, 241, 255].

Повышенный уровень аденозина играет важную роль при серповидно-клеточной анемии (СКА). Применение АДА для лечения СКА использовалось для успешного снижения аденозина, при этом также наблюдалось снижение процента серповидных эритроцитов и ретикулоцитов, внутрисосудистого гемолиза. Повышенный уровень аденозина не только лежит в основе серповидности, вызванной гипоксией-реоксигенацией, но и способствует гипоксии-реоксигенации-индуцированному воспалению легких.

В целом, аденозин считают противовоспалительной молекулой, в отличие от АТФ [155]. Аденозин, например, подавляет адгезию к эндотелиальным клеткам, снижает продукцию супероксид-анионов нейтрофилами, и снижает выброс провоспалительных цитокинов [263]. Кроме того, аденозин способствует высвобождению противовоспалительного цитокина IL-10 из моноцитов [263]. Аденозин также вызывает выработку фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), мощный индуктор ангиогенеза и проницаемости сосудов за счет связывания с рецепторами A2 [151, 154, 263].

Роль аденозина в регуляции активации макрофагов указывает на то, что эта молекула, путем активации рецепторов A2A, A2B и A3, подавляет выработку нескольких провоспалительных медиаторов, таких как TNF- α , IL-6, IL-12, оксида азота (NO) и макрофагального воспалительного белка (MIP) -1 α макрофагами [263]. В параллели, внеклеточный аденозин способствует высвобождению противовоспалительного цитокина IL-10 за счет моноцитов и макрофагов через рецепторы A2A и A2B, оказывающие противовоспалительный эффект. Более того, аденозин ингибирует дифференцировку Th1 и Th2, уменьшая пролиферацию Т-клеток и продукцию ИЛ-2 [263]. Следовательно, пуринергическая передача сигналов представляет собой результат активности гетерогенного комплекса «молекулярного механизма», содержащего молекулы нуклеотид / нуклеозид, рецепторы плазматической мембраны P1, P2 и разлагающие нуклеотиды ферменты, такие как CD39 и CD73,

взаимодействующие в воспалительном микроокружении и защите тканей, особенно от иммуноопосредованного чрезмерного повреждения тканей.

Микросреда опухоли характеризуется необычно высокими концентрациями АТФ и аденозина [109, 113, 170, 213]. Аденозин – это основной детерминант иммуносупрессивной опухолевой среды [109]. В этом смысле доклинические данные показывают, что нацеленный на аденозин-генерирующий путь (CD73) или аденозинергический рецептор (A2A) снимают иммуносупрессию и сильно подавляют рост опухоли [155]. В этом контексте у пациентов с раком легких наблюдалось снижение АДА. Увеличение экспрессии рецептора A1 в лимфоцитах, может способствовать проопухолевым эффектам аденозина, через цитокины, способствующие прогрессированию опухоли [98].

Таким образом, пуринаергическая и иммунная системы, состоящие в основном из рецепторов, сигнальных молекул, а также ферментов играют ключевую роль во многих патологиях и регулируют функции, особенно иммунной системы.

В данном исследовании параллельно с ВНиСММ, показателями метаболизма глюкозы и аденозина в клетках крови были исследованы ОРЭ, ССЭ. Учитывая, что развитие мембранной дисфункции клеток крови – универсальный механизм интоксикации избытком ВНиСММ, параллельно изучались показатели функционального состояния мембран лимфоцитов. В частности, особенности мембранной проницаемости лимфоцитов по интенсивности поглощения витального красителя.

Исследование описываемых ферментов проводилось с той или иной целью при раках различной локализации. Следовательно, они значимы для канцерогенеза. Однако остаются малочисленными их исследования непосредственно в клетках крови сопряженно с функциями этих клеток. Нами не обнаружено работ по интегративному исследованию данных показателей состояния мембраны, а затем и клеточной дисфункции эритроцитов и лимфоцитов крови. Следовательно, изучение данных показателей является

малоизученным направлением, может способствовать решению актуальных задач по выработке прогностических ранних маркеров анемии и лимфоцитарной дисфункции.

РАЗДЕЛ 2

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Общая характеристика больных и принципы формирования групп в исследовании

При исследовании особенностей метаболизма клеток крови у онкобольных были обследованы пациенты с раком желудка, кишечника, легких и группа контроля, которая состояла из людей, не имеющих хронических заболеваний, острых воспалительных состояний.

В настоящем исследовании были использованы сведения из историй болезни, амбулаторных карт 111 больных раком распространенных стадий и местно-распространенным процессом, различных локализаций (T1-2N0-1M0-1 и T3-4N0-2M0-1), поступивших в Донецкий областной противоопухолевый центр за период с 2009 по 2014 годы.

При определении стадии заболевания врачи онкологи руководствовались пятым изданием классификации TNM (1997), разработанным специальным комитетом Международного противоракового союза. Распределение больных в выделенные группы исследования и сам анализ полученных результатов проведен с учетом указанной классификации.

Отбор больных в исследование осуществлялся с соблюдением принципов рандомизированной выборочной совокупности. Все отобранные пациенты были детально ознакомлены с задачами исследования, программой лечебно-диагностических мероприятий и дали свое письменное информированное согласие на лечение.

Онкобольные были разделены на группы по локализации первичного злокачественного процесса, с поражением желудка – 33 пациента (30%), кишечника – 33 пациента (30%) и легкого – 45 пациентов (40%). По данным патоморфологического анализа послеоперационного материала преобладающий морфологический тип новообразования – аденокарцинома (60%): 96% АКК, 52%

АКЖ, 22% АКЛ и другие типы (40%). При РЛ преобладал немелкоклеточный рак, который выявлен у 25 пациентов (56%). В 40 % случаев больных с аденокарциномой опухоль высоко- и умереннодифференцирована (G1-2) и в 60% случаев низко- или недифференцирована (G3-4).

Анализ возрастного состава пациентов выявил, что средний возраст составил $60,5 \pm 8,3$ года, при этом наибольшее количество больных было представлено в возрастных группах 50-59 лет – 34 ($30,6 \pm 5,2$ %) и 60-69 лет – 39 ($35,1 \pm 5,3$ %), в то время как наименьшее количество больных было представлено в возрастной группе 40-49 лет - 18 ($16,2 \pm 1,3$ %) и 70-79 – 20 ($18,0 \pm 1,4$ %).

Наибольшее количество случаев рака установлено у мужчин – 73 (66%), у женщин – 38 случаев (34%) (рис. 2.1.). Таким образом, раком болели преимущественно мужчины (1,9:1). Наибольшая частота случаев заболеваемости наблюдалась после 60 лет.

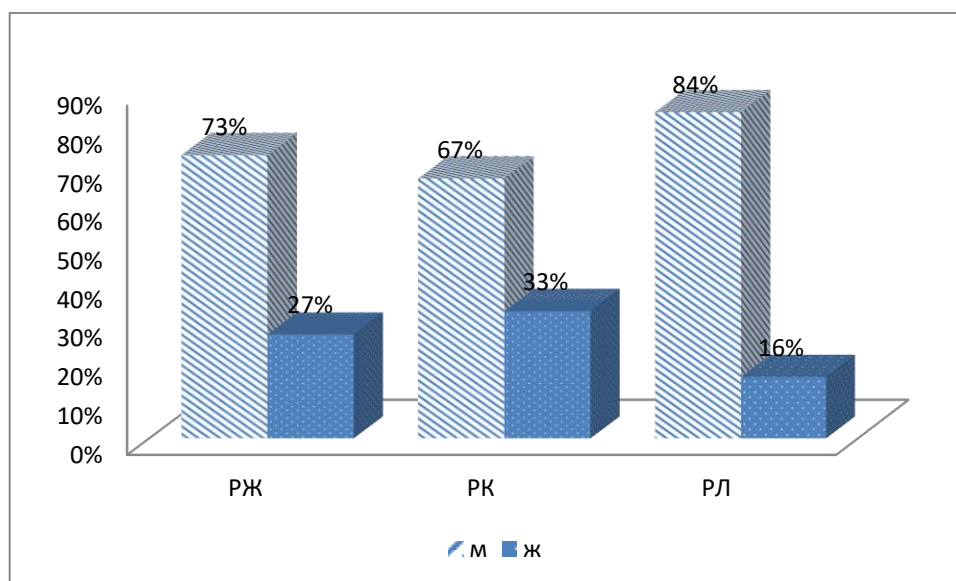


Рис. 2.1. Удельный вес (%) случаев РЖ, РК и РЛ в зависимости от пола

Согласно классификации злокачественных опухолей по системе TNM, среди исследуемых больных распространенность процесса соответствовала категориям T1-2N0-1M0-1 и T3-4N0-2M0-1. При изучении стадийности процесса большинство случаев приходилось на 3 – 44 больных ($51,4 \pm 5,7$ %) и 2 стадия – 28

пациентов ($25,2 \pm 2,3\%$). Наименее представленной была 1 стадия – 17 пациентов ($15,3 \pm 2,1\%$) и 4 стадия – 22 пациента ($19,8 \pm 2,6\%$).

Распределение процесса по критерию Т (размер первичного опухолевого узла) пациентов в исследуемых группах выявило, что наибольшее количество больных приходилось на Т3-4 – 72 больных ($61,3 \pm 5,6\%$), в то время как наименьшее на Т1-2 – 39 больных ($30,0 \pm 4,6\%$) (рис. 2.2).

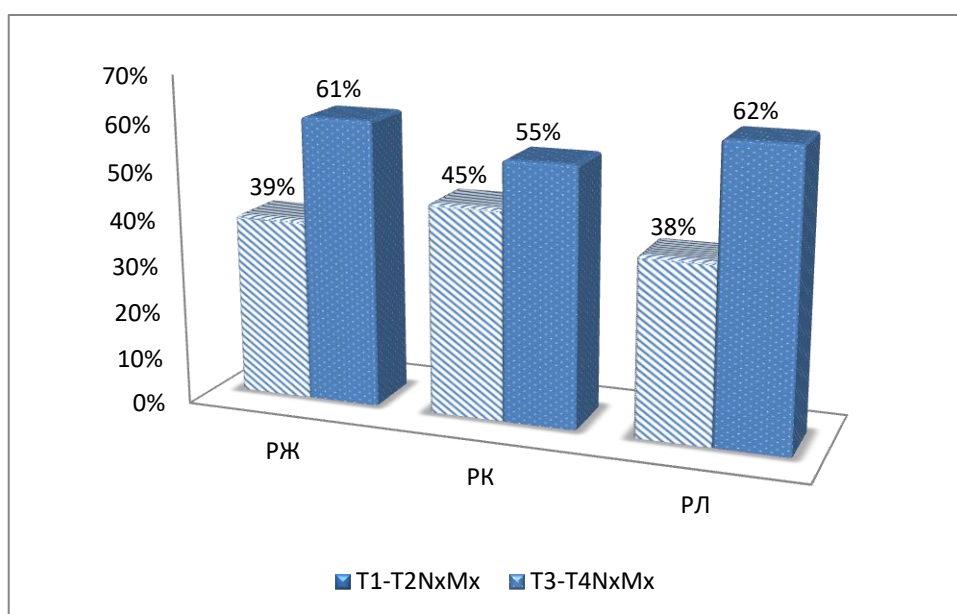


Рис. 2.2. Сравнительное распределение стадийности по критерию Т- при РЖ, РК и РЛ

В контрольной группе больных средний возраст составил $56,2 \pm 1,9$ года, при этом наибольшее количество больных было представлено в возрастных группах 50-59 лет – 10 ($22,7 \pm 6,3\%$) и 60-65 лет – 15 ($34,1 \pm 7,2\%$) наименьшее количество человек было представлено в возрастной группе 20-29 лет - 2 ($4,5 \pm 3,1\%$). Не выявлено статистически значимого различия распределения больных контрольной и исследуемой групп по возрасту (при сравнении по критерию χ^2 $p=0,75$).

В данной работе для изучения активности ферментов метаболизма углеводного и пуринового обменов были использованы эритроциты, лимфоциты и плазма крови 111 больных раком в возрасте от 40 до 79 лет.

Контрольную группу составили здоровые люди, в том числе с неосложненными паховыми грыжами (16 женщин и 36 мужчин) в возрасте от 20 до 79 лет.

Таблица 2.1

**Сведения о количестве обследованных в зависимости от пола и
возраста**

Диагноз	20-29		30-39		40-49		50-59		60-69		70-79	
	м	ж	м	ж	м	ж	м	ж	м	ж	м	ж
Контроль (n=52)	5	2	-	4	9	4	11	3	8	3	3	-
РЖ (n=33)	-	-	-	-	5	2	6	3	8	2	5	2
РК (n=33)	-	-	-	-	4	2	7	3	7	4	4	2
РЛ (n=45)	-	-	-	-	4	1	13	2	16	2	5	2
Всего	5	2	-	4	22	9	37	11	39	11	17	6

В контрольной группе для сравнительного изучения активности ферментов и функциональных показателей плазматических мембран клеток изучалась плазма крови, эритроциты и лимфоциты.

В пожилом возрасте в контрольной группе, как и в группах больных раком соответствующего возраста, присутствовала возрастная патология: гипертоническая болезнь, варикозная болезнь.

2.2 Методы подготовки материала для исследований

2.2.1 Лабораторные методы разделения цельной крови на фракции

Лимфоциты периферической крови выделяли в ступенчатом градиенте плотности фиколл – верографина [7].

Выделение основано на различной плотности форменных элементов крови. При центрифугировании в градиенте плотности фиколл – верографина, лимфоциты как более "легкие" клетки остаются на поверхности разделяющей жидкости, а эритроциты и гранулоциты оседают на дно пробирки. Для приготовления фиколл – верографиновой смеси используют 76% верографин, 6% фиколл в соотношении 1:67, плотность раствора 1,075 – 1,079.

Для выделения лимфоцитов берут кровь из локтевой вены в пробирку с 3,8% раствором цитрата натрия (соотношение кровь: цитрат соответственно 5:1) или с 5% ЭДТА (0,5 мл на каждые 5 мл крови).

Кровь, разведенная 0,9% NaCl, наслаивается на фикол-верографиновую смесь (плотность 1,077 г/мл), при этом носик пипетки прислонен к стенке пробирки на высоте 5—10 мм от мениска жидкости. После центрифугирования (15 мин при 800g) в пробирке находилось четыре слоя: 1-й верхний – плазма, разбавленная средой; 2-й лимфоциты и моноциты при обработке здоровых людей, лимфоциты, моноциты и бластные клетки – при обработке крови онкологических больных; 3-й – разделяющая жидкость; 4-й осадок эритроцитов и гранулоцитов. Верхний слой отсасывали пастеровской пипеткой и отбрасывали. Второй слой собирали пастеровской пипеткой в стеклянную коническую пробирку и промывали два раза физиологическим раствором.

Из крови можно получить почти чистую суспензию лимфоцитов. Для крови, обработанной ЭДТА, выход лимфоцитов составляет 98%, в то время как для неразведенной крови - 50-70%. Дальнейшие потери клеток происходят за счет последующих отмываний клеток. Дифференцированное распределение клеток в суспензии в процессе отмывания не изменяется.

Количество лимфоцитов в 10 мкл подсчитывается в камере Горяева.

Для определения активности фермента лимфоциты разрушаются двукратным замораживанием.

Нижний слой эритроцитов отмывается таким же образом. Далее гемолизируются дистиллированной водой в соотношении 1:150. 1мл такого гемолизата соответствуют 0,0066 млн эритроцитов.

Методика получения плазмы крови

Цельную кровь, набирают из локтевой вены в пробирку с 3,8% раствором цитрата натрия (соотношение кровь: цитрат равна 9: 1), центрифугируют при 1200g в течение 10 мин. Отбирают бестромбоцитарную плазму. Микроскопически контролируют полноту осаждения клеток крови [23].

Методика получения гемолизата эритроцитов и лизата лимфоцитов

Цельную кровь, набирают из локтевой вены в пробирку с 3,8% раствором цитрата натрия (соотношение кровь: цитрат равна 9: 1), центрифугируют при 1200g в течение 15 мин, удаляют надосадочную жидкость.

Эритроциты отмывают физиологическим раствором: трижды 1,5 мл эритроцитов доводят до объема 4,5 мл физиологическим раствором и центрифугируют в течение 10 мин. при 1200g. Отмытые таким образом эритроциты гемолизируют дистиллированной водой в соотношении 1:50. 1 мл такого гемолизата отвечает 0,02 млн. эритроцитов.

Методика получения лизата лимфоцитов заключается в разрушении выделенных лимфоцитов двукратным замораживанием [7].

2.2.2 Биохимические методы исследования

Определение белка по методу Лоури О.Н.

Принцип метода: метод Лоури О.Н. [188] основан на измерении интенсивности окрашивания раствора, в котором протекает цветная реакция на белок (реакция Фолина) с тирозиновыми и цистеиновыми радикалами белковой молекулы, которая основывается в восстановлении фосфорно-молибденовой и фосфорно-вольфрамовой кислот (реактив Фолина-Чикольте) с образованием комплексного соединения синего цвета.

Реактивы:

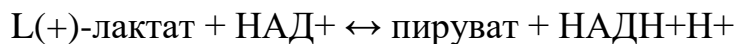
1. 2% раствор карбоната натрия в 0,01 н. растворе гидроксида натрия.
2. 0,5% раствор медного купороса в 1% растворе тартрате калия или натрия.
3. Щелочной раствор меди: смешивают 50 мл реагента 1 и 1мл реагента 2 (пригодный на протяжении двух суток).
4. Реактив Фолина-Чикольте.
5. Физиологический раствор.

Ход работы:

К 0,1 мл разведенной в 50 раз гемолизата эритроцитов добавляют 0,9 мл физиологического раствора, 2 мл смеси 3 и оставляют на 10 мин. После этого добавляют 0,2 мл реактива Фолина-Чикольте и оставляют на 30 мин. Фотоэлектроколориметрируют при длине волны 670 нм в кювете длиной 0,5 см. Все пробы тщательно перемешивают, избегая образования пены. Содержание белка в пробе определяют по калибровочному графику.

Методика определения активности лактатдегидрогеназы

ЛДГ(L-лактат:НАД Оксидоредуктаза, КФ 1.1.1.27) принадлежит к числу самых активных ферментов, которые осуществляют окислительно-восстановительные превращения. Она катализирует реакцию:



При значениях pH, близких к нейтральным, равновесие реакции сдвинуто в сторону образования молочной кислоты и НАД⁺.

Принцип метода: активность ЛДГ [39] оценивается по скорости окисления НАДН, которая регистрируется спектрофотометрически по снижению оптической плотности при длине волны 340 нм (можно использовать длину волны 366 нм).

Реактивы:

1. 0,5 М К-фосфатный буфер (pH 7,5), который содержит $3 \cdot 10^{-4}$ М пирувата натрия (готовят перед экспериментом, растворяя пируват натрия в К-фосфатном буфере);
2. $9 \cdot 10^{-3}$ М раствор НАДН (готовят непосредственно перед проведением спектрофотометрического анализа).

Ход определения: инкубационная среда содержит следующие компоненты:

- | | | |
|----|---|---------|
| 1. | Пируват натрия, растворенный в К-фосфатном буфере | 3,0мл |
| 2. | Гемолизат эритроцитов | 0,1 мл |
| 3. | Раствор НАДН+H ⁺ | 0,05 мл |

В кювету спектрофотометра (1см) наливают инкубационную среду, которая состоит из К-фосфатного буфера, содержит пируват, раствор НАДН. Потом вводят 0,1 мл раствора, который содержит фермент (сыворотка, гомогенат, гемолизат), быстро перемешивают и измеряют начальную величину оптической плотности (E₁). Регистрацию показаний спектрофотометра проводят с

интервалом 30 сек на протяжении 3 мин и подсчитывают среднее значение изменений оптической плотности пробы за 1 мин (ΔE).

Так как ЛДГ – очень активный фермент, поэтому было подобрано соответствующее разведение анализируемых образцов (в 50 раз дистиллированной водой). При этом руководствовались тем, что оптимальным разведением препарата является такое, при котором $\Delta E/\text{мин}$ при длине волны 340 нм составляет 0,04 – 0,08.

Активность ЛДГ рассчитывали по формуле:

$$A = \frac{\Delta E \times V}{6.22 \times a} \times 1000,$$

где ΔE – среднее значение изменений оптической плотности пробы при длине волны 340 нм за 1 мин;

V – конечный объем пробы в кювете (3,15 мл);

6,22 – коэффициент микромолярной экстинкции для НАДН+Н⁺ и НАДФН+Н⁺;

a – количество белка в пробе, определена в параллельно по методу Лоури, мг;

1000 – коэффициент перевода мкмоль в нмоль.

Удельную активность выражали в нмоль НАДН+Н⁺/мин на 1 мг белка, который содержится в пробе.

Методика определения активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы

Принцип метода основан на определении активности НАДФ-зависимых дегидрогеназ, путем измерения скорости восстановления НАДФ в инкубационной среде при насыщаемых концентрациях субстратов и кофакторов, оптимальном значении рН и оптимальной концентрации ферментативного белка. Изменения в содержании НАДФН₂ в исследуемых пробах регистрируется

увеличением оптической плотности раствора, которую измеряют на спектрофотометре при длине волны 366 нм [39, 96].

Реактивы:

- 1) 0,1 М MgCl_2 ;
- 2) 0,01 М буфер трис- HCl , pH 7,5;
- 3) 0,05 М глюкозо-6-фосфат (натриевая соль);
- 4) 0,025 М НАДФ.

Инкубационная среда:

- | | |
|-----------------------------|--------|
| 1) трис- HCl буфер | 1 мл |
| 2) MgCl_2 | 0,5 мл |

Инкубируют при 37°C.

- | | |
|--|--------|
| 3) гемолизат | 1 мл |
| 4) глюкозо-6-фосфат (натриевая соль pH 7,45) | 0,2 мл |
| 5) раствор НАДФ (опыт) | 0,3 мл |
| 6) дист. вода (контроль) | 0,3 мл |

В кювету спектрофотометра наливают буфер, MgCl_2 , субстрат, среду, в которой исследуют активность фермента, перемешивают и начинают реакцию добавлением НАДФ. Излучение оптической плотности раствора в ходе дегидрогеназной реакции в результате восстановления НАДФ регистрируют на протяжении 5 минут с интервалом в 1 минуту, записывают $\Delta E1 \times \text{мин}^{-1}$. Параллельно регистрируют изменение оптической плотности контроля, в который вместо НАДФ добавляют соответственный объем воды, и записывают $\Delta E2 \times \text{мин}^{-1}$. Контроль необходим для того, чтобы внести поправку на эндогенный субстрат.

Изменения оптической плотности раствора в ходе дегидрогеназной реакции за 1 минуту определяют как:

$$\Delta E \times \text{мин}^{-1} = \Delta E1 \times \text{мин}^{-1} - \Delta E2 \times \text{мин}^{-1}.$$

Расчет активности фермента проводят на основе коэффициента миллимолярного поглощения НАДФН₂, который равен 6,22 мМ x см⁻¹. В используемых нами кюветах длина прохождения светового пучка 1 см, объем среды 3 мл. Следовательно, при изменении оптической плотности ΔE изменение концентрации НАДФН₂ равняется ΔE/6,22 мкмоль НАДФН₂. Таким образом, активность фермента в нмолях НАДФН₂, который образовался за 1 минуту из расчета на 1 мг белка можно рассчитать по формуле:

$$A = 3 \Delta E \times 1000 / 6,22 \times a,$$

где а – содержание белка в исследуемой пробе, мг;

1000 – коэффициент пересчета мкмоль в нмоли.

Методика определение активности фермента метаболизма аденозина – аденозиндезаминазы

Аденозиндезаминаза (АДА; КФ 3.5.4.4) – это катоболический фермент обмена аденозина (дезоксаденозина), который катализирует гидролитическое дезаминирование в инозин (дезоксиинозин).

Принцип метода: определение основано на регистрации изменений оптической плотности реакционной смеси при длине волны 260 нм, обусловленных дезаминированием аденозина в инозин, которое регистрируется спектрофотометрически (водородная лампа) [251].

Реактивы:

1. 0,1 М Na-фосфатный буфер, рН 7,0;
2. 0,36x10⁻⁴ моля аденозина, растворенные в 0,1 М Na-фосфатный буфере.

Ход определения: инкубационная среда содержит следующие компоненты:

- | | |
|---|---------|
| 1. Аденозин, растворенный в Na-фосфатном буфере | 0,3 мл |
| 2. Na-фосфатный буфер | 2,7 мл |
| 3. Гемолизат эритроцитов | 0,01 мл |

или количество фермента в $2-4 \times 10^6$ клеток (лимфоцитов) 0,01 мл

В кювету спектрофотометра (1 см) наливают инкубационную среду, которая состоит из раствора аденозина и буфера, потом в исследуемую пробирку добавляют фермент. Измеряют начальную величину оптической плотности при длине волны 265 нм на водородной лампе, выставив ноль по контролю. Потом инкубируют пробу при 37°C на протяжении 10 мин и измеряют второй раз оптическую плотность.

Активность аденозиндезаминазы рассчитывают по формуле:

$$A = \frac{D_{265}}{a \times t \times 0,0149 \times 267,24 \times 0,01} \times 1000, \quad \text{где}$$

a – концентрация белка, мг на мл, или количество клеток;

t – время инкубации, 10 мин;

0,0149 – молекулярный коэффициент экстинкции аденозина;

267,24 – молекулярная масса аденозина;

0,01 – коэффициент перерасчета на 1 мл пробы;

1000 – коэффициент перерасчета условных единиц в нмоль/мин/мг.

Активность АДА выражали в нмолях превращенного субстрата за одну минуту в пересчете на 10^8 клеток или 1 мг белка.

Методика определения молярной концентрации аденозина

Для определения молярной концентрации аденозина за основу использовали известный метод М.Я. Малаховой [33] в нашей модификации. В основе метода лежит регистрация оптической плотности (238-300 нм) веществ в

надосадочной жидкости после осаждения крупномолекулярных веществ крови 15%-ТХУ. Принимая во внимание основные законы спектрометрии и максимум поглощения для аденозина (259 нм) в слабокислом растворе ТХУ, мы построили калибровочный график для дальнейшего определения молярной концентрации аденозина в пробе. Калибровочный график включал заданную концентрацию аденозина – от минимально возможной, до максимально возможной и экстинкции (поглощение света при соответствующей концентрации).

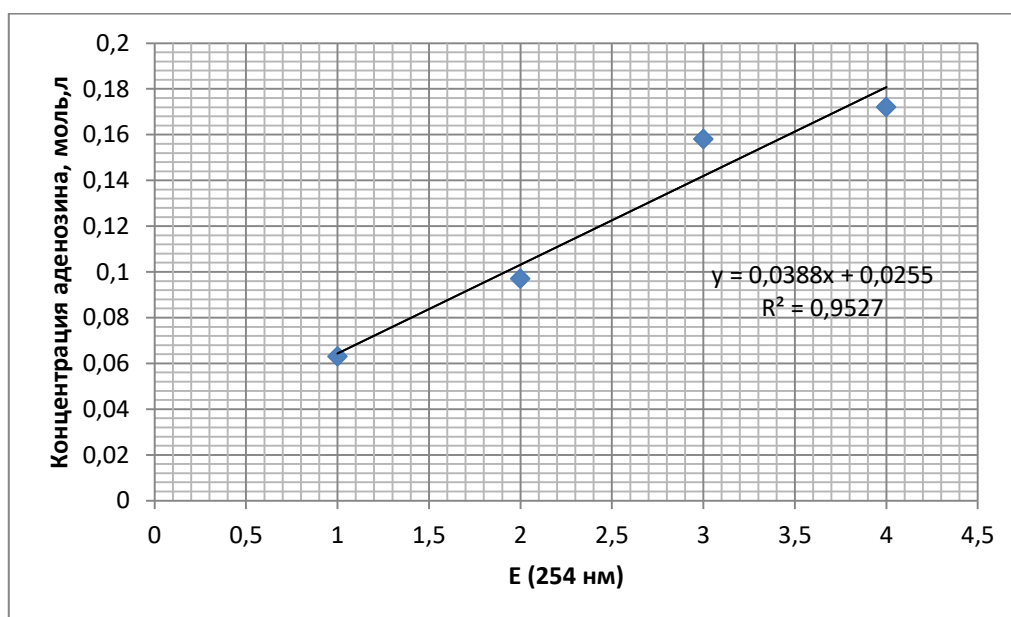


Рис. 2.3. Калибровочный график для определения молярной концентрации аденозина в слабокислом растворе ТХУ($\lambda=259$ нм)

2.2.3 Методы исследования стабильности мембран клеток крови

Методика определения осмотической резистентности эритроцитов

Осмотическую резистентность эритроцитов определяют по методу Лимбека [86]. Из матричного 1% раствора NaCl готовят ряд гипотонических растворов. На 2 мл гипотонического раствора берут 2 капли крови. Реакцию ведут в объеме 2 мл. Максимальная осмотическая резистентность определяется в той пробирке, в которой наступает полный гемолиз. Минимальная осмотическая резистентность

определяется после центрифугирования в пробирке со следами гемолиза (розовый оттенок плазмы над осадком эритроцитов). Амплитудой резистентности является интервал между минимальной и максимальной резистентностью.

Таблица 2.2

Схема методики определения осмотической резистентности эритроцитов

Пробирки	1	2	3	4	5	6	7	8	9
[р-ра NaCl]	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5	0,45	0,4	0,3	0,25
1% р-р NaCl в мл	1,8	1,6	1,4	1,2	1,0	0,9	0,8	0,6	0,5
Дист. Вода в мл	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	1,1	1,2	1,4	1,5
Кровь	По две капли								
Результаты									

Методика определения веществ низкой и средней молекулярной массы (ВНиСММ) спектрофотометрическим методом

Принцип метода. Спектрофотометрически исследуют уровень неосаждаемых компонентов в плазме крови, эритроцитах в зоне длин волн от 238 до 310 нм в слабокислой среде, что позволяет произвести комплексную оценку более 200 наименований веществ (оставшиеся в растворе после удаления крупномолекулярных белков) [19].

Реактивы:

1. Трихлоруксусная кислота (ТХУ) 15%.
2. Физиологический раствор (0,9% NaCl).

Ход определения. К 0,5 мл эритроцитарной массы, разбавленной 0,5 мл 0,9% NaCl, приливают 0,5 мл раствора ТХУ, перемешивают стеклянной палочкой. Центрифугируют при 3000 об/мин в течение 30 мин. К 0,5 мл центрифугата добавляют 4,5 мл дистиллированной воды, перемешивают, измеряют оптическую плотность на спектрофотометре в диапазоне длин волн от

238 до 310 нм в кювете с толщиной рабочего слоя 10 мм против холостой пробы (0,25 мл раствора ТХУ + 4,75 мл H₂O).

Уровень ВНиСММ выражают в виде коэффициента (K), полученного по формуле:

$$K = (\sum \varepsilon_n) \times \lambda,$$

где ε_n – сумма показателей экстинкции, а λ -шаг длины волны, нм. Коэффициент K выражается в условных единицах (y.e).

Методика определения жизнеспособности лимфоцитов, путем окрашивания витальным красителем – трипановым синим

Состояние плазматической мембраны или жизнеспособность клеток исследовали путем окрашивания витальным красителем и дальнейшим подсчетом окрашенных клеток под световым микроскопом в камере Горяева. Клетки, окрашенные, трипановым синим, считаются нежизнеспособными. Этот краситель не проникает через мембраны живых клеток, но при их повреждении способен окрашивать клеточное ядро [49].

Необходимые реагенты, материалы и оборудование:

Трипановый синий; фосфатно-солевой буфер; пробирки типа Eppendorf; стерильные наконечники; камера Горяева.

Ход эксперимента:

1. Приготовить 0,5%-ный раствор трипанового синего в буферном изотоническом солевом растворе, pH 7,2- 7,3 (т. е. фосфатно-солевой буфер).
2. Добавить 0,1 мл трипанового синего раствора к 1 мл клеток.
3. 10 мкл окрашенной клеточной суспензии нанести под покровное стекло и исследовать непосредственно под микроскопом при малом увеличении.
4. Посчитать количество окрашенных в синий цвет клеток и общее количество клеток.

Жизнеспособность клеток должна быть не менее 95% для здоровых культур лог-фазы.

$$\% \text{ жизнеспособных клеток} = [1,00 - (\text{Количество синих клеток} \div \text{Общее количество клеток})] \times 100$$

Чтобы вычислить количество жизнеспособных клеток на мл культуры, использовать формулу ниже. Следует учитывать коэффициент разбавления для корректировки результатов.

Подсчет окрашенных клеток проводили, используя формулу:

$$\text{Процент нежизнеспособных клеток} = \frac{\text{Среднее значение окрашенных клеток в пяти больших квадратах}}{\text{Среднее значение неокрашенных клеток в пяти больших квадратах}} * 100\%$$

Методика определения сорбционной способности эритроцитов

В основе способа лежат представления об эритроците как универсальном адсорбенте. Соединение 1 мл эритроцитарной массы с 3 мл 0,025 % раствора метиленового синего, приготовленного на физиологическом растворе, и инкубация в течение 10-12 минут при комнатной температуре способствуют сорбции красителя. ССЭ измеряют путем регистрации оптической плотности (630 нм) до и после 10 мин инкубации эритроцитов с 0,025% метиленовым синим. Установлено, что эритроциты здоровых людей поглощают до $37,12 \pm 1,43$ % красителя. При различных заболеваниях ССЭ увеличивается [65].

2.3 Статистическая обработка полученных результатов исследований

Статистическая обработка полученных результатов исследований проведена путем компьютерного анализа с привлечением лицензионных программ «Statistica 7.0» (StatSoft, USA) и пакета статистического анализа «MedStat».

При анализе данных клинических исследований для оценки генеральной совокупности используются выборочные характеристики. Для представления данных в работе использовались общепринятые характеристики: объем выборки, среднее значение или медиана, стандартная ошибка, ошибка медианы. Для проведения корректного статистического анализа полученных результатов использовались как параметрические (в случае, если данные подчиняются нормальному закону распределения), так и непараметрические критерии сравнения (в случае, если данные не подчиняются нормальному закону распределения). Для проверки распределения на нормальность использовался критерий W Шапиро-Уилка, что позволяет корректно проводить проверку и при небольших объемах выборки.

При проверке статистических гипотез выбор адекватного критерия сравнения проводился в соответствии с рекомендациями GCP, ICH "Статистические принципы клинических испытаний", критические значения рассчитывались на уровне значимости $p = 0,05$.

В работе проводилось сравнение средних значений двух выборок. Для сравнения независимых выборок, в случае нормального закона распределения использовался критерий Стьюдента, в случае отличного от нормального закона распределения использовался W-критерий Вилкоксона.

Для выявления статистически линейной связи между признаками использовались методы корреляционного анализа, рассчитывался показатель ранговой корреляции Спирмена. Для выявления значимости выявленной связи проводилось сравнение расчетного значения с соответствующим критическим значением на уровне значимости $p = 0,05$.

РАЗДЕЛ 3

ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ ОБМЕНА ГЛЮКОЗЫ И АДЕНОЗИНА В ЭРИТРОЦИТАХ, ЛИМФОЦИТАХ И ПЛАЗМЕ КРОВИ

Старение является биологическим процессом, который сопровождается морфофункциональными изменениями висцеральных и соматических органов, ухудшением условий их кровоснабжения, доставки кислорода и питательных веществ [6].

Возрастные изменения кровообращения сопровождаются нарушениями окислительно-восстановительных процессов, развитием тканевой гипоксии [22], увеличением активных форм кислорода, активацией процессов перекисного окисления белков и липидов, изменениями липидного и углеводного состава крови [6, 15, 22, 194].

Дисциркуляторные процессы могут быть обусловлены нарушениями газотранспортной функции эритроцитов. Известно, что в процессе старения морфофункциональные свойства эритроцитов изменяются [6]. Повышенную чувствительность метаболизма к изменениям среды микроокружения объясняют отсутствием ядра в этих клетках и неспособностью синтезировать новые белки. Важнейшая роль в поддержании функций эритроцитов принадлежит двум путям окисления глюкозо-6-фосфата – в гликолизе и ПФП. Гликолиз полностью обеспечивает потребность клетки в АТФ, 2,3-ДФГ и НАДН [194, 259]. ПФП генерируя НАДФН₂, участвует в глутатион зависимой системе антирадикальной защиты [96, 140, 194]. Таким образом, нарушения метаболизма глюкозы в эритроцитах могут приводить к ухудшению оксигенации тканей, способствуя развитию патологии при старении [116, 259].

Одной из задач исследования являлось также изучить активность ферментов обмена глюкозы и аденозина в организме условно здоровых лиц, не имевших онкопатологии, включенных в контрольную группу. Данные об

активности терминального фермента гликолиза – ЛДГ и регуляторного фермента ПФЦ – Г6ФДГ, в зависимости от пола и возраста представлены в таблице 3.1.

Согласно критерию ВОЗ (2017 г.) наши пациенты были сгруппированы в три возрастные группы: молодой возраст (20-44 года), зрелый возраст (45-59 лет) и пожилой возраст (60-74 года).

Достоверность различий средних значений оценивали с помощью Т-критерия, поскольку большинство данных подчинялись нормальному закону распределения.

Таблица 3.1

Активность исследуемых ферментов в эритроцитах здоровых людей в зависимости от пола и возраста, нмоль/мин·мг

Молодой возраст (20-44), лет		Зрелый возраст (45-59), лет		Пожилой возраст (60-74), года	
м (n=10)	ж (n=8)	м (n=15)	ж (n=5)	м (n=11)	ж (n=3)
ЛДГ					
2,5±0,12	2,48±0,10, T=0,55, p=0,586	2,70±0,01	2,68±0,02 T=0,33, p>0,05	2,51±0,03	2,55±0,10, T=0,08, p>0,05
Г6ФДГ					
0,11±0,01	0,13±0,01, T=1,27, p=0,213	0,16±0,03	0,18±0,03 T=2,00, p>0,05	0,13±0,05	0,05±0,01*, T=3,74, p=0,010
АДА					
14,7±1,8	15,06±1,5 T=0,44, p>0,05	12,2±1,2	14,0±1,3 T=0,35, p>0,05	8,73±1,2	8,5±1,3 T=0,10, p>0,05

Примечание:

p - показывает достоверность отличий между женским и мужским полом в каждой возрастной группе.

Анализируя гендерные различия для активности изучаемых ферментов эритроцитов, достоверных отличий в зависимости от пола в каждой возрастной группе не выявлено, кроме активности Г6ФДГ в группе пожилого возраста (таблица 3.1). Так, анализируя активность ЛДГ в зависимости от пола во всех

возрастных группах, установили, что ни в одной из них отличия не были достоверными: в молодом возрасте ($T=0,55$, $p=0,586$), в зрелом ($T=0,33$, $p>0,05$) и пожилом ($T=0,08$, $p>0,05$). Отсутствие зависимости по гендерному признаку были подтверждены результатами корреляционного анализа ($R=-0,369$, $p=0,062$).

Половые различия в активности эритроцитарной Г6ФДГ имели особенности. Было установлено, что в молодом и зрелом возрасте здоровых людей отличий по полу не выявлено ($T=1,27$, $p=0,213$ и $T=2,00$, $p>0,05$). В то время как в пожилой возрастной группе у лиц женского пола активность Г6ФДГ была достоверно ниже чем у лиц мужского пола в 3 раза ($T=3,74$, $p=0,010$). Корреляционный анализ показал отсутствие связи активности Г6ФДГ эритроцитов от пола ($R=-0,05$, $p=0,78$). Поскольку эти данные не достоверны, то могут не учитываться. Возможно, они обусловлены малым объемом выборки.

Таким образом, гендерные отличия не имеют существенного влияния на активность ферментов углеводного обмена в эритроцитах здоровых людей. Согласно литературным данным, характерным для стареющего организма является снижение интенсивности гемопоэза [131]. Также отмечается снижение количества эритроцитов и содержание гемоглобина, изменение периода их жизни и стойкости при старении.

Во время исследования эритроцитарной активности АДА не было выявлено значимых отличий в зависимости от пола во всех возрастных группах (таблица 3.1). Достоверных отличий не было установлено как в молодом возрасте ($T=0,44$, $p>0,05$), так и в зрелом и пожилом ($T=0,35$, $p>0,05$ и $T=0,10$, $p>0,05$). Однако результаты корреляционного анализа показали отсутствие связи для активности АДА эритроцитов от пола ($R=0,474$, $p=0,28$).

Результаты исследования активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ обмена глюкозы в лимфоцитах периферической крови в зависимости от пола показали недостоверные изменения в активности ЛДГ во всех возрастных группах (таблица 3.2).

Достоверность различий средних значений оценивали с помощью W-критерия, поскольку большинство данных не подчинялись нормальному закону распределения.

Таблица 3.2

Активность исследуемых ферментов в лимфоцитах крови здоровых людей в зависимости от пола и возраста, нмоль/мин·10⁶ клеток

Молодой возраст (20-44), лет		Зрелый возраст (45-59), лет		Пожилой возраст (60-74), года	
м (n=10)	ж (n=8)	м (n=15)	ж (n=5)	м (n=11)	ж (n=3)
ЛДГ					
0,23±0,03	0,32±0,04, W=308,5, p=0,070.	0,44±0,05	0,43±0,03, W=151,5, p=0,296.	0,52±0,04	0,50±0,02, W=31,0, p=0,240.
Г6ФДГ					
0,29±0,02	0,19±0,02, W=257,0, p=0,016.	0,22±0,02	0,23±0,03, W=69,0, p=1,000.	0,22±0,01	0,21±0,01, W=66, p=0,878.
АДА					
80,4±10,48	90,4±17,2 W=83,0, p=0,863.	82,7±7,6	85,45±9,45, W=18,5, p=0,476.	47,3±3,04	47,5±2,86 W=20,1, p>0,05

Примечание:

p - показывает достоверность отличий между женским и мужским полом в каждой возрастной группе.

В молодом возрасте активность ЛДГ лимфоцитов у лиц женского пола не отличалась от таковой мужского пола (W=308,5, p=0,070), аналогичная тенденция наблюдалась и в группах зрелого и пожилого возраста (W=151,5, p=0,296 и W=31,0, p=0,240).

Активность Г6ФДГ в лимфоцитах у лиц женского и мужского пола не отличалась в группах людей зрелого (W=69,0, p=1,000) и пожилого возраста (W=66, p=0,878), лишь в молодом возрасте активность лимфоцитарной Г6ФДГ у женщин была ниже чем у мужчин в 1,5 раза (W=257,0, p=0,016). Таким образом, активность ферментов углеводного обмена в лимфоцитах не зависят от пола после 45 лет.

Анализ активности фермента катаболизма аденозина в зависимости от гендерного фактора не показал значимых отличий (показатели статистической значимости различий представлены в таблице 3.2).

Результаты корреляционного анализа показали отсутствие связи между активностью изучаемых ферментов (ЛДГ, Г6ФДГ и АДА) в лимфоцитах и гендерным фактором. Для каждого фермента коэффициент корреляции Спирмена равен соответственно: $R=-0,50$ ($p=0,45$), $R=0,104$ ($p=0,58$), $R=-0,49$ ($p=0,14$).

Исследование изученных нами ферментов обмена глюкозы и аденозина проводили также в плазме крови здоровых людей в зависимости от возраста и пола (таблица 3.3).

Таблица 3.3

Активность исследуемых ферментов в плазме крови здоровых людей в зависимости от пола и возраста, нмоль/мин·мг

Молодой возраст (20-44), лет		Зрелый возраст (45-59), лет		Пожилой возраст (60-74), года	
м (n=10)	ж (n=8)	м (n=15)	ж (n=5)	м (n=11)	ж (n=3)
ЛДГ					
0,9±0,20	0,68±0,12 W=123,0, p=0,125.	1,84±0,10	1,6±0,2 W=80,0, p=0,220.	2,1±0,12	1,9±0,15 W=33,0, p=0,394.
Г6ФДГ					
0,08±0,02	0,10±0,01 W=32,0, p=0,310.	0,12±0,05	0,10±0,01 W=62,0, p=0,483.	0,17±0,005	0,15±0,01 W=15,0, p=0,171.
АДА					
1,85±0,15	1,9±0,16 W=198,0, p=0,152.	2,5±0,18	2,26±0,22 W=28,0, p=0,093.	1,6±0,17	1,6±0,23 W=26,0, p=0,841.

Примечание:

p - показывает достоверность отличий между женским и мужским полом в каждой возрастной группе.

Установлено, что значения активности всех изучаемых ферментов в плазме крови не отличались по гендерному признаку (таблица 3.3). Так, анализируя активность ЛДГ в зависимости от пола в трех возрастных группах, установили,

что ни в одной из них отличия не были достоверными: в молодом возрасте ($W=123,0$, $p=0,125$), в зрелом ($W=80,0$, $p=0,220$) и пожилом ($W=33,0$, $p=0,394$). Активность Г6ФДГ также не имела достоверных отличий по полу во всех возрастных группах: в молодом возрасте ($W=32,0$, $p=0,310$), в зрелом ($W=62,0$, $p=0,483$) и пожилом ($W=15,0$, $p=0,171$). Подобная тенденция наблюдалась и для активности АДА: в молодом возрасте ($W=198,0$, $p=0,152$), в зрелом ($W=28,0$, $p=0,093$) и пожилом ($W=26,0$, $p=0,841$).

Результаты корреляционного анализа показали отсутствие связи между активностью изучаемых ферментов (ЛДГ, Г6ФДГ и АДА) в плазме крови и гендерным фактором. Для каждого фермента коэффициент корреляции Спирмена равен соответственно: $R=-0,25$ ($p=0,17$), $R=0,004$ ($p=0,79$), $R=-0,008$ ($p=0,61$).

Таким образом, можно отметить, что активность исследуемых ферментов в плазме крови не зависели от пола.

Таким образом, снижение интенсивности реакций гликолиза и ПФЦ в эритроцитах у лиц пожилого возраста может влиять на изменения морфофункциональных свойств эритроцитов в процессе старения. В литературе отмечают снижение активности основных антиоксидантных ферментов в эритроцитах пожилых людей [194], что свидетельствует о нарушении антиоксидантной защиты в стареющем организме и интенсивности перекисных липидных структур.

Старение сердечно-сосудистой системы ассоциировано со старением системы крови, что проявляется возрастными изменениями морфофункциональных свойств эритроцитов в виде уменьшения их размеров, выростов на их поверхности для контакта с другими клетками, увеличение численности эритроцитов с эффектом «спущенного мяча» [6].

В целом, с возрастом наблюдается тенденция к снижению эритроцитарной активности Г6ФДГ и АДА, ферментов чувствительных к гипоксии и возросшим уровням АФК, обуславливающих биологическое старение.

Активность ферментов обмена глюкозы в эритроцитах имела возрастные особенности. Результаты корреляционного анализа показали существование

умеренной связи между активностью фермента гликолиза ЛДГ в эритроцитах от возраста: $R=0,634$ ($p=0,0006$). Для активности Г6ФДГ такая зависимость отсутствует: $R=0,27$ ($p=0,18$). Мы сопоставили их активность у лиц молодого возраста с данными по зрелому возрасту. Активность ЛДГ имела максимальные значения в зрелом возрасте ($2,69 \pm 0,02$ нмоль/мин·мг), по сравнению с группой молодого и пожилого возраста ($2,49 \pm 0,11$ нмоль/мин·мг и $2,54 \pm 0,06$ нмоль/мин·мг), которые не отличались между собой (рис. 3.1). Г6ФДГ эритроцитов имела однонаправленный характер изменений активности с возрастом, как и ЛДГ.

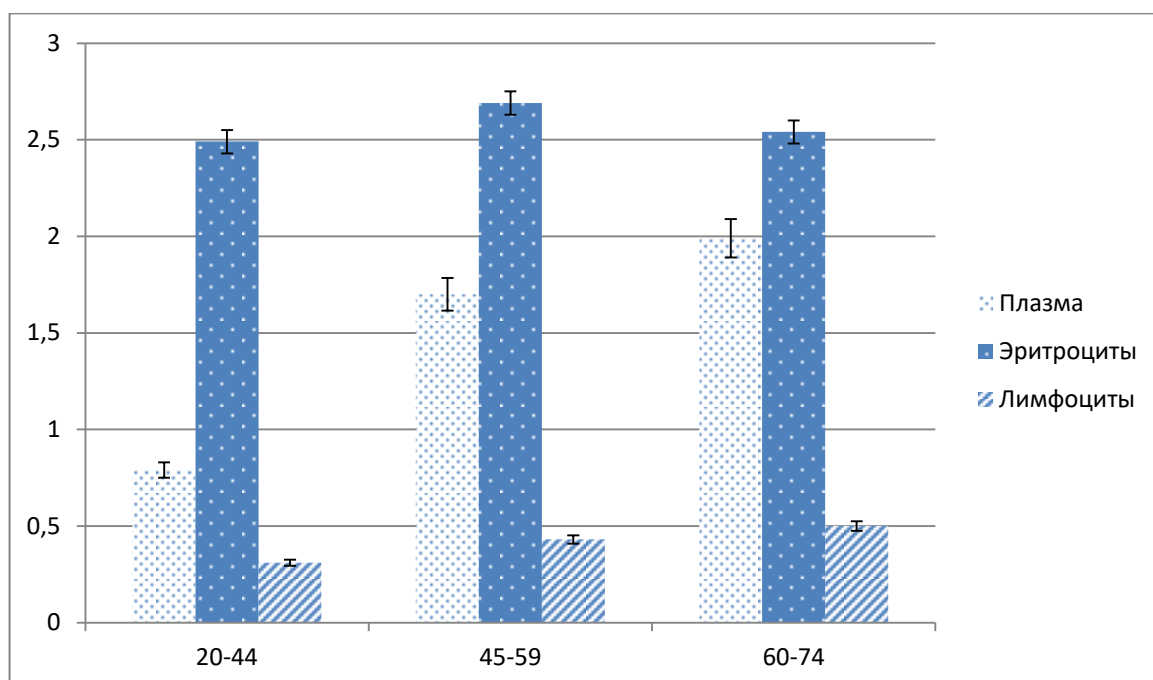


Рис. 3.1. Изменение активности ЛДГ в плазме, эритроцитах и лимфоцитах в разных возрастных группах, нмоль/мин·мг

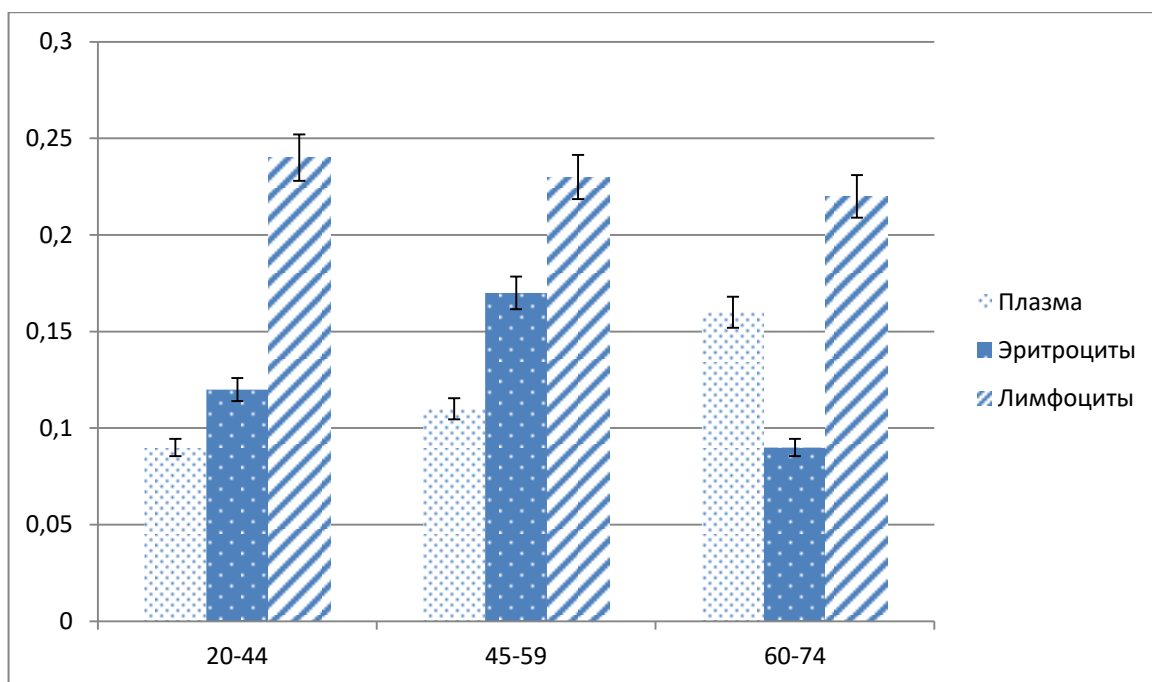


Рис. 3.2. Изменение активности Г6ФДГ в плазме, эритроцитах и лимфоцитах в разных возрастных группах, нмоль/мин·мг

У лиц зрелого возраста активность Г6ФДГ составила $0,17 \pm 0,03$ нмоль/мин·мг и была максимальной, по сравнению с другими возрастными группами – группой молодого ($0,12 \pm 0,01$ нмоль/мин·мг) и пожилого ($0,09 \pm 0,03$ нмоль/мин·мг) возраста. У людей пожилого возраста ее активность снижалась на 30%, по сравнению с группой зрелого возраста ($p < 0,05$). Сравнивая группы молодого и зрелого возраста, можно отметить повышение активности фермента на 35% ($p < 0,05$).

Снижение активности ЛДГ в эритроцитах у пожилых людей может свидетельствовать о снижении интенсивности энергозависимых процессов мембранного транспорта при старении. Известно, что снижение активности ЛДГ в эритроцитах ассоциируют с их старением [195, 259].

Повышение Г6ФДГ в зрелом возрасте свидетельствует об интенсификации работы ПФП окисления глюкозо-6-фосфата, повышении потребности клеток в НАДФН₂, необходимого для работы АОС эритроцита.

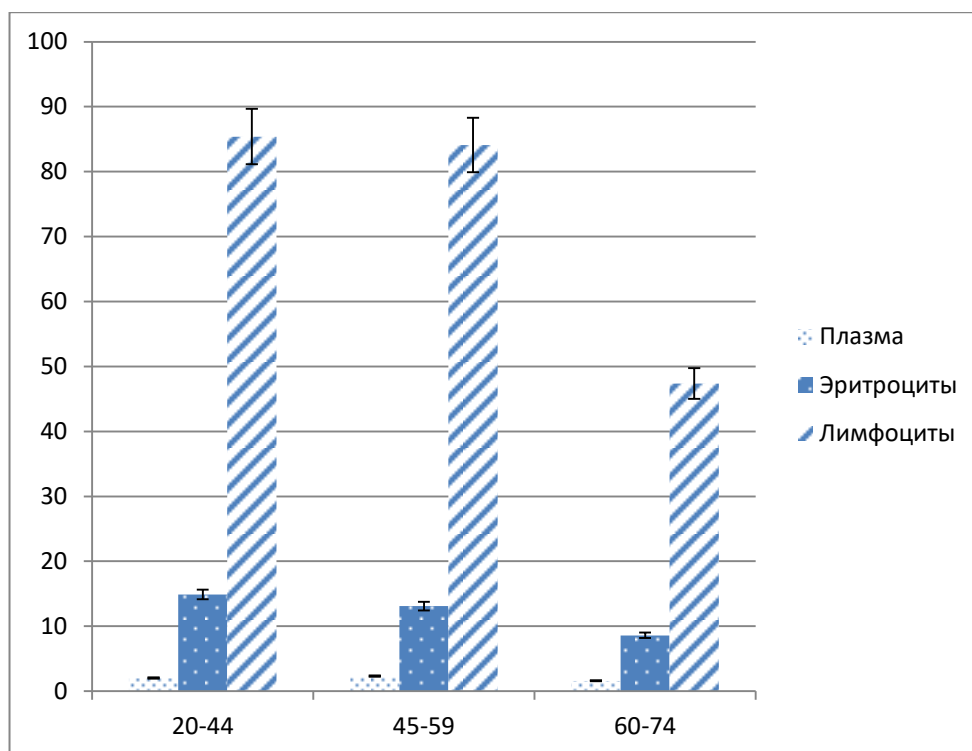


Рис. 3.3. Изменение активности АДА в плазме, эритроцитах и лимфоцитах в разных возрастных группах, нмоль/мин·мг

Активность АДА эритроцитов имела тенденцию к снижению после 45 лет (рис. 3.3).

У людей пожилого возраста активность АДА составила $8,6 \pm 1,2$ нмоль/мин·мг и была ниже в 1,4 раза ($p < 0,05$) по сравнению с группой зрелого возраста ($13,0 \pm 1,2$ нмоль/мин·мг) и в 1,7 раза ниже ($p < 0,05$) группы молодого возраста ($14,9 \pm 1,7$ нмоль/мин·мг). Возрастная зависимость активности АДА эритроцитов была подтверждена результатами корреляционного анализа. Была получена обратная зависимость высокой силы ($R = -0,932$, $p = 0,009$). Таким образом, с возрастом происходит угнетение катаболизма аденозина, что влияет на баланс соотношения АТФ/АМФ в эритроцитах.

С возрастом, в частности в пожилом и старческом возрасте, происходит естественное угасание всех функций организма, в том числе иммунитета.

Некоторые функции лимфоцитов, такие как рост клонов, продуцирование антител, сильно зависят от внутри- и внеклеточного и оксидант/антиоксидантного статуса. Иммунные клетки, в том числе лимфоциты

хорошо известны как важный источник оксидантов, так и провоспалительных соединений, необходимых для поддержки их функций. Такие процессы как активация, пролиферация, сигнальные пути, продуцирование антител и апоптоз, характерные для нормальной жизнедеятельности В- и Т-клеток, зависят от генерации АФК [208].

Высокой информативностью для исследования метаболизма лимфоцитов, основного структурно-функционального элемента иммунной системы, обладают окислительно-восстановительные ферменты, в т.ч. обмена глюкозы, используемой в качестве первичного источника топлива [161].

Возрастная динамика активности ЛДГ показала увеличение активности анаэробной реакции в лимфоцитах с возрастом (рис. 3.1). Так, в группе людей зрелого ($0,44 \pm 0,04$ нмоль/мин $\cdot 10^6$ клеток) и пожилого ($0,51 \pm 0,03$ нмоль/мин $\cdot 10^6$ клеток) возраста в лимфоцитах периферической крови повышена активность ЛДГ в среднем в 1,5 и 1,8 раза ($p < 0,05$) по сравнению с группой молодого возраста ($0,28 \pm 0,04$ нмоль/мин $\cdot 10^6$ клеток).

Средние значения активности Г6ФДГ лимфоцитов достоверно не изменялись с возрастом (рис. 3.2). Активность Г6ФДГ в молодом и зрелом возрасте составила $0,24 \pm 0,02$ нмоль/мин $\cdot 10^6$ клеток и $0,23 \pm 0,03$ нмоль/мин $\cdot 10^6$ клеток, в пожилом возрасте – $0,22 \pm 0,01$ нмоль/мин $\cdot 10^6$ клеток. В тоже время результат корреляционного анализа подтвердил отсутствие влияния фактора возраста на активность Г6ФДГ ($R = -0,39$, $p = 0,16$) и ЛДГ лимфоцитов ($R = 0,19$, $p = 0,45$).

Учитывая тот факт, что с возрастом повышается уровень глюкозы в крови, то повышение анаэробной реакции гликолиза может свидетельствовать об увеличении оттока глюкозо-6-фосфата на реакции энергетического обмена. При этом отсутствие возрастных изменений активности Г6ФДГ в лимфоцитах периферической крови характеризует постоянство реакций пластического обмена, зависящих от продуктов пентозофосфатного цикла.

Возрастная динамика активности фермента обмена аденозина отражает его снижение после 60 лет (рис. 3.3). В молодом и зрелом возрасте активность АДА

лимфоцитов не отличалась и составила соответственно $85,4 \pm 13,8$ нмоль/мин $\cdot 10^6$ клеток и $84,1 \pm 8,5$ нмоль/мин $\cdot 10^6$ клеток. У лиц пожилого возраста активность АДА лимфоцитов составила $47,4 \pm 2,95$ нмоль/мин $\cdot 10^6$ клеток, что на 49% ниже, чем у лиц зрелого возраста. В тоже время корреляционной зависимости между активностью АДА и возрастом небыло установлено ($R = -0,08$, $p = 0,83$).

Изменения активности ферментов в плазме крови зависят от возраста. Так, активность ЛДГ с возрастом росла: в молодом и зрелом возрасте составила $0,79 \pm 0,16$ нмоль/мин \cdot мг и $1,70 \pm 0,12$ нмоль/мин \cdot мг и была максимально высокой у лиц пожилого возраста - $1,99 \pm 0,13$ нмоль/мин \cdot мг (рис. 3.1). Для активности Г6ФДГ также характерен пик активности в пожилом возрасте (рис. 3.2). Активность Г6ФДГ в молодом и зрелом возрасте достоверно не отличалась и составила $0,09 \pm 0,015$ нмоль/мин \cdot мг и $0,11 \pm 0,005$ нмоль/мин \cdot мг соответственно, а в пожилом возрасте была на 35% выше значения лиц зрелого возраста и составила - $0,16 \pm 0,009$ нмоль/мин \cdot мг. Активность АДА в плазме крови имела свои особенности. Активность фермента была максимально высокой у лиц зрелого возраста ($2,4 \pm 0,02$ нмоль/мин \cdot мг), а после 60 лет снижалась ($1,6 \pm 0,2$ нмоль/мин \cdot мг) и была на 33% ниже значения лиц зрелого возраста (рис. 3.3). В молодом возрасте активность фермента составила $1,9 \pm 0,16$ нмоль/мин \cdot мг, что не отличалось от значений активности в пожилом возрасте ($p > 0,05$) и ниже значения активности в зрелом возрасте ($p < 0,05$) на 26%. Результаты корреляционного анализа для исследуемых ферментов плазмы крови в зависимости от возраста показали наличие связи для ЛДГ ($R = 0,404$, $p = 0,002$), для Г6ФДГ ($R = -0,47$, $p = 0,001$) и для АДА ($R = 0,303$, $p = 0,004$).

Анализируя особенности активности изучаемых ферментов в клетках крови в зависимости от возраста, установлено однонаправленное снижение активности Г6ФДГ и АДА, как в эритроцитах, так и в лимфоцитах. Повышение активности внутриклеточных ферментов углеводного обмена в плазме крови с возрастом объясняется, как правило, нарушением целостности клеточных мембран, вероятно, обусловленных накоплением АФК.

Изменение активности изучаемых ферментов в эритроцитах, лимфоцитах и плазме крови имеет возрастной характер. Нами установлено, что наиболее выраженные ферментативные сдвиги в углеводном и нуклеотидном обменах в клетках крови проявляются после 60 лет – в возрастной группе 60-74 года. Для эритроцитов характерно однонаправленное снижение активности фермента ПФП окисления глюкозы и катаболизма аденозина, вероятно это связано с интенсификацией прооксидантных реакций и накоплении аденозина, регулирующего уровень 2,3-ДФГ. Для лимфоцитов характерно повышение скорости анаэробного гликолиза и снижение скорости катаболизма аденозина. Повышенный уровень аденозина, как известно, коррелирует с дисфункцией Т- и В-лимфоцитов. Высокие показатели гликолиза в лимфоцитах характеризуют нарушение митохондриальных процессов энергообразования. Соответственно реакции пластического обмена, репарации испытывают дефицит энергии. Полагаем, что изменение активности ключевых ферментов ПФП окисления глюкозы и катаболизма пуриновых нуклеотидов с возрастом отражает функциональную способность клеток крови при старении.

Активность ферментов углеводного и нуклеотидного обменов в плазме крови была максимально высокой у лиц зрелого возраста (45-59 лет). В плазме крови повышалась активность всех изученных ферментов – гликолиза, ПФП и катаболизма аденозина.

Согласно полученным экспериментальным данным, гендерный показатель не является фактором, определяющим активность изучаемых ферментов, поэтому для дальнейших исследований учитываться не будет.

Полученные результаты были опубликованы в следующих работах:

1. 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.
2. Вікові особливості обміну червонокрівців, що можуть привести до порушень їх

функції / Я.Г. Жебеленко, К.А. Миронова, С.А. Зуйков, К.В. Муравська //Програма та матеріали 71 Міжнародної конференції молодих вчених «Актуальні проблеми клінічної, експериментальної, профілактичної медицини, стоматології та фармації» (23-24.04.2009). – Донецьк, 2009. – С. 22-23.

РАЗДЕЛ 4

ПОКАЗАТЕЛИ ДЕЗОРГАНИЗАЦИИ МЕМБРАН КЛЕТОК КРОВИ ПРИ РАКЕ РАЗЛИЧНЫХ ЛОКАЛИЗАЦИЙ

4.1 Исследование содержания веществ низкой и средней молекулярной массы (ВНиСММ) эритроцитов и плазмы крови в норме и при раке

Изменение свойств плазматических мембран отражает первичные процессы повреждения в клетке, что приводит к нарушению внутриклеточного гомеостаза. Опухоль является источником веществ, которые в избытке оказывают отрицательное влияние на морфо-функциональные характеристики клеток крови в организме опухоли носителя. Считаем целесообразным изучение функциональных свойств плазматических мембран эритроцитов и лимфоцитов в условиях опухолевой интоксикации у больных РЛ, РЖ и РК.

Вещества низкой и средней молекулярной массы (ВНиСММ) – гетерогенная группа веществ, характеризующая состояние эндогенной интоксикации. При канцерогенезе следует ожидать повышение уровня этих веществ. Принимая во внимание, что ВНиСММ способны распределяться между плазмой и сорбироваться на гликокаликсе мембран эритроцитов, лимфоцитов, считаем информативным изучение уровней ВНиСММ не только в плазме, но и в эритроцитах крови больных раком. Поскольку уровень ВНиСММ в эритроцитах отражает функциональное состояние гликокаликса этих клеток.

Таблица 4.1

Содержание ВНиСММ (К, у.е.) на мембране эритроцитов и в плазме крови при раке, (Медиана \pm m (95%ДИ))

	Контроль (n=30)	РЛ (n=35)	РЖ (n=35)	РК (n=35)
Кэ	12,9 \pm 0,7 (95% ДИ 9,54-13,65)	20,1 \pm 3,1 (95% ДИ 14,4-30,1) p=0,002	21,6 \pm 1,7 (95% ДИ 18,34-27,87) p<0,001	20,5 \pm 1,8 (95% ДИ 16,34-27,3) p<0,001
Кпл	9,1 \pm 0,5 (95% ДИ 7,43-10,5)	12,1 \pm 1,5 (95% ДИ 4,63-14,28) p=0,035	17,1 \pm 1,9 (95% ДИ 10,4- 19,2) p<0,001	16,1 \pm 1,6 (95% ДИ 10,2- 18,4) p<0,001
К=Кпл/ Кэ	0,71 \pm 0,03	0,59 \pm 0,06	0,81 \pm 0,05	0,79 \pm 0,04

Выявлено повышение уровня ВНиСММ (К) как в эритроцитах, так и в плазме крови при раке различных локализаций (таблица 4.1). 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, что по данным литературы, характеризует перегрузку гликокаликса эритроцитов [33, 56, 64]. В плазме крови при РЛ на 140% (p<0,001), РЖ на 195% (p<0,001), РК на 182% (p<0,001). Установленные метаболические нарушения приводят к интенсивному накоплению в организме соединений, входящих в группу СМВ.

В экспериментальном исследовании мы анализировали количественные характеристики экстинкций эритроцитов (Кэ), плазмы (Кпл), соотношение Кпл/Кэ (К) (таблица 4.1), а также формы спектрограмм (рис. 4.1.1 - 4.1.5).

Предложенный Малаховой М.А. [33] коэффициент перераспределения СМВ между белками плазмы в пользу эритроцитов Кпл/Кэ (К) как в контроле, так и при раке был меньше 1. Следовательно, указывает на значительный вклад гликокаликса эритроцитов в транспорт метаболитов крови. Причем при распространенных формах рака данная тенденция усиливалась лишь при раке

легких, а при раке желудка и кишечника соотношение стремилось к 1, т.е. содержание СМВ в плазме повышалось.

В литературе указывают, что снижение транспортируемых эритроцитами ВНиСММ из-за дезорганизации гликокаликса, сопряжено с увеличением летальности клеток от 30 до 70% [194].

В оценке форм спектрограмм отмечают смещение максимумов длин волн, высоту расположения пиков в плазме, на эритроцитах.

В спектрограммах плазмы отмечают смещение начальных значений спектрограммы на длинах волн 238, 242 нм, в спектрограммах эритроцитов определяют угол наклона ветвей гиперболы к основанию графика.

Спектрограмма плазмы крови у здоровых лиц на длинах волн 238, 242 нм имеет сопряжение с осью абсцисс (нулевые значения экстинкций). Начиная с 246 нм, имеет вид равномерно восходящей кривой, достигая максимальных значений экстинкций при длине волны 282 нм, а затем нисходящей. Величина поглощения не превышает 0,3 ед. оптической плотности (рис. 4.1.1).

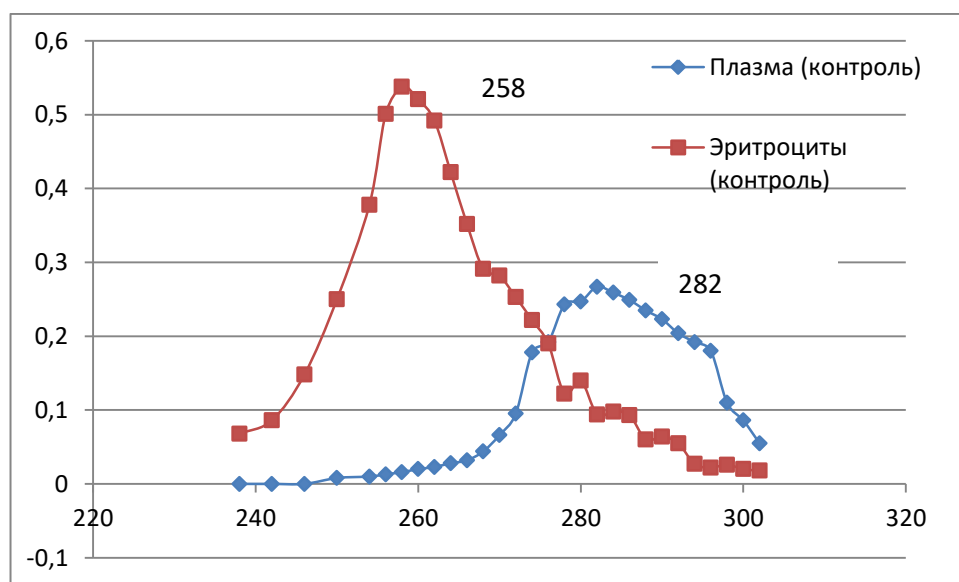


Рис. 4.1.1 Спектры ВНиСММ в плазме и эритроцитах в ультрафиолетовом диапазоне (238-310 нм). Здоровый мужчина, 56 лет.

Профиль спектрограммы супернатанта после осаждения эритроцитарной массы ТХУ имеет максимум экстинкций при длине волны 258 нм. Высота стояния максимума между $E=0,55-0,65$ (Рис. 4.1.1).

При РЛ (Рис. 4.1.2) спектрограмма плазмы крови на длинах волн 238, 242 нм имеет поглощение оптической плотности 0,28-0,26 ед. Вещества, которые поглощают в этом диапазоне, относятся к катаболическим. В отличие от нормы, после 246 нм кривая не имеет равномерно восходящий вид кривой, максимум наблюдается при 284 нм, т.е. сдвинут, по сравнению с контролем на 2 нм вправо. Максимум экстинкций эритроцитарной массы находится при длине волны 256 нм, т.е. сдвинут влево на 2 нм по сравнению с контролем. Высота стояния максимума при $E=1,25$ ед., что вдвое больше, по сравнению с контролем ($E=0,55-0,65$).

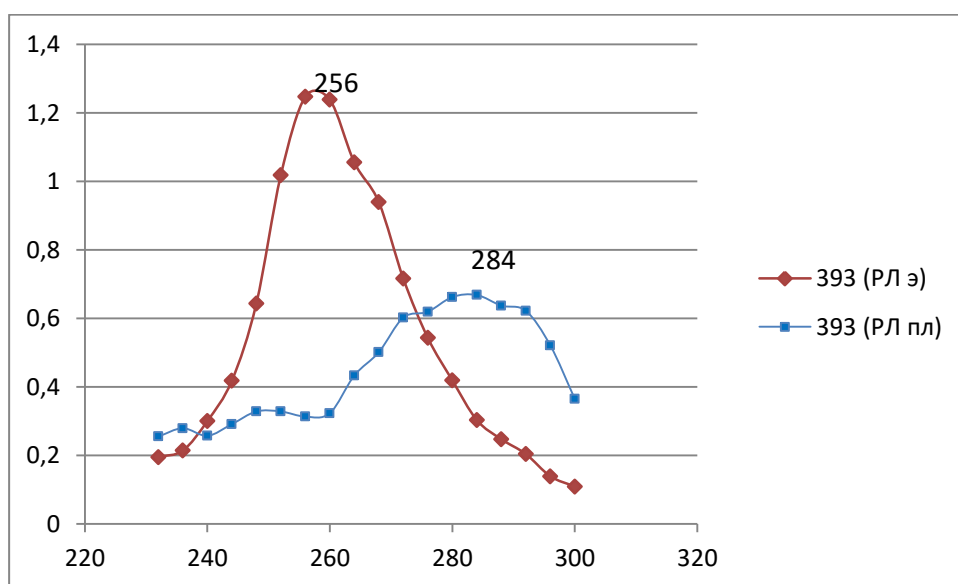


Рис. 4.1.2 Спектры ВНиСММ в плазме и эритроцитах в ультрафиолетовом диапазоне (238-310 нм). Периферический рак н/доли левого легкого, мужчина, 59 лет, T2N2M0.

При РЖ (Рис. 4.1.3) спектрограмма плазмы крови на длинах волн 238, 242 нм имеет отличные от нуля значения экстинкций ($E=0,01$ ед.). Следовательно, пул веществ, которые относятся к катаболическим является повышенным. В

отличие от нормы, после 246 нм кривая не имеет равномерно восходящий вид кривой, максимум наблюдается при 284 нм, т.е. сдвинут, по сравнению с контролем на 2 нм вправо. Максимум экстинкций эритроцитарной массы находится при длине волны 260 нм, т.е. сдвинут, по сравнению с контролем на 2 нм вправо. Высота стояния максимума при $E=0,95$ ед., что превышает значение контроля в 1,6 раз ($E=0,55-0,65$).

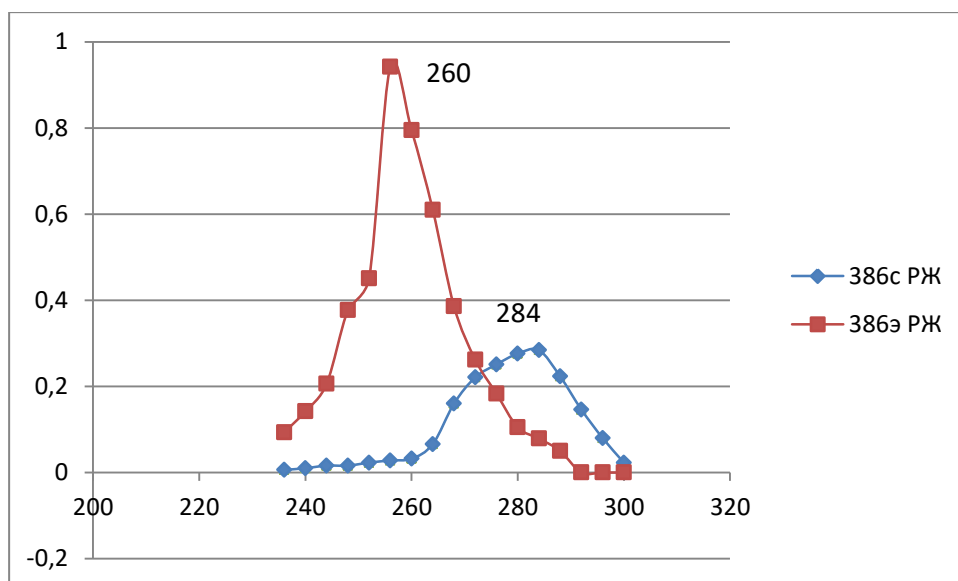


Рис. 4.1.3 Спектры ВНиСММ в плазме и эритроцитах в ультрафиолетовом диапазоне (238-310 нм). Рак тела желудка 4 ст., Т3N3M0, мужчина, 62 года.

При РК (Рис. 4.1.4) спектрограмма плазмы крови на длинах волн 238, 242 нм имеет поглощение оптической плотности 0,13-0,15 ед. Следовательно, повышенное содержание катаболической фракции веществ. В отличие от нормы, после 246 нм кривая не имеет равномерно восходящий вид кривой, максимум наблюдается при 288 нм, по сравнению с контролем сдвинут на 6 нм вправо. Максимум экстинкций эритроцитарной массы наблюдался при длине волны 256 нм (контроль при $\lambda=258$ нм). Высота стояния максимума $E=1,4$ ед., что превышает среднее значение контроля в 2,3 раза ($E=0,55-0,65$).

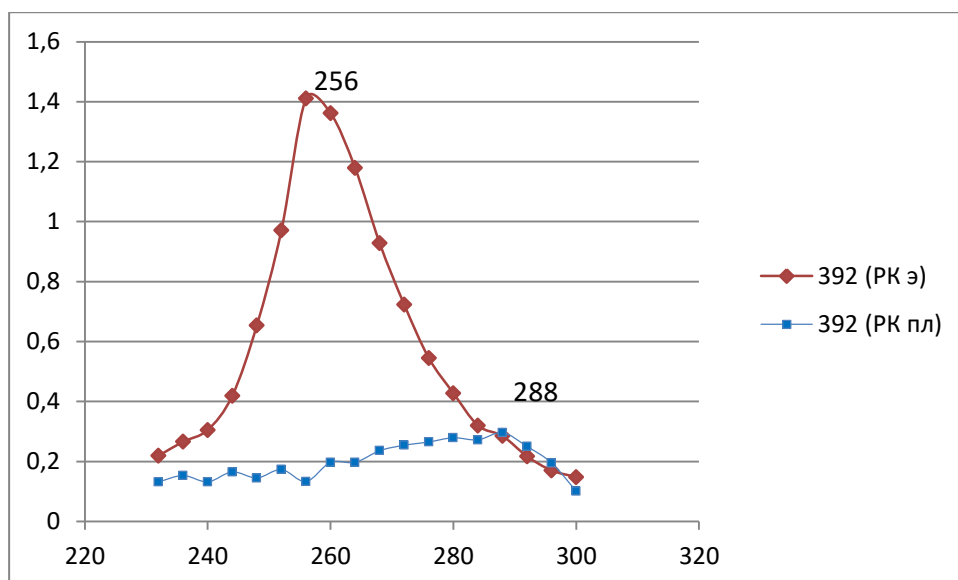


Рис. 4.1.4 Спектры ВНиСММ в плазме и эритроцитах в ультрафиолетовом диапазоне (238-310 нм). Рак нижнеампулярного отдела ректи Т3N1M1, мужчина, 57 лет.

Анализируя данные спектрограмм здоровых людей и больных раком, можно увидеть повышение катаболического пула низкомолекулярных веществ у больных раком изученных локализаций (рис. 4.1.1 - 4.1.5). Согласно методике М.А. Малаховой, величина катаболического пула ВНиСММ плазмы равна сумме экстинкций в интервале длин волн от 238 до 258 нм. Именно в зоне длин волн 238–244 нм имеют максимум экстинкций мочевины, мочевая кислота и креатинин. По данным Л.Б. Петросян и др. [27], именно при длине волны 238 нм определяются ксенобиотики, а при 270–286 нм – эндогенные вещества. При длине волны 290 нм максимум поглощения имеет рибозид мочевой кислоты. Максимальное поглощение в зонах экстинкций данных токсических продуктов при раке по сравнению с контролем указывает на высокую концентрацию их в плазме и показывает несостоятельность деятельности органов детоксикации.

Нами были исследованы и проанализированы также спектры ВНиСММ в эритроцитах и плазме крови оттекающей от опухоли в ультрафиолетовом диапазоне (238-310 нм) на примере больного раком восходящей ободочной кишки, 73 лет (рис. 4.1.5-4.1.6).

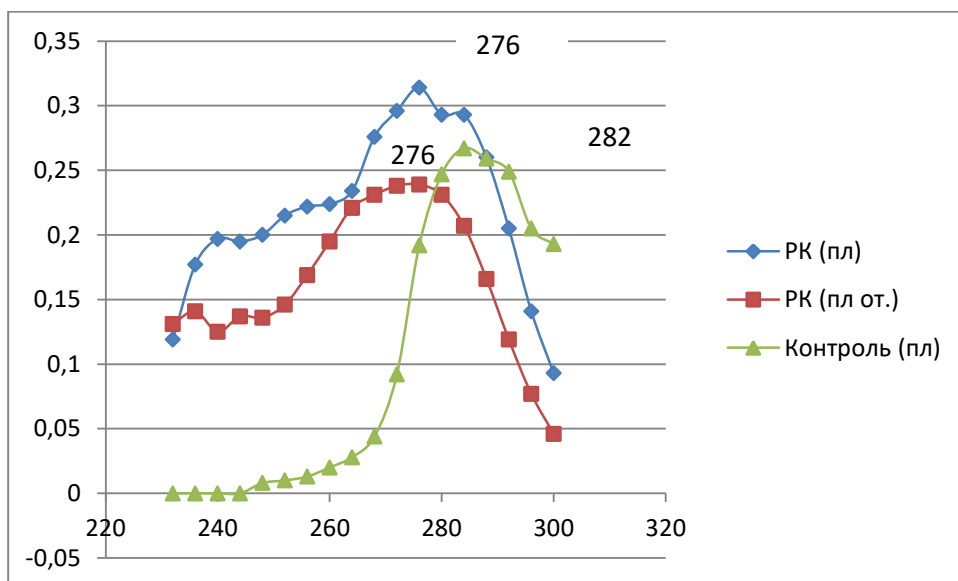


Рис. 4.1.5 Спектры ВНиСММ плазмы оттекающей от опухоли крови в ультрафиолетовом диапазоне (238-310 нм). Рак восходящей ободочной кишки (Т3N3M0), женщина, 73 года.

Спектрограммы плазмы, как периферической крови, так и оттекающей от опухоли крови характеризуются повышением катаболического пула низкомолекулярных веществ (рис. 4.1.5). При этом на длинах волн 238, 242 нм поглощение оптической плотности в плазме периферической крови составляет 0,18-0,19 ед., в оттекающей от опухоли - 0,14-0,13 ед. (контроль - нулевые значения экстинкций). Следует отметить, что у больного РК в плазме как периферической крови, так и оттекающей от опухоли, после 246 нм кривая не имеет равномерно восходящий вид подобно контролю, максимумы поглощения совпали и наблюдаются при 276 нм, но отличаются от контроля (282 нм).

Сопоставление спектров метаболитов плазмы при распространенном раке в оттекающей плазме и периферическом кровотоке с контрольными спектрами может иллюстрировать системный характер процесса. Вероятно, максимальные спектры при раке периферической крови, а не в оттекающей от органа свидетельствуют об эндогенном интоксикационном синдроме, являющимся проявлением раковой кахексии.

Анализируя спектрограмму ВНиСММ в эритроцитах, отекающей от опухоли крови по сравнению с эритроцитами периферической крови больного РК, также были получены отличия (рис. 4.1.6). Максимум экстинкции эритроцитарной массы отекающей от опухоли наблюдается при длине волны 244 нм, тогда как в эритроцитах периферической крови того же больного - 256 нм (контроль – 258 нм). Сдвиги пиков объясняются тем, что разные азотистые основания изменяют профиль спектральной кривой и сдвигают максимум поглощения. При более детальном анализе было установлено, что при 244 нм максимум поглощения дают пиримидиновые основания, а в диапазоне 250-256 нм – нуклеотиды, содержащие пуриновые основания аденин и гуанин.

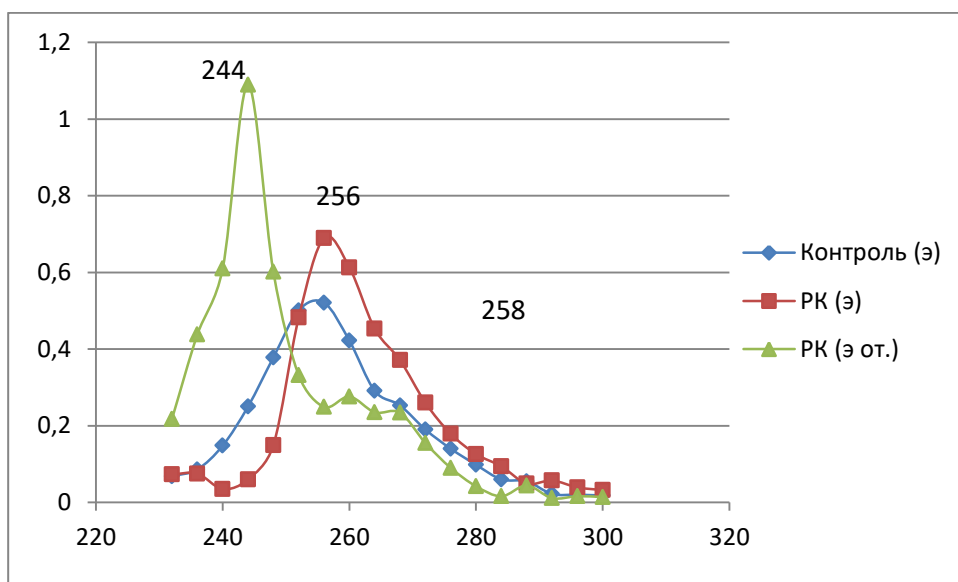


Рис. 4.1.6 Спектры ВНиСММ в эритроцитах отекающей от опухоли крови в ультрафиолетовом диапазоне (238-310 нм). Рак восходящей ободочной кишки (Т3N3M0), женщина, 73 года.

Спектрограмма эритроцитов отекающей крови также отличается высотой стояния максимума. В эритроцитах периферической крови $E=0,69$ ед., в то время как в эритроциты отекающей от опухоли крови $E=1,09$ ед. (контроль $E=0,55-0,65$). Следовательно, источник пиков – не опухоль, что хорошо согласуется с нашим предположением о синдроме эндогенной интоксикации.

Установленные нами различия спектрограмм плазмы и эритроцитов в контроле и при распространенных формах рака различных локализаций позволяют предположить, что дисфункция эритрона существенна в развитии синдрома эндогенной интоксикации. Поскольку периферический кровоток, как плазма, так и эритроциты перегружались преимущественно за счет фонда пуриновых оснований, находим связь с системным изменением обмена фонда аденилата. Безусловно, провоцировать это может гипоксия, характер которой у онкобольных связан с дисфункцией эритроцитов, а значит - гемическая гипоксия.

Таким образом, однонаправленный характер изменений спектрограмм плазмы и эритроцитов крови при раке различных локализаций показывает нарушение гомеостаза ВНиСММ, обусловленное раковой кахексией.

4.2 Изучение уровня аденозина в эритроцитах и плазме крови в норме и при раке

Аденозин – это сигнальная молекула, которая относится к эндогенным среднемолекулярным метаболитам ($M=267,242$ г/моль). Принимая во внимание множество регуляторных функций аденозина и известные данные о влиянии ее избыточного уровня на функции эритроцитов и лимфоцитов, изучили молярную концентрацию аденозина в плазме крови и эритроцитах.

Результаты исследования уровней аденозина в плазме крови и эритроцитах в контроле, при РЛ, РЖ и РК представлены в таблице 4.2.

Таблица 4.2

**Содержание аденозина в плазме крови и в эритроцитах в
норме и при РЛ, РЖ, РК, моль/л**

	Молярная концентрация аденозина, моль/л	
	плазма	эритроциты
Контроль (n=15)	0,062±0,002	0,074±0,005
Рак легких (n=25)	0,077±0,005*	0,096±0,005*
Рак желудка (n=12)	0,070±0,002*	0,092±0,003*
Рак кишечника (n=25)	0,069±0,003*	0,093±0,002*

Примечание:

* $p < 0,001$ относительно группы контроля.

Анализируя уровень аденозина в плазме крови, установлено его достоверное увеличение при РЛ на 13%, РЖ и РК на 11% ($p < 0,05$). Полученные данные согласуются с известным фактом об аденозин продуцирующей функции клеток злокачественной опухоли и его последующим иммуносупрессирующим действием [8, 41], тем более в условиях повышенной проницаемости биомембран.

Схожий характер изменений уровня нуклеозида проявляется в эритроцитах при раке изученных локализаций (рис. 4.2). В эритроцитах крови уровень аденозина при раке был также достоверно выше нормы: при РЛ на 12 %, РЖ и РК на 11 % ($p < 0,05$). Полученные результаты позволяют сделать вывод о более схожих изменениях метаболизма при двух локализациях – РЖ и РК. Следует отметить, что максимальный уровень аденозина в плазме и эритроцитах отмечался при РЛ.

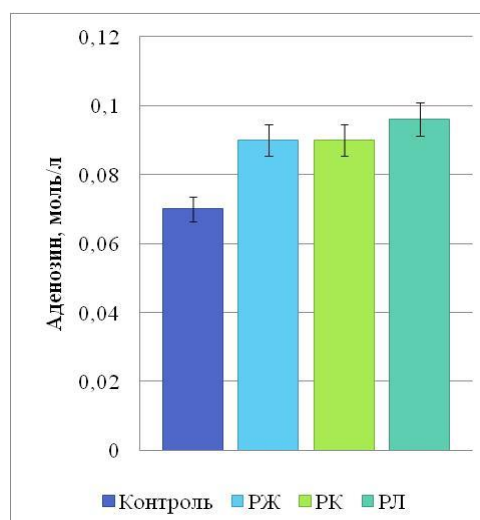


Рис. 4.2. Молярная концентрация аденозина в эритроцитах при РЖ, РК и РЛ, моль/л

Оценили содержание аденозина в эритроцитах по сравнению с плазмой крови в норме и при раке. Установили, что как и в контроле ($1,2 \pm 0,07$ моль/л) так и при различной локализации опухоли его содержание в эритроците всегда было выше, чем в плазме. Соответственно, показатель соотношения составил: при РЛ - $1,3 \pm 0,08$ моль/л, РЖ - $1,3 \pm 0,06$ моль/л, РК - $1,4 \pm 0,09$ моль/л. Наши данные хорошо согласуются с мнением о способности активного мембранного транспорта аденозина в эритроците. При этом установлено, что концентрация аденозина в эритроцитах возрастала при всех исследуемых случаях распространенного рака различных локализаций. Интересно отметить, что получена линейная корреляционная связь между содержанием аденозина в эритроцитах и плазме здоровых людей ($R=0,708$, $p=0,050$), у пациентов с раком изученных локализаций такая связь отсутствует (во всех случаях $R=0$, $p>0,05$).

Однако, изучив более детально концентрацию аденозина – одной из ключевых сигнальных молекул в обмене эритроцита, по результатам кластерного анализа, установили неоднородность показателя в эритроцитах при раке.

Согласно кластерному анализу по уровню аденозина эритроциты были поделены на две подгруппы – 1-я (I) и 2-я (II). Наиболее выраженное повышение уровня аденозина по сравнению с контролем отмечено в эритроцитах у больных

2-й группы (рис. 4.3). В первой группе молярная концентрация аденозина в эритроцитах больных РЛ, РЖ, РК составила соответственно: $0,088 \pm 0,002$ моль/л, $0,085 \pm 0,003$ моль/л, $0,079 \pm 0,001$ моль/л (контроль – $0,062 \pm 0,002$ моль/л). Во второй группе при РЛ – $0,101 \pm 0,002$ моль/л, РЖ – $0,100 \pm 0,002$ моль/л, РК – $0,106 \pm 0,002$ моль/л (контроль – $0,062 \pm 0,002$ моль/л). Зарубежные авторы отмечают, что нарастание уровня аденозина взаимосвязано с образованием патологических форм эритроцитов с низкой жизнеспособностью [134, 194, 263].

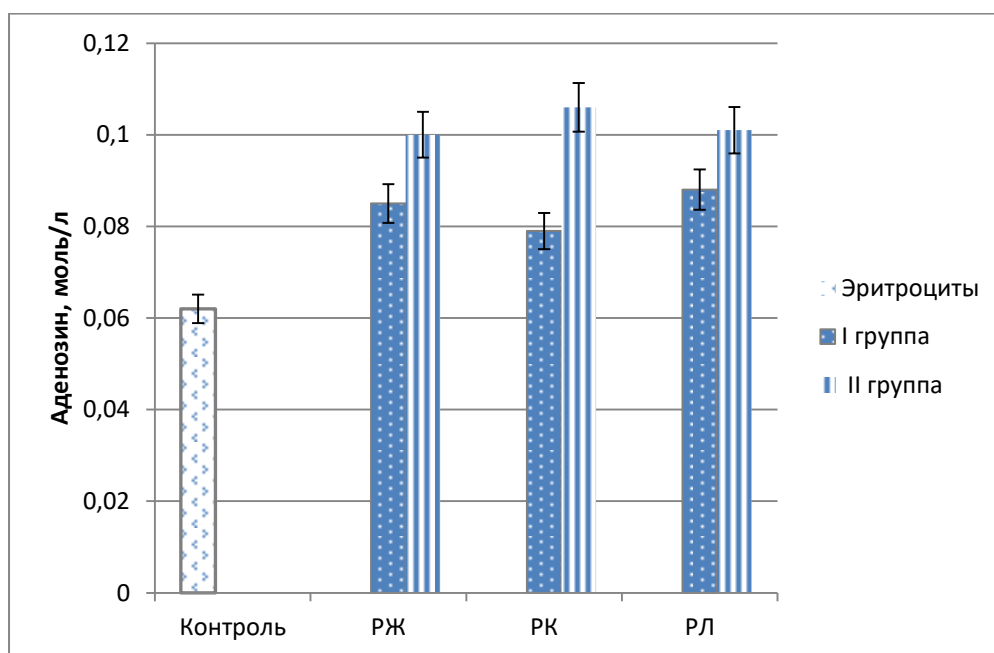


Рис. 4.3. Содержание аденозина в эритроцитах в подгруппах, выделенных согласно кластерному анализу

Для уточнения роли злокачественной опухоли в повышении уровней аденозина нами была исследована кровь, непосредственно оттекающая от опухоли на примере двух локализаций – РЖ и РК (РЖКТ). При этом в плазме оттекающей от опухоли крови было установлено повышение уровня аденозина и составило $0,071 \pm 0,004$ моль/л по сравнению с контролем – $0,062 \pm 0,002$ моль/л ($W=30,0$, $p<0,001$), но достоверных отличий от концентрации аденозина в плазме венозной крови тех же больных, которая составила $0,069 \pm 0,003$ моль/л не

установлено ($W=80,0$, $p>0,05$). Подобные тенденции характеризуют и циркулирующие клетки крови. На примере эритроцитов крови оттекающей от опухоли концентрация составила $0,094\pm0,010$ моль/л, что достоверно выше контрольных значений ($0,074\pm0,010$ моль/л) $p<0,001$, но не отличается от значений эритроцитов венозной крови у тех же пациентов (рис. 4.4).

Как в периферическом кровотоке, так и в оттекающем от опухолевого очага концентрация аденозина была достоверно выше при всех локализациях. Тогда можно думать, что опухоль может быть дополнительным источником циркулирующего в кровотоке аденозина. При этом полученные данные демонстрируют системное влияние опухоли на организм и целесообразно считать венозную кровь информативным объектом для исследования.

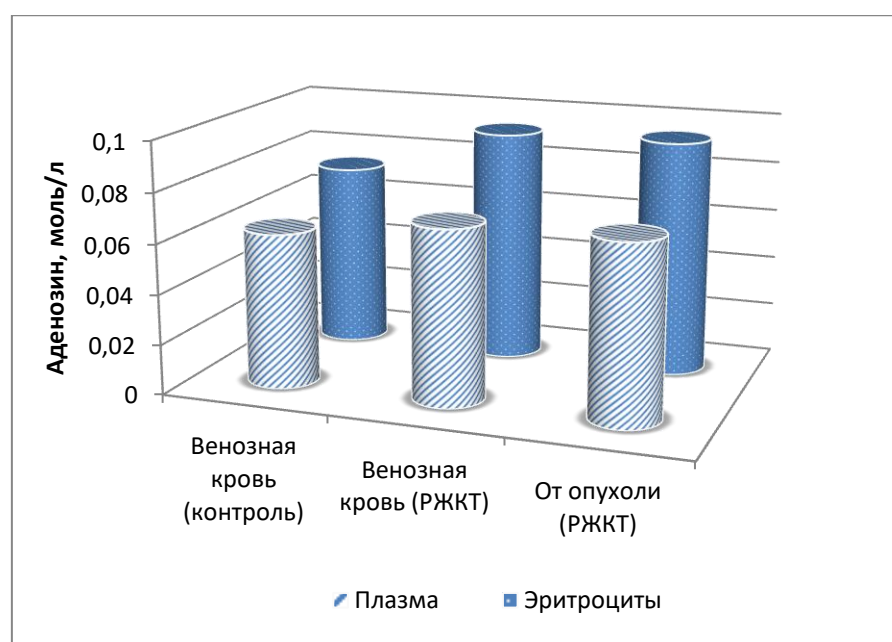


Рис. 4.4. Уровень аденозина в крови, непосредственно оттекающей от опухоли, моль/л

Далее попытались исследовать взаимосвязь нарушения обмена аденозина с патоморфологией опухоли. Исследовали случаи аденокарциномы (АК) различной локализации (рис. 4.5). При определении сравнительного содержания аденозина в эритроцитах и плазме крови больных АК установлено достоверное увеличение концентрации аденозина по сравнению с контролем ($p<0,001$) (рис. 4.5).

Наиболее выраженное повышение уровня аденозина отмечено в эритроцитах, по сравнению с плазмой крови больных АК. При попарном сопоставлении СМ в каждом индивидуальном случае концентрации аденозина в эритроцитах и плазме крови получена линейная корреляционная связь между содержанием аденозина в эритроцитах и плазме здоровых людей ($R=0,708$, $p=0,050$), что свидетельствует о равном распределении СМВ между плазмой и гликокаликсом. При онкопатологии такой корреляции не выявлено ($R=0$, $p=0,156$).

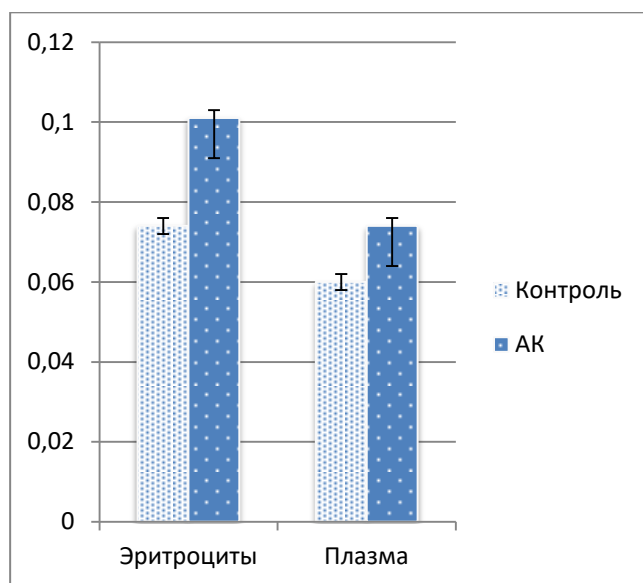


Рис. 4.5. Молярная концентрация аденозина эритроцитов и плазмы крови у больных с АК, ммоль/мл

Таким образом, нами установлено достоверное отличие в уровнях циркулирующего аденозина как в плазме, так и в клетках крови, в частности в эритроцитах при раках различной локализации. Была выявлена неоднородность обмена аденозина в эритроцитах при патологии, следовательно, изучение особенностей его обмена представляет определенный интерес.

4.3 Исследование осмотической резистентности и сорбционной способности эритроцитов в норме и при раке

Поскольку одной из функций эритроцитов является сорбирование и транспорт определенного количества ВНиСММ. Среди них и токсических, концентрация которых повышается при канцерогенезе. Увеличение уровня ВНиСММ в плазме крови может превышать возможности гликокаликса и служить показателем мембранной дисфункции. Поэтому в исследовании определялись функциональные показатели мембраны эритроцитов – изменение осморезистентности (ОРЭ) и сорбирующей способности (ССЭ) гликокаликса.

Повышение сорбционной емкости эритроцитов считается индикатором повреждения мембран и клеточной дезорганизации [210].

Полученные результаты по ОРЭ приведены в таблице 4.3. Как было описано в разделе материалы и методы изучение ОРЭ проводили в серии проб с понижением концентрации NaCl от 0,9% до 0,1%.

Таблица 4.3

**Изменение осмотической резистентности эритроцитов (ОРЭ)
в норме и при раке, % NaCl**

	Min ОРЭ	Max ОРЭ	Амплитуда резистентности
Контроль	0,50±0,01 (95% ДИ 0,45-0,50)	0,23±0,01 (95% ДИ 0,20-0,25)	0,27±0,01
РЛ	0,47±0,03 (95% ДИ 0,45-0,50) P=0,432	0,25±0,01 (95% ДИ 0,20-0,30) P=0,081	0,22±0,02
РЖ	0,59±0,01 (95% ДИ 0,40-0,70) P=0,011	0,25±0,008 (95% ДИ 0,20-0,25) P=0,280	0,34±0,01
РК	0,63±0,02 (95% ДИ 0,40-0,70) P=0,031	0,25±0,008 (95% ДИ 0,20-0,25) P=0,114	0,38±0,02

Примечание:

- 1) p - по отношению к контролю.
- 2) в группах проведено от 6 до 13 исследований.

Максимальная осмотическая резистентность (max ОРЭ) определялась в той пробирке, в которой наступает полный гемолиз. Минимальная осмотическая резистентность (min ОРЭ) определялась после центрифугирования в пробирке со следами гемолиза (розовый оттенок плазмы над осадком эритроцитов). Амплитудой резистентности является интервал между минимальной и максимальной резистентностью.

Анализируя группу контроля, следует отметить, что первая пробирка со следами гемолиза наблюдалась при концентрации соли равной $0,50 \pm 0,01\%$, а последняя пробирка с полным гемолизом - при $0,23 \pm 0,01\%$. При этом амплитуда резистентности составила $0,27 \pm 0,01$.

Исследуя показатели ОРЭ при РЛ, РЖ и РК, были получены изменения Min ОРЭ для пациентов с РЖ и РК. Однако изменения ОРЭ не были установлены для пациентов с РЛ. 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. Увеличение ОРЭ, чаще всего, интерпретируется как повышение устойчивости мембран эритроцитов к осмотическому гемолизу, что возможно при условии увеличения молодых форм эритроцитов.

Установленные значения амплитуды резистентности отличаются при всех локализациях рака, по сравнению с контролем. При этом, в случае РЖ и РК амплитуда увеличена, а при РЛ меньше контроля (таблица 4.3).

Анализируя данные ОРЭ, обратили внимание на то, что при каждой локализации рака, были эритроциты как с выражено повышенными значениями ОРЭ, так и пониженными значениями ОРЭ по сравнению с контролем. Согласно ранее проведенному кластерному анализу по уровню аденозина в сформированных группах изучили и ОРЭ (таблица 4.4). При этом в 1-ю группу вошли пациенты с пониженными значениями ОРЭ, во 2-ю группу вошли пациенты с повышенными значениями ОРЭ по сравнению с контролем. Полученные результаты изучения ОРЭ согласно группировке представлены в таблице 4.4.

Таблица 4.4

**Изменение осмотической резистентности эритроцитов (ОРЭ)
в норме и при раке, % NaCl**

Контроль		Min ОРЭ	Max ОРЭ
		0,50±0,01 (95% ДИ 0,45-0,50)	0,23±0,01 (95% ДИ 0,20-0,25)
РЛ	I группа	0,48±0,03 (95% ДИ 0,45-0,50) p=0,432	0,25±0,01 (95% ДИ 0,20-0,30) p=0,081
	II группа	0,57±0,03↑, p<0,05	0,27±0,02↑, p<0,05
РЖ	I группа	0,45±0,01↓ (95% ДИ 0,40-0,45) p=0,011	0,25±0,01 (95% ДИ 0,20-0,25) p=0,280
	II группа	0,70±0,02↑ (95% ДИ 0,60-0,70) p<0,001	0,25±0,01 (95% ДИ 0,20-0,25) p=0,280
РК	I группа	0,45±0,01↓ (95% ДИ 0,40-0,50) p=0,031	0,25±0,01 (95% ДИ 0,20-0,25) p=0,114
	II группа	0,65±0,028↑ (95% ДИ 0,60-0,70) p<0,001	0,25±0,01↑ (95% ДИ 0,20-0,25) p=0,045

Примечание:

- 1) p - по отношению к контролю.
- 2) в группах проведено от 6 до 13 исследований.

Исходя из представленных данных ОРЭ при раке исследуемых локализаций, было установлено, что в 1-й группе больных минимальный гемолиз наблюдался при более низкой концентрации соли, т.е. мембраны более устойчивы, чем в контроле. О большей устойчивости эритроцитов при РЖ и РК свидетельствует более низкая концентрация NaCl (меньше на 9%) по сравнению с группой контроля ($p<0,05$). Во 2-й группе больных минимальный гемолиз наблюдался даже при незначительном снижении концентрации от 0,9% NaCl: при РЖ - $0,70\pm0,02\%$, при РК – $0,65\pm0,028\%$, при РЛ - $0,57\pm0,03\%$ по сравнению с группой контроля ($0,50\pm0,01\%$) (см. табл. 4.4). Повышение ОРЭ у пациентов 1-й

группы, согласно данным литературы, может свидетельствовать о появлении молодых форм эритроцитов, отражать напряженность эритропоэза [12, 194]. Понижение ОРЭ у пациентов 2-й группы, вероятно, взаимосвязано с появлением патологических форм эритроцитов при раке и старению эритрона, что согласуется с нашими данными о нарастании уровней аденозина и данными литературы.

При изучении максимального гемолиза у больных раком 1-й группы не было получено достоверной разницы по сравнению с группой контроля. Это говорит о меньшей чувствительности показателя для пациентов с онкопатологией. Достоверные отличия получены для пациентов 2-й группы при РЛ и РК, где максимальный гемолиз происходил при более высоком уровне NaCl в растворе по сравнению с нормой. При РЛ и РК тотальный гемолиз наблюдался раньше, когда концентрация NaCl была выше контрольной на 22% и 8% соответственно ($p < 0,05$). Следовательно, наиболее чувствительным и ранним критерием нарушений мембраны эритроцитов является Min ОРЭ, по сравнению с Max ОРЭ.

При изучении сорбционной способности эритроцитов (ССЭ), которую считают индикатором повреждения мембран и показателем клеточной дезорганизации использовали 0,025% раствор витального красителя метиленового синего (0,025% МС). Полученные результаты представлены на рис. 4.5.

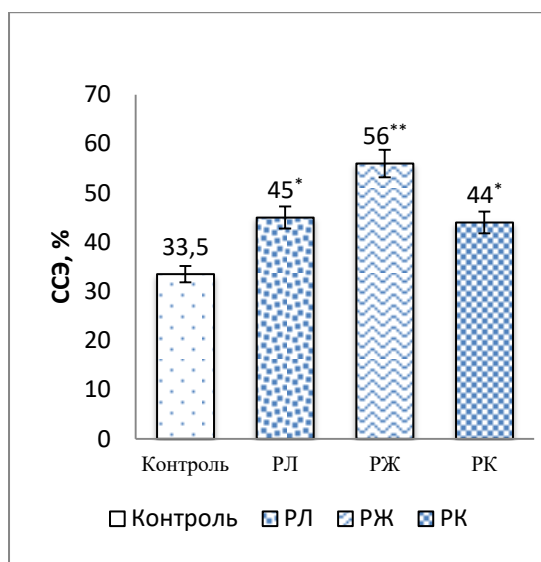


Рис. 4.5. Удельный вес нежизнеспособных эритроцитов, выраженный в ССЭ при РЛ, РЖ и РК, %

* $p < 0,05$ относительно группы контроля, ** $p < 0,001$ относительно группы РЛ и РК.

Удельный вес нежизнеспособных эритроцитов, выраженный в ССЭ, при раке исследуемых локализаций достоверно увеличился в сравнении с группой контроля (рис. 4.5). При РЛ на 29% и составил $45 \pm 5\%$ (32-57), $p = 0,001$, при РЖ – на 63%: $56 \pm 5,6\%$ (43-71), $p = 0,001$, при РК – на 24%: $44 \pm 3\%$ (32-55), $p = 0,001$, в группе контроля - $33,5 \pm 4,0\%$ (25-43).

Анализируя ССЭ в подгруппах больных раком, которые были сформированы согласно кластерному анализу, было установлено достоверное увеличение удельного веса нежизнеспособных эритроцитов при раке всех локализаций по сравнению с контролем (таблица 4.5).

Таблица 4.5

**Изменение ССЭ в подгруппах при раке, путем регистрации %
проницаемости мембраны для витального красителя (0,025% МС)**

	Контроль	РЛ	РЖ	РК
ССЭ (I группа)	33,5±4,0 (95% ДИ 25-43)	45 ± 5 (95% ДИ 32- 57) p=0,001	56±5,6 (95% ДИ 43-71) p=0,001	44±3 (95% ДИ 32- 55) p=0,001
ССЭ (II группа)		76±1, p<0,001	79±1, p<0,001	79±1, p<0,001

Примечание:

- 1) p - по отношению к контролю.
- 2) в группах проведено от 6 до 13 исследований.

У пациентов 1-й группы ССЭ возросла при РЛ на 32%, РЖ на 63%, РК на 24% (p=0,001). В тоже время, сравнивая показатели во 2-й группе с контролем, установлено более выраженное повышение ССЭ при РЛ на 202%, РЖ на 210%, РК на 210% (p<0,001). Кроме того, во 2-й группе ССЭ повышалась более выражено по сравнению с 1-й группой пациентов: при РЛ – в 1,5 раза (p<0,001), при РЖ – в 1,3 раза (p<0,001), при РК – в 1,7 раза (p<0,001).

Было установлено достоверное повышение удельного веса нежизнеспособных эритроцитов при всех локализациях рака, которое происходило на фоне повышения уровней ВНиСММ (К) как в эритроцитах, так и в плазме крови. Установленные метаболические нарушения приводят к интенсивному накоплению в организме соединений, входящих в группу СМВ, в том числе аденозина. По данным литературы, эти изменения характеризуют перегрузку гликокаликса эритроцитов и приводят к дезорганизации

плазматической мембраны, нарушению трансмембранных процессов. Данную гипотезу уточним при исследовании лимфоцитов.

4.4 Исследование удельного веса нежизнеспособных лимфоцитов в норме и при раке

Состояние мембраны лимфоцитов определяет скорость транспорта веществ, в т.ч. аденозина. Для изучения состояния мембран исследовали проницаемость мембран лимфоцитов с помощью витального красителя 0,5% трипанового синего в различные временные периоды.

В контрольной группе лимфоцитов изучена проницаемость мембран для витального красителя каждые пять минут в течение часа. На рисунке 4.6 видно, что наиболее выраженные изменения проницаемости лимфоцитов при 30 мин инкубации с красителем. При этом содержание окрашенных лимфоцитов в начальный момент времени составило $3,9\% \pm 1,0\%$, а при 30 мин инкубации $33,1\% \pm 6,3\%$ ($p < 0,001$), т.е. проницаемость увеличивается на 29 %. Тенденция изменений сохраняется и достоверно не изменяется при 60 мин ($37,5 \pm 4,5\%$), по сравнению с 30 мин ($p > 0,05$). В связи с этим дальнейшее изучение проницаемости мембран лимфоцитов было проведено в начальный момент времени и при 30 мин инкубации.

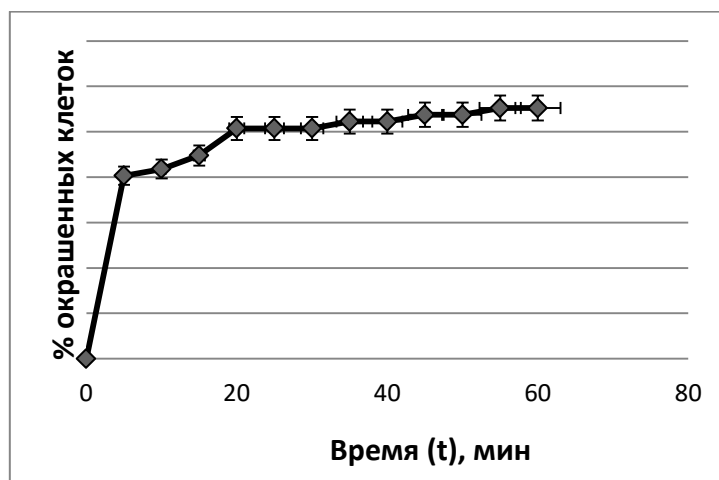


Рис. 4.6. Изменение проницаемости мембран лимфоцитов контрольной группы в динамике

Результаты эксперимента по изменению проницаемости мембран лимфоцитов больных РЖ, РК, РЛ приведены на рис. 4.7. Из представленных данных видно, что в начальный момент времени достоверно увеличено процентное содержание нежизнеспособных клеток при РК в 2,9 раз и составило $10,0\% \pm 4,4\%$, при РЖ в 1,7 раз - $7,3\% \pm 1,2\%$ ($p < 0,05$), недостоверно при РЛ - $5,1\% \pm 0,6\%$ ($p > 0,05$) (контроль - $3,9\% \pm 1,0\%$). При 30 мин инкубации клеток с красителем, отражают одну и ту же общую закономерность – достоверное повышение числа нежизнеспособных клеток во всех группах, по сравнению с окрашиванием в начальный момент времени. При РЛ удельный вес нежизнеспособных клеток составил $43,1\% \pm 7,2\%$, при РЖ - $81\% \pm 8,0\%$, при РК - $30,4\% \pm 6,5\%$ (контроль - $33,1\% \pm 6,3\%$). При 30 мин инкубации в контроле проницаемость увеличивается на 29 %, при РЖ – на 74 %, при РК – на 20 %, при РЛ – на 38 % (в каждом случае $p < 0,001$). Повышение содержания окрашенных клеток в препарате свидетельствует о повышении проницаемости мембран для молекул красителя и о наиболее выраженном повреждении клеток у больных с РЖ и РК. Полученные нами результаты и известные данные о возникновении пурининдуцированных пор в трансформированных клетках [6] могут являться звеньями единой патофизиологической цепи.

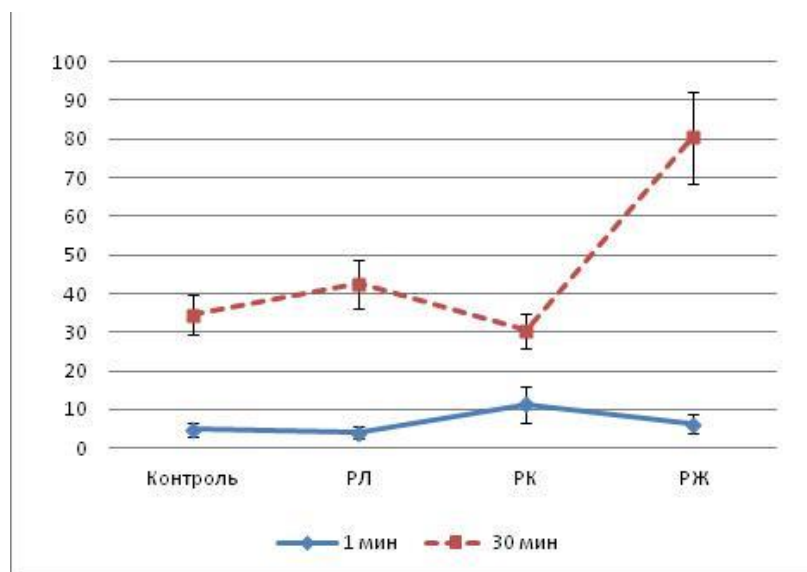


Рис. 4.7. Динамика изменения удельного веса нежизнеспособных лимфоцитов в норме и при раке

Для окрашивания лимфоцитов использовали стандартный, известный метод, но были получены нестандартные результаты.

Для оценки комплексных возможностей красителя проводили повторный подсчет окрашенных клеток в этой же системе спустя 30 мин.

Нами предложено внедрение в практику дополнительного времени инкубации клеток с красителем – 30 мин. При такой постановке эксперимента сомнений не возникало, что из общей когорты клеток выявляется субпопуляция с дисфункцией гликокаликса. Так было получено, что самые пострадавшие лимфоциты – при РЖ. Также дополнительное время позволило убедиться, что для всех локализаций характерно нарастание нежизнеспособных клеток.

Можно считать, что этот подход делает более чувствительным исследование состояния плазматической мембраны с помощью трипанового синего.

Изменение проницаемости мембран было изучено также в лимфоцитах отекающей от опухоли крови на примере РК. Поскольку ранее мы исследовали ряд показателей в отекающей крови, в результатах исследования жизнеспособности лимфоцитов при РК отметим общую тенденцию (рис. 4.8). В начальный момент времени процентное содержание нежизнеспособных лимфоцитов периферической и отекающей от опухоли крови достоверно не отличалось. При 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. 4.8). Что указывает на исключительно высокую информативность изучения отекающей от опухоли крови и более выраженному токсическому влиянию опухоли на клетки системы иммунитета в региональном кровотоке.

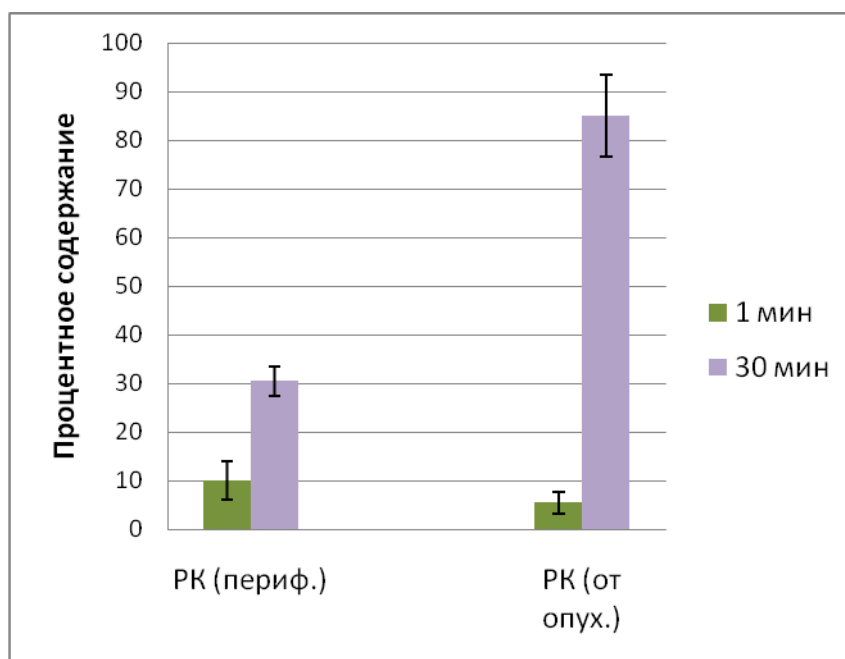


Рис. 4.8. Изменение проницаемости мембран лимфоцитов периферической и оттекающей от опухоли крови, окрашенных витальным красителем трипановым синим

Благодаря полученным результатам, можно предположить, что у больных РК мембрана лимфоцитов периферической крови, отдаленных от локализации опухоли способна к репарации. Некоторыми исследователями была экспериментально доказана способность клеточных мембран восстанавливаться после повреждения [3].

Значительное содержание поврежденных лимфоцитов в оттекающей от опухоли крови может быть обусловлено, в том числе, повышенной концентрацией аденозина.

Поскольку более выраженные нарушения в ряде исследований показателей жизнедеятельности клеток крови (как эритроцитов, так и лимфоцитов) установлены в клетках крови, оттекающей от опухоли, то это является звеньями синдрома системного влияния опухоли на организм.

Нарушение свойств плазматической мембраны эритроцитов при раке сопряжено с ухудшением функциональных показателей плазмолеммы лимфоцитов, о чем свидетельствовало повышение удельного веса нежизнеспособных лимфоцитов у всех онкобольных.

Полученные данные согласуются с известным фактом об аденозин продуцирующей функции раковых клеток и их последующим иммуносупрессирующим действием, тем более в условиях повышенной проницаемости биомембран. Показатели дезорганизации мембран (снижение ОРЭ, устойчивости лимфоцитарной мембраны к витальному красителю) при раке различных локализаций сопряжены со снижением периода активной циркуляции клеток. О чем свидетельствуют повышение удельного веса нежизнеспособных эритроцитов и лимфоцитов. Развиваются данные нарушения на фоне изменений концентрации СМВ как в широком спектре, так и на примере аденозина, в частности. Вероятно, является факторами системного влияния опухоли на организм, согласно результатам по оттекающей от опухоли венозной крови. Для определения информативных метаболических показателей развивающейся клеточной дисфункции были изучены особенности обмена глюкозы и аденозина в клетках крови.

Полученные результаты были опубликованы в следующих работах:

1. Миронова К.А. Нарушения гомеостаза аденозина у онкобольных / Миронова К.А. // Новообразование. – 2017. – Т. 16, №. 1. С. 51-54. ISSN 2521-117X. <<http://donetsk-onco.com/neoplasm/index.php/Neoplasm/article/view/6>
2. Миронова К.А. Особенности обмена аденозина и лактата в клетках крови при аденокарциноме желудка / Миронова К.А. // Евразийский союз ученых. – 2015. - № 8-3 (17). - С. 148-152. (ВАК ДНР)
3. 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. (ВАК ДНР)
4. 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. (ВАК ДНР)
5. Миронова К.А. Взаимосвязь между активностью аденозиндезаминазы и жизнеспособностью лимфоцитов у онкобольных. Фундаментальная наука и

клиническая медицина: Тезисы XX Международной медико-биологической конференции молодых исследователей. 22 апреля 2017 года — СПб.: Изд-во СПбГУ, 2017. — 680 с. [Фундам. наука клин. мед. — 2017. — т. 20. — С. 366–367].

6. Миронова К.А., Бакурова Е.М. Дисметаболические процессы и дезорганизация гликокаликса эритроцитов при развитии анемии у онкобольных. Сборник материалов IV межрегиональной научно-практической конференции «Диагностика и лечение анемии в XXI веке». Современные вопросы гематологии в педиатрической, акушерской и онкологической практике. 5-7 октября 2017 года, Рязань, ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России.

7. Миронова К.А. Дисметаболические процессы и дезорганизация гликокаликса эритроцитов у больных раком легких. Материалы Международной научной конференции студентов и молодых ученых Донецкие чтения 2017: Русский мир как цивилизационная основа научно-образовательного и культурного развития Донбасса: (Донецк, 17-20 октября 2017 г.). – Том 2: Химико-биологические науки / под общей редакцией проф. С.В. Беспаловой. – Донецк: Изд-во ДонНУ, 2017. С. 307– 308.

8. Миронова К.А. Нарушения метаболизма в лимфоцитах при раке легких //Актуальные проблемы биомедицины – 2020. Сборник тезисов XXVI Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием. Санкт-Петербург 26-27 марта 2020 года. - С. 125-126. (РИНЦ)

9. Миронова К.А. Снижение жизнеспособности эритроцитов при раковой анемии. Сборник тезисов к Международной научной конференции «Физико-химическая биология как основа современной медицины». Беларусь, г. Минск. 23 мая 2020 года. - С. 112-113.

10. Миронова К.А., Бакурова Е.М., Турсунова Ю.Д. Способ определения жизнеспособности лимфоцитов у онкобольных *in vitro* // Рационализаторское предложение: ДонНМУ им. М.Горького, 18.10.2021, №6502.

РАЗДЕЛ 5

АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ ОБМЕНА ГЛЮКОЗЫ И АДЕНОЗИНА В ПЛАЗМЕ И КЛЕТКАХ КРОВИ ПРИ РАКЕ ЛЕГКИХ, ЖЕЛУДКА, КИШЕЧНИКА

5.1. Активность ферментов углеводного и нуклеотидного обменов в эритроцитах и лимфоцитах крови при раке легких, желудка и кишечника

Для биохимических методов диагностики традиционным материалом является плазма крови. Но не менее важно изучение метаболических изменений в клетках крови, которые взаимосвязаны с их функцией.

Нарушение метаболизма в эритроцитах может приводить к нарушениям доставки кислорода тканям во всем организме, способствуя развитию патологии. Метаболизм лимфоцитов тесно связан с их функцией, следовательно, с иммунитетом [92, 180].

Важнейшую роль в поддержании функций эритроцитов имеет гликолиз – единственный путь образования АТФ, в отличие от лимфоцитов, обеспечивающий поддержание работы ионных насосов (К,Na-АТФазы). В лимфоцитах активация анаэробного гликолиза характеризует изменение их функций путем перестройки метаболизма в фазу активации.

Кроме достаточного уровня АТФ, на стабильность мембраны, активность эритроцитарных ферментов и способность гемоглобина переносить кислород влияет активность системы антирадикальной защиты.

Раннее отмечалось, что ПФП – основной поставщик НАДФН+Н⁺ [177, 226, 261]. Причем, если НАДФН+Н⁺ необходим для реализации лимфоцитом его защитной функции, то эритроциту же он обеспечивает редукцию и метгемоглобина, и глутатиона – основного антиоксиданта.

Проведен спектрофотометрический анализ активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ, АДА в эритроцитах и лимфоцитах периферической крови у больных раком различных локализаций. Активность НАД(Ф)-зависимых

дегидрогеназ выражали в нмоль/мин·мг белка для эритроцитов и нмоль/мин·10⁶ клеток – для лимфоцитов.

Статистические результаты сравнения с контрольной группой активности ЛДГ, Г6ФДГ и АДА в эритроцитах у больных раком различной локализации представлены в таблице 5.1.

Таблица 5.1

Значение W-критерия Вилкоксона и вероятность ошибки (p) при сравнении с контрольной группой активности ЛДГ, Г6ФДГ и АДА в эритроцитах у больных раком различной локализации

Активность фермента, нмоль/мин·мг белка	W-критерий	Вероятность ошибки (p)
ЛДГ	270,0	p<0,001
Г6ФДГ	701,5	p=0,081
АДА	198,0	p<0,001

Анализируя активность ферментов углеводного обмена в эритроцитах крови в норме, следует отметить, что активность ЛДГ на порядок выше активности Г6ФДГ (раздел 3). Эти результаты согласуются с данными литературы [163] о превалировании гликолитического пути окисления глюкозо-6-фосфата над пентозофосфатным. В общей выборке больных в эритроцитах среди изученных ферментов углеводного обмена достоверные отличия наблюдались лишь для активности ЛДГ (таблица 5.1). В то время как медианное значение активности Г6ФДГ не имело значимой разницы по сравнению с группой контроля. Как следует из полученных результатов, активность гликолитического фермента достоверно увеличивалась при всех локализациях рака: при РЛ в 3,6 раза (p<0,001), РЖ и РК в 3,7 раза (в обоих случаях p <0,001).

Активность фермента катаболизма пуринов - АДА в эритроцитах является статистически достоверно пониженной у больных с РЛ в 1,4 раза (p <0,001), РЖ в - 2 раза (p <0,001) и с РК в 1,6 раз (p<0,001) (таблица 5.1). Снижение активности

АДА при раке коррелирует с повышением уровней внутриклеточного аденозина (раздел 4): при РЖ - $R=-0,606$ ($p<0,01$), при РК - $R=-0,504$ ($p=0,02$), при РЛ - $R=0,451$ ($p=0,05$).

Статистические результаты сравнения с контрольной группой активности изучаемых ферментов в лимфоцитах при патологии представлены в таблице 5.2.

Таблица 5.2

Значение W-критерия Вилкоксона и вероятность ошибки (p) при сравнении с контрольной группой активности ЛДГ, Г6ФДГ и АДА в лимфоцитах у больных раком различной локализации

Активность фермента, нмоль/мин·10⁶ клеток	W-критерий	Вероятность ошибки (p)
ЛДГ	736,0	p=0,008
Г6ФДГ	976,5	p=0,293
АДА	206,0	p<0,001

У больных раком изученных нами локализаций по сравнению с контролем были выявлены особенности протекания некоторых пластических и энергетических процессов. В частности, в лимфоцитах больных зафиксировано достоверное повышение активности НАД - ЛДГ при РЛ в 1,4 раза ($p=0,008$), при РЖ в 2,5 раза ($p=0,003$). В тоже время при РК изменения активности ЛДГ не отличались от таковых в норме ($p=0,847$). Анализируя лимфоцитарную активность ключевого фермента ПФП – Г6ФДГ, следует отметить ее достоверное повышение при РЛ в 1,4 раза ($p=0,046$), РК в 1,4 раза ($p=0,034$) и не достоверные отличия от контроля при РЖ ($p=0,877$). По-видимому, в лимфоцитах больных РЖ интенсификация использования глюкозо-6-фосфата в гликолизе не приводила к обеднению субстратом для ключевого фермента ПФП. При этом повышается образование лактата из пирувата, что ведет к снижению поступления пирувата в дальнейшие реакции окисления. Вследствие этого, по-видимому, ниже уровни

активности оксидоредуктаз цикла Кребса, что отражает снижение уровня аэробных окислительных процессов клетки. У больных РК, напротив, отмечалось более интенсивное расходование глюкозы в ПФП, без нарушений гликолиза. Усиление гликолиза отражает активацию энергетических процессов, вероятно, в ущерб пластическим, что снижало способность клеток не только к пролиферации, но и к синтезу специфических факторов, необходимых для формирования адекватного иммунного ответа. Повышение активности фермента пентозофосфатного пути Г6ФДГ в лимфоцитах обеспечивало клетки субстратами синтетических процессов, следовательно, синтез рибозы, РНК, белка (рецепторы, иммуноглобулины, цитокины), мог увеличиваться.

В отличие от приведенных выше данных по эритроцитам, в лимфоцитах степень активации гликолиза не столь выражена при раке. Так в эритроцитах больных раком активность ЛДГ в 3-4 раза выше нормального значения, а в лимфоцитах - только на 35-50%. Причем в норме в эритроцитах активность ЛДГ более чем в 6 раз выше, чем в лимфоцитах. Специфичность метаболизма наглядно продемонстрирована на рисунках 5.1 и 5.2, где представлены значения медиан, ошибки и 95% ДИ активности ЛДГ эритроцитов и лимфоцитов при различной локализации рака.

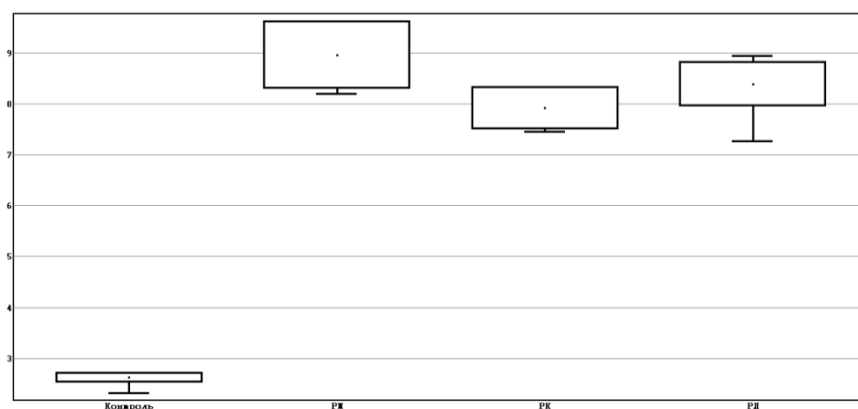


Рис. 5.1. Активность ЛДГ эритроцитов при РЖ, РК и РЛ.

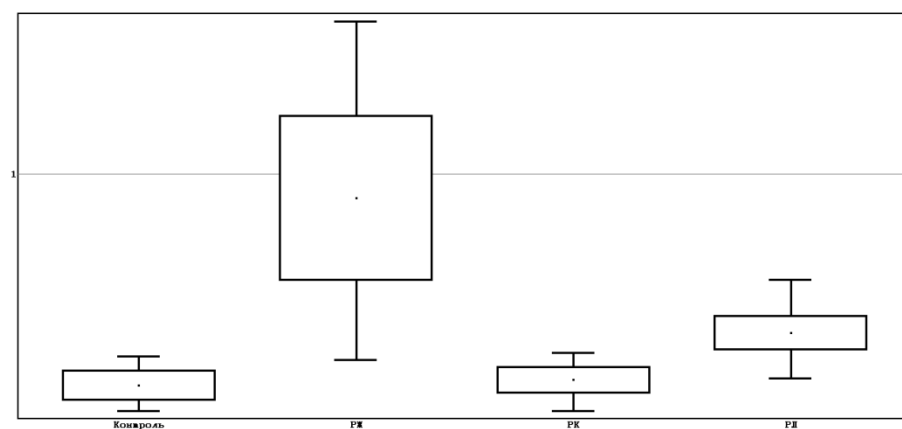


Рис. 5.2. Активность ЛДГ лимфоцитов при РЖ, РК и РЛ.

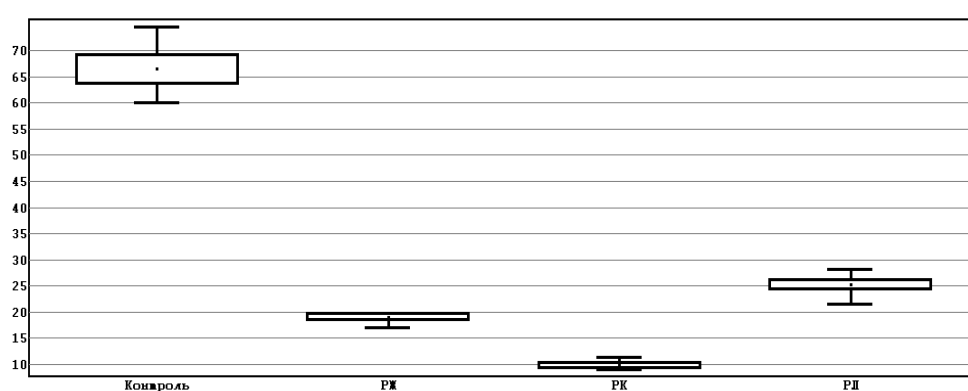


Рис. 5.3. Активность АДА лимфоцитов при РЖ, РК и РЛ.

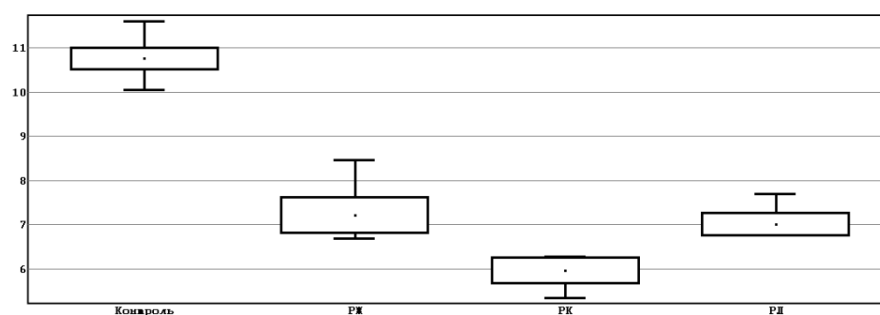


Рис. 5.4. Активность АДА эритроцитов при РЖ, РК и РЛ.

В отличие от ЛДГ, выраженность различий активности Г6ФДГ в норме в разных клетках крови не столь выражены. Активность Г6ФДГ в лимфоцитах в 2 раза выше, чем в эритроцитах.

В лимфоцитах больных раком медиана активности АДА статистически достоверно ниже контрольных значений: при РЛ в 2,6 раз ($p < 0,001$), при РЖ в 3,6

раз ($p < 0,001$), при РК в 6,9 раз ($p < 0,001$) (рис. 5.3). Интересно отметить, что в лимфоцитах при РК, на фоне отсутствия отличий в активности фермента ЛДГ, наблюдаются наиболее выраженные сдвиги в обмене аденозина. Кроме того, при раннее проведенном анализе жизнеспособности лимфоцитов, было показано, что удельный вес нежизнеспособных клеток при раке превышал значения нормы в 2 раза (см. раздел 4).

Сопоставления активностей изученных ферментов у больных РЛ, РЖ и РК свидетельствуют, что при раке и в эритроцитах и в лимфоцитах выше активность ЛДГ (соответственно - в >3 и $>1,5$ раза), Г6ФДГ (только в лимфоцитах - в 1,4 раза) - то есть в лимфоцитах в большей степени увеличивается активность ПФЦ, тогда как в эритроцитах - активность гликолиза. Другое соотношение активностей АДА зафиксировано в изученных клетках. При раке активность фермента катаболизма аденозина всегда ниже, чем в контроле: в лимфоцитах – при РЛ – в 2,6 раз, РЖ – 3,6 раз и РК - 6,9 раз (в каждом случае $p < 0,001$) (рис. 5.3), а в эритроцитах - в 1,4 раза, 2 раза и 1,6 раз соответственно (в каждом случае $p < 0,001$) (рис. 5.4).

Выявлено, что при раке различной локализации отмеченные изменения активности ферментов клеток крови также носят системный характер. Более того, степень отклонения показателей активности ферментов в лимфоцитах подобно таковым в эритроцитах, однако обладает своими особенностями (рис. 5.1-5.4).

5.2. Возрастные особенности активности ферментов углеводного и нуклеотидного обменов в эритроцитах и лимфоцитах крови при раке легких, желудка и кишечника

Состояние клеток крови играет важную роль в патогенезе рака легких, желудка и кишечника, а метаболические нарушения в этих клетках могут прямо сигнализировать о системном влиянии патологии, причем возраст является одним из значимых факторов при развитии РЛ, РЖ и РК [90, 159, 193, 212]. Известно, что с возрастом меняется активность многих ферментов [110].

С возрастом наблюдается заметное снижение пролиферации Т-лимфоцитов в ответ на различные митогены. Отмечено снижение активности основных антиоксидантных ферментов в эритроцитах пожилых людей [194] что свидетельствует о нарушении антиоксидантной защиты в стареющем организме и интенсивности перекисных липидных структур.

Возрастная динамика активности эритроцитарного фермента гликолиза - ЛДГ при всех локализациях рака, представлена в таблице 5.3.

Таблица 5.3

Возрастная динамика активности ЛДГ, Г6ФДГ, АДА в эритроцитах при РЛ, РЖ и РК, нмоль/мин·мг белка ($M \pm m$)

Возраст, лет	Контроль	РЛ	РЖ	РК
ЛДГ, нмоль/мин·мг белка				
45-59	2,69 \pm 0,02	9,2 \pm 0,4	8,2 \pm 0,6*	6,4 \pm 0,4
60-74	2,54 \pm 0,06	7,4 \pm 0,5#	9,6 \pm 0,7*	9,4 \pm 0,3#
Г6ФДГ, нмоль/мин·мг белка				
45-59	0,17 \pm 0,03	0,29 \pm 0,04	0,25 \pm 0,03	0,24 \pm 0,04
60-74	0,09 \pm 0,03	0,31 \pm 0,05	0,28 \pm 0,04	0,45 \pm 0,03#
АДА, нмоль/мин·мг белка				
45-59	13,0 \pm 1,2	8,9 \pm 1,5*	7,6 \pm 0,6*	8,4 \pm 0,4*
60-74	8,6 \pm 1,2#	5,2 \pm 1,3#	3,9 \pm 0,4#	5,8 \pm 0,5#

Примечание:

- 1- * $p < 0,05$ относительно группы контроля
- 2- # $p < 0,05$ достоверность отличий между двумя возрастными группами
- 3- В возрастных группах проведено от 15 до 30 исследований

Активность ЛДГ эритроцитов изменяется с возрастом. У людей зрелого возраста (45-59 лет) активность ЛДГ возрасла по сравнению с группой контроля (2,69 \pm 0,02) при РЛ до 9,2 \pm 0,4 ($p < 0,05$), РЖ - 8,2 \pm 0,6 ($p < 0,05$), РК -

6,4±0,4 ($p<0,05$). В более старшей возрастной группе (60-74) активность ЛДГ также возрастала по сравнению с группой контроля (2,54±0,06) при РЛ до 7,4±0,5 ($p<0,001$), РЖ - 9,6±0,7 ($p<0,001$), РК - 9,4±0,3 ($p<0,001$). Сравнение активности ЛДГ в группе контроля в возрастной группе (45-59) не отличались от значений активности в старшей возрастной группе (60-74). В тоже время при раке активность ЛДГ у лиц пожилого возраста (60-74) достоверно отличается от значений активности в группе пациентов зрелого возраста (45-59 лет). У пациентов зрелого возраста по сравнению с пожилым активность ЛДГ эритроцитов возрастает при РЖ на 12% ($p<0,05$), РК на 14% ($p<0,05$), но снижается при РЛ на 16% ($p<0,05$).

Была найдена корреляционная связь между активностью ЛДГ эритроцитов при РЖ и возрастом ($R=0,491$, $p=0,01$), в тоже время при других локализациях связь не установлена ($R=-0,340$, $p>0,05$, $R=0,390$, $p>0,05$). Вероятно, что возраст не основной фактор, влияющий на изменение ферментативной активности.

Учитывая, что эритроциты – безъядерные клетки, то усиление экспрессии возможно только на этапе созревания эритроцитов в костном мозге. Это свидетельствует о системном влиянии факторов, которые индуцируют гликолиз в эритроцитах. Изучение активности эритроцитарных ферментов гликолиза другими авторами сопоставимы с результатами наших исследований [25, 259].

Известно, что с возрастом отмечается снижение активности ключевого фермента ПФП окисления глюкозы – Г6ФДГ [55], что наряду со снижением эффективности антиоксидантных систем [24], свидетельствует об усилении ПОЛ и «старением мембран эритроцитов» [194].

Анализируя активность Г6ФДГ эритроцитов в возрастных группах 45-59 лет и 60-74 лет, Г6ФДГ не имела достоверных отличий ни в контроле (0,17±0,03 нмоль/мин·мг белка и 0,09±0,03 нмоль/мин·мг белка), ни при РЛ (0,29±0,04 нмоль/мин·мг белка и 0,31±0,05 нмоль/мин·мг белка) и РЖ (0,25±0,03 нмоль/мин·мг белка и 0,28±0,04 нмоль/мин·мг белка). Достоверность отличий значений медианы оценивались с помощью W-критерия Вилкоксона, поскольку распределение данных отличалось от нормального. Достоверные отличия были

выявлены лишь для активности Г6ФДГ при РК у лиц пожилого возраста по сравнению с контролем $0,45 \pm 0,03$ нмоль/мин•мг белка ($0,09 \pm 0,03$ нмоль/мин•мг белка) и пациентами с РК зрелого возраста.

Исследования активности эритроцитарной АДА в норме показали снижение ее активности после 50 лет (см. раздел 3). В норме у людей в группе 45-59 лет активность АДА составила $13,0 \pm 1,2$ нмоль/мин•мг белка, а в группе 60-74 лет $8,6 \pm 1,2$ нмоль/мин•мг белка, т.е. у людей пожилого возраста активность АДА была ниже на 31% по сравнению с группой зрелого возраста ($p < 0,05$). При раке было установлено достоверное снижение активности АДА во всех возрастных группах, причем наиболее выраженные изменения в старшей возрастной группе (таблица 5.3.). И так, активность АДА в группе людей 45-59 по сравнению с контролем ($13,0 \pm 1,2$ нмоль/мин•мг белка) при РЛ снижалась до $8,9 \pm 1,5$ нмоль/мин•мг белка, $p < 0,05$, при РЖ - $7,6 \pm 0,6$, $p < 0,05$, при РК - $8,4 \pm 0,4$, $p < 0,05$. Аналогичная тенденция изменений активности фермента наблюдалась в возрастной группе 60-74 лет, по сравнению с контролем ($8,6 \pm 1,2$ нмоль/мин•мг белка) при РЛ АДА снижалась до $5,2 \pm 1,3$ нмоль/мин•мг белка, $p < 0,05$, при РЖ - $3,9 \pm 0,4$ нмоль/мин•мг белка, $p < 0,05$, при РК - $5,8 \pm 0,5$ нмоль/мин•мг белка, $p < 0,05$. Сравнивая две возрастные группы при раке, следует отметить, что в возрастной группе 60-74 лет активность энзима снижается при РЛ на 27% ($p < 0,05$), при РЖ на 48 % ($p < 0,05$), при РК на 28% ($p < 0,05$). Была найдена корреляционная связь между активностью АДА эритроцитов и возрастом при РЛ ($R = -0,701$, $p = 0,01$), РЖ ($R = -0,618$, $p = 0,01$) и РК ($R = -0,504$, $p = 0,03$).

Такой характер изменений снижает возможности эритроцита поддерживать оптимальное соотношение АТФ/АМФ. Активация гликолиза, может приводить к увеличению концентрации глицеральдегид-3-фосфата в эритроцитах, который может компенсировать метаболический дефицит пентоз.

Возрастная динамика активности гликолитического фермента в лимфоцитах - ЛДГ при всех локализациях рака, представлена в таблице 5.4.

Таблица 5.4

**Возрастная динамика активности ЛДГ, Г6ФДГ, АДА в лимфоцитах
при РЛ, РЖ и РК, нмоль/мин·10⁶ клеток (Me±m)**

Возраст, лет	Контроль	РЛ	РЖ	РК
ЛДГ, нмоль/мин·10⁶ клеток				
45-59	0,44±0,04	0,53±0,04	0,78±0,14*	0,40±0,04
60-74	0,51±0,03*	0,49±0,05	0,76±0,13*	0,26±0,03#
Г6ФДГ, нмоль/мин·10⁶ клеток				
45-59	0,23±0,03	0,29±0,04	0,25±0,03	0,24±0,02
60-74	0,22±0,01	0,31±0,05	0,28±0,04	0,45±0,03#
АДА, нмоль/мин·10⁶ клеток				
45-59	84,1±8,5	30,1±1,5*	21,6±0,6*	11,2±0,4*
60-74	47,4±2,95*	22,5±1,3#	17,1±0,4#	8,7±0,5#

Примечание:

- 1- * p<0,05 относительно группы контроля
- 2- # p<0,05 достоверность отличий между двумя возрастными группами
- 3- В возрастных группах проведено от 15 до 30 исследований

Как было показано в предыдущей главе (см. раздел 3), в группе контроля увеличивается скорость реакций анаэробного гликолиза. В частности у лиц пожилого возраста активность ЛДГ на 10% выше значений активности у лиц зрелого возраста. При раке изученных нами локализаций получен противоположный характер изменений гликолитической активности. При РЛ значения активности в каждой возрастной группе не отличаются от соответствующих значений групп контроля, также не было различий между двумя возрастными группами. При РЖ повышение активности ЛДГ было более выраженным по сравнению с другими локализациями рака. В возрастной группе 45-59 лет активность была в 1,9 раз выше значений контроля, а в старшей возрастной группе 60-74 в 1,6 раз выше контроля. Т.о., активация анаэробного гликолиза более выражена у пациентов зрелого возраста. В тоже время при РК не

было достоверных отличий от контроля в возрастной группе 45-59, а в группе 60-74 активность ЛДГ наоборот снижается в сравнении с контролем на 86%, что также на 51% ниже активности фермента в группе 45-59 лет.

Результаты исследования активности ПФП окисления глюкозы не показали значимых различий по активности в разных возрастных группах, как в контроле, так и при РЛ и РЖ (таблица 5.4). Достоверные отличия в активности Г6ФДГ были установлены для пациентов с РК в пожилой возрастной группе, где активность фермента была на 85% выше значений активности у пациентов той же локализации в зрелой группе.

Установлены возрастные особенности активности АДА в лимфоцитах при раке различных локализаций. Активность катаболического фермента обмена аденозина однонаправлено снижается по сравнению с контролем, в двух возрастных группах. В группе 45-59 лет активность АДА снижается при РЛ в 2,9 раза, при РЖ в 2,2 раза, а при РК в 8 раз. В группе 60-74 года активность фермента снижалась в 2,1 раза при РЛ, в 2,9 раза при РЖ и в 5,5 раз - при РК. Если в норме активность АДА у лиц пожилого возраста в 1,8 раз ниже, чем в группе лиц зрелого возраста, то при всех изученных локализациях (РЛ, РЖ и РК) активность снижалась в 1,3 раза.

Выявленные изменения метаболизма в лимфоцитах при РЖ характеризовались низкой выживаемостью лимфоцитов (см. раздел 4). Жизнеспособность лимфоцитов у пациентов данной локализации рака была в 1,7 раз ниже показателя в норме. В то время как при РЛ не отличалась от значений контроля.

Особенности метаболических путей обмена глюкозы и аденозина у лиц пожилого возраста при РК свидетельствуют о наиболее выраженных нарушениях метаболизма в лимфоцитах, а соответственно и их дисфункции, поскольку при данной локализации рака было установлено наибольшее количество нежизнеспособных лимфоцитов – в 2,9 раз выше нормы (см. главу 4).

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 АДА при онкопатологии взаимосвязано с увеличением содержания нежизнеспособных лимфоцитов, что может быть обусловлено накоплением токсичного аденозина и способствовать его проапоптозному эффекту и нарушению иммунного ответа.

Особенно неблагоприятным, согласно полученным данным, является сочетанное снижение активности АДА в 6,9 раз и перераспределение утилизации глюкозо-6-фосфата (понижение активности ЛДГ в 1,9 раз и повышение активности Г6ФДГ в 2,1 раз), на примере 60-74 лет у больных РК (согласно % содержанию нежизнеспособных лимфоцитов).

5.3. Особенности активности ферментов углеводного и нуклеотидного обменов в эритроцитах и лимфоцитах крови при раке легких, желудка и кишечника в зависимости от стадии патологического процесса

Нами были исследованы особенности активности ЛДГ, Г6ФДГ, АДА в эритроцитах крови у пациентов с различной локализацией опухоли, которые разделили на две группы в зависимости от клинической стадии заболевания. Основываясь на TNM классификации, все пациенты были разделены на 2 группы, в первую вошли больные с T1-2N0-1M0-1, во вторую – больные с T3-4N0-3M0-1 (15 % человек с M1). Результаты исследования представлены в таблице 5.5.

Результаты проведенного корреляционного анализа показали отсутствие зависимости активности ферментов углеводного обмена в эритроцитах от стадии патологического процесса. Коэффициенты корреляции для ЛДГ при РЛ, РЖ и РК равны соответственно: $R=0,46$ ($p=0,45$), $R=0,08$ ($p=0,61$), $R=-0,04$ ($p=0,78$). Для Г6ФДГ: $R=0,13$ ($p=0,40$), $R=-0,02$ ($p=0,89$), $R=0,31$ ($p=0,06$). Для АДА существует обратная зависимость: $R=-0,610$ ($p<0,01$), $R=-0,451$ ($p=0,05$), $R=-0,623$ ($p<0,01$).

Таблица 5.5

**Активность ЛДГ, Г6ФДГ и АДА в эритроцитах при НМКРЛ, АКЖ и АКК в зависимости от стадии заболевания, нмоль/мин·мг белка
(Me±m(95%ДИ))**

Контроль (n=34)	НМКРЛ		АКЖ		АКК	
	I-II стадия (n=16)	III-IV стадия (n=19)	I-II стадия (n=6)	III-IV стадия (n=19)	I-II стадия (n=9)	III-IV стадия (n=18)
Активность ЛДГ, нмоль/мин·мг						
2,69±0,15 (2,19-3,28)	8,2±1,0* (4,9-10)	7,1±1,7* (2,3-10,3) p=0,963	8,2±1,0 (7-10,8)*	7,4±1,9* (2,5-14,2) p=0,983	8,7±1,3* (5,5-10,9)	11,9±1,8* (8,8-16) p=0,106
Активность Г-6-ФДГ, нмоль/мин·мг						
0,10±0,01 (0,05-0,13)	0,18±0,05 (0,09-0,37)	0,16±0,05 (0,04-0,3) p=0,333	0,09±0,06 (0,01-0,35)	0,16±0,08 (0,06-0,42) p=0,454	0,13±0,1 (0,09-0,55)	0,10±0,08 (0,035-0,19) p=0,227
Активность АДА, нмоль/мин·мг						
12,8±1,7 (9,42-19,65)	7,6±0,8* (4,4-8,4)	3,9±0,9*# (2,85-5,5) p=0,015	5±0,8 (4-8,1)*	3,9±0,5*# (3,8-4,5) p=0,013	8,0±0,3* (7,95-8,4)	4,50±0,85* # (3-5,36) p<0,001

Примечание:

- 1- * p<0,05 относительно группы контроля
- 2- # - значение p между группами по стадиям

Учитывая неоднородность показателей углеводного обмена в эритроцитах у больных раком различных локализаций, не связанного со стадией процесса, определенный интерес для нас представляло изучение особенностей ферментативной активности от патоморфологического типа опухоли. В дальнейшем исследовании для более корректного анализа данных было принято решение использовать в выборке пациентов с немелкоклеточным раком легких (НМКРЛ), аденокарциномой желудка (АКЖ) и кишечника (АКК) (таблица 5.5). Хотя такой подход привел к сокращению количества случаев в выборках.

Результаты исследования активности ключевых для эритроцитов ферментов метаболизма глюкозы – ЛДГ и Г6ФДГ представлены в таблице 5.5. В эритроцитах крови при всех локализациях рака установлена гиперактивация фермента гликолиза – ЛДГ, причем при НМКРЛ и АКЖ максимальные значения медианы активности отмечались на ранних клинических стадиях, а при АКК, наоборот, на поздних. При этом достоверные различия между двумя группами не установлены ни для одной из локализаций ($p > 0,05$ во всех случаях). Анализируя особенности протекания реакций ПФП окисления глюкозо-6-фосфата по активности Г6ФДГ во всех группах больных, не обнаружили отличий от контроля ($p > 0,05$ во всех случаях).

В недавних исследованиях [256] было установлено, что в норме глутатион (Г - SH) восстанавливается благодаря НАДФН2 из ПФП, в условиях гипоксии, этот процесс снижается и активируется энергозатратный синтез Г - SH *de novo*. Известно, что метаболический путь глюкозы - через гликолиз или ПФ определяется состоянием мембранного белка полосы 3. Окислительное повреждение этого белка блокирует ПФП и снижает продукцию НАДФН2, усугубляя дисфункцию Г - SH. Вероятно, это приводит к повышенной продукции АТФ, по данным литературы, необходимой в реакциях активного транспорта, ресинтеза глутатиона. Повышается также уровень 2,3 - ДФГ – регулятора оксигенации. Отсутствие изменений в активности Г6ФДГ эритроцитов свидетельствует о неадекватном образовании НАДФН2 в условиях его повышенной потребности.

Анализируя 1-ю группу (I-II стадия) активность АДА снижалась по сравнению с контролем при НМКРЛ, АКЖ и АКК в 1,4, 2,2, 1,4 раза соответственно (во всех группах $p < 0,05$). Во 2-й группе (III-IV стадия) снижение активности АДА было наиболее выраженным при НМКРЛ - в 2,4 раза ($p = 0,015$), при АКЖ - в 2,6 раза ($p = 0,013$), АКК - в 2,2 раза ($p < 0,001$).

При НМКРЛ, АКЖ и АКК на разных стадиях заболевания установлено достоверное снижение активности фермента катаболизма аденозина, причем минимальные значения активности наблюдаются при наиболее агрессивных

стадиях рака. Снижение активности АДА в эритроцитах свидетельствует о накоплении уровней аденозина, что подтверждается повышением молярной концентрации аденозина при раке изученных локализаций (см. раздел 4). Избыток аденозина, как известно, коррелирует с повышением патологических форм эритроцитов со сниженной жизнеспособностью.

В эритроцитах на разных стадиях рака наблюдается переход метаболизма глюкозы от ПФП к гликолитическому.

Таким образом, описанному в литературе «синдрому старения эритрона» могут способствовать установленные нами особенности ферментативной активности в эритроцитах пациентов при раке различной локализации.

Результаты исследования активности ЛДГ, Г6ФДГ, АДА в лимфоцитах крови у пациентов с различной локализацией опухоли, которые также разделили на две группы в зависимости от клинической стадии заболевания: 1-я группа (I-II стадия) и 2-я группа (III-IV стадия) представлены в таблице 5.6.

Таблица 5.6

Активность ЛДГ, Г6ФДГ, АДА в лимфоцитах при НМКРЛ, АКЖ и АКК в зависимости от стадии, нмоль/мин·10⁶ клеток (Me±m(95%ДИ))

Контроль (n=34)	НМКРЛ		АКЖ		АКК	
	I-II стадия (n=16)	III-IV стадия (n=19)	I-II стадия (n=6)	III-IV стадия (n=19)	I-II стадия (n=9)	III-IV стадия (n=18)
Активность ЛДГ, нмоль/мин·10 ⁶ клеток						
0,42±0,04 (95% ДИ 0,35-0,5)	0,41±0,03 (0,28-0,45) W1=368,5 , p=0,261	0,59±0,04 ^{*≠} (0,45-63) W1=255,5. p<0,001. W2=264,0. p<0,001.	0,42±0,06 (0,21-0,46) W1=116,0 , p=1,000.	1,10±0,17 [*] [≠] (0,51-1,5) W1=289,5 p=0,001. W2=59,0. p=0,004.	0,30±0,04 (0,2-0,48) W1=206,0, p=0,172.	0,19±0,06 (0,17-0,51) W1=253,5 , p=0,129. W2=182,5 , p=0,346.
Активность Г-6-ФДГ, нмоль/мин·10 ⁶ клеток						
0,22±0,01 (0,19-0,25)	0,28±0,05 (0,17-0,5) W1=301,0 , p=0,311.	0,31±0,05 (0,21-0,51) W1=248,5, p=0,253.	0,20±0,06 (0,11-0,43) W1=71,0, p=0,211.	0,48±0,10 [*] [≠] (0,32-0,53) W1=480,5 p=0,002. W2=40,5. p=0,005.	0,29±0,06 (0,17-0,41) W1=273,5, p=0,474.	0,30±0,06 (0,2-0,5) W1=336,0 p=0,045. W2=280,0 , p=0,610.
Активность АДА, нмоль/мин·10 ⁶ клеток						
52,1±6,7 (43-72)	28,3±1,3 [*] (95% ДИ 23,87-30,15) W1=116,0 , p<0,001	19,5±1,4 ^{*≠} (95% ДИ 15,1-23,3) W1=48,0, p<0,001	19,5±0,7 [*] (95% ДИ 18,84-22,6) W1=90,0, p<0,001	16,9±0,4 ^{*≠} (95% ДИ 16,1-17) W1=46,5, p<0,001	10,40±0,45 [*] (95% ДИ 9,3-11,2) W1=59,0, p<0,001	8,2±0,66 ^{*≠} (95% ДИ 5,02-8,65) W1=45, p<0,001

Примечание:

- 1- * p<0,05 относительно группы контроля
- 2- ^{*≠} - значение p между группами по стадиям
- 3- W1 – W-критерий относительно группы контроля
- 4- W2 - W-критерий относительно стадий для каждой локализации

Результаты проведения корреляционного анализа показали существование зависимости лишь для активности АДА лимфоцитов и стадией онкозаболевания при всех локализациях рака, эта зависимость обратная (R=-0,610, p<0,01).

Анализируя 1-ю группу больных НМКРЛ, было установлено достоверное снижение активности АДА по сравнению с контролем в 2 раза: 28,3±1,3 нмоль/мин на 10⁶ клеток (52,1±6,7 нмоль/мин на 10⁶ клеток, p<0,001). Активности

ферментов углеводного обмена - ЛДГ и Г6ФДГ не имели значимых отличий по сравнению с контролем ($W=368,5$, $p=0,261$ и $W=301,0$, $p=0,311$).

Исследования активности изучаемых ферментов во 2-й группе показали, что активность АДА снижалась в 3,4 раза по сравнению с группой контроля ($W=46,5$, $p<0,001$). Активность ЛДГ достоверно выше контроля в 1,6 раз ($W=255,5$, $p<0,001$). В то же время не было выявлено достоверных различий центральных тенденций активности Г6ФДГ ($W=248,5$, $p=0,253$) у пациентов 2-й группы.

Анализируя 1-ю группу больных АКЖ, было установлено достоверное снижение активности АДА по сравнению с контролем в 3 раза ($W=90,0$, $p<0,001$). Активности ферментов углеводного обмена - ЛДГ и Г6ФДГ не имели значимых отличий по сравнению с контролем ($W=116,0$, $p=1,000$ и $W=71,0$, $p=0,211$).

Исследования активности изучаемых ферментов во 2-й группе АКЖ показали, что активность АДА снижалась практически в 3,4 раза по сравнению с группой контроля ($W=48,0$, $p<0,001$). Активность ЛДГ достоверно выше контроля в 2,4 раза ($W=289,5$, $p=0,001$). В то же время выявлено повышение активности Г6ФДГ в 2,1 раза ($W=480,5$, $p=0,002$) у пациентов 2-й группы.

В 1-й группе больных АКК установлено достоверное снижение активности АДА по сравнению с контролем в 5,6 раз ($W=59,0$, $p<0,001$). Активности ферментов углеводного обмена - ЛДГ и Г6ФДГ не имели значимых отличий по сравнению с контролем ($p=0,172$ и $p=0,474$).

Исследования активности изучаемых ферментов во 2-й группе АКК показали, что активность АДА снижалась в 6,8 раз по сравнению с группой контроля ($W=45$, $p<0,001$). Не было выявлено достоверных различий центральных тенденций активности ЛДГ от значений контроля ($W=206,0$, $p=0,172$). Активность Г6ФДГ повышалась на 64% ($W=336,0$ $p=0,045$) у пациентов 2-й группы.

Изменение интенсивности важнейших для лимфоцита метаболических путей отражает изменения функционального состояния лимфоцитов при онкопатологии. Активность АДА в лимфоцитах имеет универсальный характер

изменений и зависит от распространенности патологического процесса, вероятно, способствует апоптозному действию избыточного аденозина и нарушению иммунного ответа как на ранних, так и на поздних этапах развития рака изученных локализаций. Согласно результатам, ферменты обмена глюкозы не сопряжены со стадией рака, следовательно, со степенью тяжести онкопатологии. Установленное нами снижение активности АДА сопряжено с развитием опухолевой интоксикации при распространенных формах рака различной локализации. В свою очередь, это может быть связано с иммуносупрессией. Поскольку известно, что аденозин нарушает дифференцировку В- и Т-лимфоцитов.

Учитывая установленные особенности обмена лимфоцитов у больных различной локализации рака в зависимости от стадии, считаем активность АДА более чувствительным показателем, сопряженным с дисфункцией лимфоцитов. Полагаем, что низкая активность АДА - фактор патогенеза иммуносупрессии при развитии рака, обуславливающий развитие токсических эффектов аденозина в лимфоцитах.

В эритроцитах на разных стадиях рака наблюдается переход метаболизма глюкозы от ПФП к гликолитическому. Во 2 - й группе повышение активности дегидрогеназ лимфоцитов может указывать на усиление их энергообмена и потребности в НАДФН+Н⁺, вероятно, из - за нарастания опухолевой интоксикации.

5.4. Показатели активности ферментов обмена глюкозо-6-фосфата и аденозина в плазме крови при раке легких, желудка и кишечника в зависимости от возраста и стадии заболевания

Показатели активности ферментов в плазме крови представляют собой классический объект исследования, поскольку отражают их активность в опухолевом узле.

Статистические отличия в активности исследуемых ферментов плазмы крови при раке различных локализаций от контрольной группы показаны в таблице 5.7.

Таблица 5.7.

Значение W-критерия Вилкаксона и вероятность ошибки (p) при сравнении с контрольной группой активности ЛДГ, Г6ФДГ и АДА в плазме у больных раком различной локализации

Активность фермента, нмоль/мин*мг белка	W-критерий	Вероятность ошибки (p)
ЛДГ	330,0	p<0,001
Г6ФДГ	702	p=0,080
АДА	199,0	p<0,001

Активность ЛДГ плазмы крови увеличена в 4 раза – при РЛ, в 5 раз при РЖ, в 4,8 раза при РК (при всех локализациях $p<0,001$), а Г6ФДГ – в 1,2 раза ($p=0,006$), 1,5 раза ($p<0,001$), 1,8 раза ($p=0,047$) соответственно (таблица 5.7).

Причем у всех больных раком показатели плазменной активности ЛДГ и Г6ФДГ статистически достоверно и прямо ($R = 0,40$, $p < 0,05$) коррелируют друг с другом.

Активность АДА в плазме крови больных РЛ, РЖ и РК однонаправлено увеличивалась в 1,6, 3,8 и 2,4 раза соответственно (при всех локализациях $p<0,001$) (таблица 5.7). Плазменная активность АДА при раке обратно коррелирует с активностью в эритроцитах и лимфоцитах, также с уровнем аденозина в плазме и эритроцитах. Активация АДА в плазме крови может быть обусловлена повышенной продукцией ВНиСММ, в том числе за счет пуринов. Это подтверждает патогенетическую связь между перегрузкой гликокаликса эритроцитов и напряженностью их энергообмена.

Ранее было показано наличие возрастных особенностей активности изучаемых ферментов в контрольной группе. Коэффициенты корреляции активности ЛДГ, Г6ФДГ и АДА плазмы крови от возраста равны соответственно: $R=0,404$ ($p=0,002$), $R=-0,470$ ($p=0,001$), $R=0,303$ ($p=0,004$).

Для установления возрастных особенностей активности исследуемых ферментов, в плазме крови были исследованы активности гликолитического фермента – ЛДГ, фермента ПФП окисления глюкозы – Г6ФДГ и катаболический фермент аденозина – АДА в плазме крови больных РЛ, РЖ, РК в двух возрастных группах зрелой (45-59 лет) и пожилой (60-74 лет) (таблица 5.8).

Таблица 5.8

Возрастная динамика активности ЛДГ, Г6ФДГ, АДА в плазме крови при РЛ, РЖ и РК, нмоль/мин·мг белка (Me±ошибка медианы)

Возраст, лет	Контроль	РЛ	РЖ	РК
ЛДГ, нмоль/мин·мг белка				
45-59	1,70±0,12	2,65±0,39 W1=114,0, p<0,001.	2,43±0,25 W1=124,0, p<0,001.	2,63±0,28 W1=159,5, p=0,027.
60-74	1,99±0,13 W1=167,5, p=0,166.	2,93±0,43 W1=109,0, p<0,001. W2=222,5, p=0,678.	5,51±0,54 W1=91,0, p<0,001. W2=123,0, p<0,001.	5,27±0,45 W1=91,0, p<0,001. W2=142,0, p<0,001.
Г6ФДГ, нмоль/мин·мг белка				
45-59	0,11±0,005	0,17±0,03 W1=143,0. p<0,001.	0,18±0,03 W1=150,0, p<0,001.	0,49±0,05 W1=120,0, p<0,001.
60-74	0,16±0,009 W1=122,0, p<0,001.	0,21±0,03 W1=139,0, p=0,622. W2=222,5, p=0,678.	0,20±0,04 W1=208,0, p=0,308. W2=121,0, p=0,153.	0,33±0,05 W1=109,0, p=0,040. W2=181,0, p=0,032.
АДА, нмоль/мин·мг белка				
45-59	2,4±0,02	4,90±0,16 W=190,0. p<0,001.	7,10±0,14 W=171,0, p<0,001.	4,9±0,4 W=171,0, p<0,001.
60-74	1,6±0,2 W1=274,0, p=0,005.	4,80±0,33 W1=190,0. p<0,001. W2=348,0, p=0,511.	6,96±0,17 W1=171,0, p<0,001. W2=278,0, p=0,355.	7,2±0,5 W1=171,0, p<0,001. W2=274,0, p=0,291.

Примечание:

- 1) W1 – W-критерий относительно группы контроля того же возраста.
- 2) W2 - W-критерий относительно двух возрастных групп при одной локализации рака.
- 3) В возрастных группах проведено от 15 до 30 исследований.

Активность гликолитического фермента - ЛДГ в плазме крови у больных раком различной локализации достоверно возрастала, по сравнению с контролем. В контроле медиана значений активности ЛДГ в группе 45-59 лет не имела достоверных отличий в сравнении с группой 60-74 года ($W=167,5$, $p=0,166$). При РЛ активность ЛДГ достоверно повышалась по сравнению с контролем в группе 45-59 на 67% ($W=114,0$, $p<0,001$), а в группе 60-74 года на 58% ($W=109,0$, $p<0,001$). Сравнение значений активности в двух возрастных группах больных РЛ не показало значимых отличий ($W=222,5$, $p=0,678$). Активность ЛДГ при РЖ в группе 45-59 лет повысилась на 47% ($W=124,0$, $p<0,001$), а в группе 60-74 лет на 185% ($W=91,0$, $p<0,001$). Активность фермента при РЖ в группе 60-74 года была в 2,3 раза выше ($W=123,0$, $p<0,001$) значения активности в группе 45-59 лет. Подобный характер изменений прослеживался и при РК. В группе 45-59 лет активность ЛДГ была на 60 % выше значений контроля ($W=159,5$, $p=0,027$), а в группе 60-74 года на 170 % выше контрольных значений в соответствующей возрастной группе ($W=91,0$, $p<0,001$). В группе 60-74 года активность ЛДГ в 1,8 раза выше значения активности в группе 45-59 лет ($W=142,0$, $p<0,001$).

Активность АДА плазмы крови при раке обратно коррелирует с активностью в эритроцитах и лимфоцитах, также с уровнем аденозина в плазме и эритроцитах. В общей когорте больных раком результаты корреляционного анализа показали прямую зависимость между активностью АДА плазмы крови и активностью ЛДГ эритроцитов ($R = 0,54$, $p < 0,05$). Эта зависимость согласуется с данными литературы об активации анаэробного гликолиза в клетках, гиперпродукции лактата и аденозина при канцерогенезе. Молочная кислота опухолевого происхождения подавляет функцию Т-клеток и естественных киллеров (NK) и, таким образом, иммунный надзор за опухолью [227], являясь мощным ингибитором функции и выживаемости Т- и NK-клеток, что приводит к ускользанию от опухолевого иммунитета [121]. Как известно, экспрессия гликолитических ферментов стимулируется фактором HIF-1, который активируется при гипоксии. А гипоксические явления характерны для возрастного организма, и являются элементом патогенеза рака изученных

локализаций. Кроме того, активация гликолиза при онкозаболевании хорошо известна, причем ее влияние на организм – системный и реализуется, в том числе через механизмы адаптации к гипоксии. Избыточная продукция лактата приводит к ацидозу – биологическому маркеру гипоксии, патологическому ангиогенезу и производству опухоли прокоагулянтных факторов приводящих к эпизодам ишемии и микротромбозу в опухоли. Ацидоз также повышает агрегацию тромбоцитов, и особенно в пожилом возрасте.

Старение сопровождается изменением скорости ПФП окисления глюкозо-6-фосфата, что подтверждается возрастанием активности Г6ФДГ плазмы в группе контроля 60-74 года по сравнению с группой 45-59 лет ($W=122,0$, $p<0,001$). У лиц зрелого возраста сопоставляя значение активности в контроле и при патологии, установлено достоверное увеличение активности фермента при РЛ на 74% ($W=143,0$, $p<0,001$), при РЖ на 83% ($W=150,0$, $p<0,001$), при РК на 370% ($W=120,0$, $p<0,001$). Максимальное повышение отмечалось при раке кишечника для лиц 45-59 лет. У лиц пожилого возраста при РЛ и РЖ стиралась возрастная динамика: достоверных изменений между группами не наблюдалось (соответственно в группах РЛ и РЖ - $W=139,0$, $p=0,622$ и $W=208,0$, $p=0,308$). В тоже время установлено достоверное повышение активности Г6ФДГ в группе 60-74 года по сравнению с контролем на 124% ($W=109,0$, $p=0,040$). Также, только при РК получены отличия в активности фермента между двумя возрастными группами, активность Г6ФДГ в зрелом возрасте в 1,4 раза выше активности в пожилой группе пациентов ($W=181,0$, $p=0,032$).

Установлено, что активность АДА в плазме крови у здоровых людей пожилого возраста в 1,5 раза ниже, чем у лиц зрелого возраста ($W=274,0$, $p=0,005$). При раке изученных локализаций показано достоверное увеличение активности катаболического фермента обмена аденозина по сравнению с контрольными значениями в соответствующих возрастных группах. В возрастной группе 45-59 лет установлено достоверное повышение активности АДА при РЛ на 109% ($W=190,0$, $p<0,001$), при РЖ на 199% ($W=171,0$, $p<0,001$), при РК на 119% ($W=171,0$, $p<0,001$). В возрастной группе 60-74 года активность АДА

повышалась при РЛ на 185% ($W=190,0$, $p<0,001$), при РЖ на 296% ($W=171,0$, $p<0,001$), при РК на 328% ($W=171,0$, $p<0,001$). Следует отметить, что наиболее выраженные изменения активности среди изученных ферментов в плазме крови при раке различных локализаций характерны для АДА. Однако, небыли получены достоверные отличия при раке всех локализаций между группой зрелого и пожилого возраста.

Таблица 5.9

Активность ферментов обмена глюкозо-6-фосфата и аденозина в плазме крови больных НМКРЛ, АКЖ и АКК в зависимости от клинической стадии, нмоль/мин·мг белка (Me±ошибка медианы)

Контроль	НМКРЛ		АКЖ		АКК	
	I-II стадия (n=17)	III-IV стадия (n=23)	I-II стадия (n=6)	III-IV стадия (n=28)	I-II стадия (n=18)	III-IV стадия (n=25)
ЛДГ, нмоль/мин·мг						
1,82±0,0 ₉	2,62±0,35* W1=376,5, p<0,001	2,80±0,41* W1=380,5, p<0,001. W2=632,0, p=0,915.	2,6±0,26* W1=248,5 p<0,001.	6,96±0,42* W1=210,0, p<0,001. W2=214,0, p<0,001.	2,33±0,53* W1=304,0 , p=0,004.	4,1±0,43* W1=213,5, p<0,001. W2=303,5. p=0,004.
Г-6-ФДГ, нмоль/мин·мг						
0,13±0,0 ₁	0,19±0,01* W1=171,0. p<0,001.	0,20±0,02* W1=153,0. p<0,001. W2=244,5, p=0,068.	0,19±0,01* W1=157,0 p<0,001.	0,21±0,01* W1=156,0. p<0,001. W2=270,5, p=0,352.	0,17±0,01* W1=189,0 p<0,001.	0,21±0,01* W1=159,0. p<0,001. W2=232,0, p=0,024.
АДА, нмоль/мин·мг						
2,32±0,1 ₈	5,06±0,12* W1=210,0. p<0,001.	4,90±0,16* W1=210,0. p<0,001. W2=230,0, p=0,600.	7,93±0,45* W1=210,0 p<0,001.	6,85±0,16* W1=210,0. p<0,001. W2=200,0. , p=0,115.	7,90±0,49* W1=210,0 p<0,001	6,8±0,22* W1=210,0. p<0,001 W2=265,0, p=0,171.

Примечание:

- 1) * $p<0,05$ относительно группы контроля
- 2) ≠ - значение p между группами по стадиям
- 3) W1 – W-критерий относительно группы контроля
- 4) W2 - W-критерий относительно стадий для каждой локализации

При изучении зависимости активности ЛДГ, Г6ФДГ, АДА в плазме крови больных раком различной локализации от клинической стадии заболевания был проведен корреляционный анализ. Полученные коэффициенты ранговой корреляции Спирмена при НМКРЛ, АКЖ, АКК для ЛДГ составили соответственно $R=0,423$ ($p=0,02$), $R=0,30$ ($p=0,31$), $R=0,30$ ($p=0,31$). Для активности Г6ФДГ плазмы крови связь отсутствует у всех больных изученных локализаций, что подтверждается значением коэффициентов корреляции: $R=0,02$ ($p=0,93$), $R=-0,07$ ($p=0,83$), $R=0,07$ ($p=0,83$). В тоже время, для АДА: $R=-0,08$ ($p=0,71$), $R=-0,40$ ($p=0,03$) и $R=-0,40$ ($p=0,029$).

Исследования гликолитического фермента ЛДГ в плазме крови больных раком различных локализаций показали, что на поздних клинических стадиях заболевания (III-IV) активность фермента значительно выше таковой на ранних стадиях (I-II) для АКЖ и АКК (таблица 5.9). Так при АКЖ активность ЛДГ на ранних стадиях достоверно отличается от контроля в 1,5 раза ($W=248,5$, $p<0,001$), а на поздних стадиях в 3,9 раза выше контрольных значений ($W=210,0$, $p<0,001$) и в 2,6 раза выше значений активности на ранних стадиях ($W=214,0$, $p<0,001$). При кишечной локализации рака на ранних стадиях достоверно отличается от контроля в 1,5 раза ($W=304,0$, $p=0,005$), а на поздних стадиях в 2,4 раза выше контрольных значений ($W=213,5$, $p<0,001$) и в 1,6 раза выше значений активности на ранних стадиях ($W=303,5$, $p=0,004$). При НМКРЛ на ранних стадиях активность ЛДГ по сравнению с контролем выше в 1,6 раз ($W=376,5$, $p<0,001$), а на поздних в 1,7 раз ($W=380,5$, $p<0,001$), но достоверных отличий между двумя группами не было найдено ($W=632,0$, $p=0,915$).

Исследования активности ключевого фермента ПФП окисления глюкозо-6-фосфата показали, что как на ранних этапах развития рака, так и на поздних, активность Г6ФДГ достоверно выше значений контроля ($p<0,001$, при всех локализациях рака). Активность Г6ФДГ не зависит от клинической стадии процесса при НМКРЛ ($p=0,068$) и АКЖ ($p=0,352$), за исключением АКК, при которой активность фермента на поздних стадиях в 1,2 раза выше, чем на ранних стадиях рака ($p=0,024$).

Активность ключевого фермента катаболизма аденозина достоверно выше контрольных значений, как на ранней, так и на поздней стадии НМКРЛ, АКЖ и АКК ($p < 0,001$, при всех локализациях рака), но не отличается в подгруппах по стадиям ($p > 0,05$, при всех локализациях рака). Это также указывает на специфичность установленных изменений ее активности для эритроцитов и лимфоцитов, а именно обратную корреляцию со стадиями при изученных локализациях опухоли.

Полученные результаты были опубликованы в следующих работах:

1. 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. - №и2011 00022; заявл. 04.01.2011; опубл. 17.07.2011, Бюл. №13. – 4 с.

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.

3. Borzenko B.G., Bakurova E.M., Mironova K.A. The possibility of the enzymatic test application for efficacy estimation of 5-fluoruracil in patients with gastrointestinal cancer / Borzenko B.G., Bakurova E.M., Mironova K.A. // Клінічна фармація. - 2013. - Т. 17, № 4. - С. 12-14.

4. Перспективы индивидуализации химиотерапии фторпиримидинами гастроинтестинального рака / Борзенко Б.Г., Бакурова Е.М., Миронова К.А. и др. // Университетская клиника. - 2013. - Т. 9, № 1. - С. 62-64.

5. Bakurva E.M. Disorders of purines and pyrimidines metabolism in human gastrointestinal tract cancer (EU, POLAND) / Bakurva E.M., Mironova K.A., Borzenko B.G // Curr. Issues Pharm. Med. Sciences. – Vol. 26, № 4. – P. 369 – 371.

6. Role of Thymidine kinase and Thymidine Phosphorylase as Enzymatic Test for Efficacy of Oncological Patients Treatment / Borzenko B.G., Bakurova E.M., Mironova K.A., Tursunova Y.D., Dumanskiy Y.V // (USA, электронный ресурс) Metabolomics. –2013.- Vol. 3:123. doi:10.4172/2153-0769.1000123

7. Borzenko B.G. A Double-Function of PD-ECGF/TP Protein that Predict Response to Target Chemotherapy / Borzenko B.G., Bakurova E.M, Mironova K.A. // (USA, электронный ресурс) Metabolomics. –2015.- Vol. 53: e136. doi: 10.4172/2153-0769.1000e136

8. Role of Thymidine Phosphorylase/Platelet-Derived Endothelial Cell Grwth Factor in Health and Cancer Grwth / Borzenko B.G., Bakurova E.M., Mironova K.A., et.al. // (USA, электронный ресурс) JJEЕ. – 2015. – Vol. 1(2): 008.

9. 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

10. Миронова К.А. Нарушения гомеостаза аденозина у онкобольных / Миронова К.А. // Новообразование. – 2017. – Т. 16, №. 1. С. 51-54. ISSN 2521-117X. <<http://donetsk-onco.com/neoplasm/index.php/Neoplasm/article/view/6>

11. 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.

12. 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.

13. 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. // РИНЦ 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.

14. Вікові особливості обміну червонокрівців, що можуть привести до

порушень їх функції / Я.Г. Жебеленко, К.А. Миронова, С.А. Зуйков, К.В. Муравська //Програма та матеріали 71 Міжнародної конференції молодих вчених «Актуальні проблеми клінічної, експериментальної, профілактичної медицини, стоматології та фармації» (23-24.04.2009). – Донецьк, 2009. – С. 22-23.

15. Cellular interactions during gastrintestinal cancer development / Borzenko B.G., Bakurva E.M., Mirnova K.A. et.al. // 17th-ECCO -38th- ESMO – 32nd-ESTR Eurpean Cancer Congress. Prgramme book (Европейский конгресс, Нидерланды). - 2013, Amsterdam, the Netherlands.- P. 259.

16. 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.

17. 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. 22 апреля.- СПб.: Изд-во СПбГУ, 2017. — 680 с. [Фундам. наука клин. мед. — 2017. — т. 20. — с. 366–367].

18. Миронова К.А., Бакурова Е.М. 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. 5-7 октября . – Рязань: ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России. – 2017. С. 126-127.

19. Миронова К.А. Дисметаболические процессы и дезорганизация гликокаликса эритроцитов у больных раком легких / Миронова К.А. // Материалы Международной научной конференции студентов и молодых ученых Донецкие чтения 2017: Русский мир как цивилизационная основа научно-образовательного и культурного развития Донбасса: (Донецк, 17-20 октября 2017 г.). – Том 2:

Химико-биологические науки / под общей редакцией проф. С.В. Беспаловой. – Донецк: Изд-во ДонНУ. - 2017. С. 307– 308.

20. 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.

21. Пасечник Т.А., Миронова К.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.

22. Исследование влияния мочевой кислоты на активность лактатдегидрогеназы эритроцитов / Филиппаки И.В., Зуйков С.А., Миронова К.А. и др. // Университетская клиника. –Донецк. - 2019. С. 428.

23. Пасечник Т.А., Миронова К.А. Инновационные пути преодоления множественной лекарственной резистентности злокачественных новообразований / Пасечник Т.А., Миронова К.А. // Химические проблемы Донбасса 2019: Сборник тезисов докладов Республиканской научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых „Химические проблемы Донбасса” / Редколлегия: А.В. Белый (отв. ред.) и др. - г. Донецк. - 2019 г. С. 60-61.

24. Миронова К.А., Бакурова Е.М. Нарушение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в клетках крови у пациентов с онкопатологией / Миронова К.А., Бакурова Е.М. // РИНЦ Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Современные достижения химико-биологических наук в профилактической и клинической медицине». - РФ, Санкт-Петербург. - 2020. С. 126-131.

25. 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.

26. 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.

27. Миронова К.А., Бакурова Е.М. 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.

28. Миронова К.А. Стадия-зависимое изучение активности дегидрогеназ углеводного обмена в крови больных раком легких / Миронова К.А. // Материалы IV международного медицинского форума Донбасса «Наука побеждать...Болезнь», посвященного 90-летию ДонНМУ им. М. Горького Донецк: ГОО ВПО ДОННМУ ИМ. М. ГОРЬКОГО. 12-13 ноября 2020. - С. 352.

РАЗДЕЛ 6

УНИВЕРСАЛЬНОСТЬ ИЗМЕНЕНИЙ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ МЕМБРАН КЛЕТОК КРОВИ ПРИ РАКЕ РАЗЛИЧНЫХ ЛОКАЛИЗАЦИЙ

Ранее мы указывали на неоднородность показателей углеводного обмена в эритроцитах у больных раком различных локализаций.

В эритроцитах кластерный анализ абсолютных значений ферментативной активности выделил в каждой локализации по два кластера. 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 выделены две группы: 1-я – основная, так как в нее вошло большинство случаев рака (кластер I) и 2-я (кластер II). В первую вошли 40 больных РЖ и РК (РЖКТ, 95% АК) и 18 РЛ (60% НАКЛ и 40 АКЛ) с повышенной активностью ферментов, во вторую – 28 больных РЖ и РК (РЖКТ 100% АК) и 16 - РЛ (70% НАКЛ и 30 АКЛ) с низкими значениями активности изучаемых ферментов. Сопоставление активности энзимов у пациентов этих подгрупп свидетельствует о статистически достоверных отличиях в показателях метаболизма глюкозы и аденозина в эритроцитах онкобольных (см. таблицу 6.1).

Таблица 6.1

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

Активность фермента	Контроль (n=34)	РЛ		РЖКТ	
		I (n=18)	II (n=16)	I (n=40)	II (n=28)
ЛДГ	2,69±0,15 (2,19-3,28)	↑↑10,79±0,67 (9,58-14,33) p<0,001	↑4,1±0,75 (2,62-6,41) p=0,012	↑↑11,14±0,4 (9,6-12,3) p<0,001	↑7,2±0,85 (3,94-8,96) p<0,001
Г6ФДГ	0,10±0,01 (0,05-0,13)	↑ 0,16±0,06 (0,12-0,37) p<0,001	↓ 0,04±0,01 (0,032-0,07) p=0,006	↑ 0,32±0,06 (0,17-0,51) p<0,001	↓ 0,06±0,01 (0,03-0,08) p=0,020
АДА	12,8±1,7 (9,4-19,7)	↓8,37±1,5 (4,7-10,5) p<0,001	↓↓2,7±0,5 (2,7-3,95) p<0,001	↓8,95±0,75 (8,2-10,9) p<0,001	↓↓3,6±0,55 (2,9-5,6) p<0,001

В 1-й группе активность ЛДГ не зависимо от локализации опухоли имела максимально высокие значения, достоверно превышая не только контрольные значения, но и значения 2-й подгруппы. Активность Г6ФДГ изменялась в группах достоверно, но разнонаправлено (табл. 6.1). Так в 1-й гр. она достоверно превышала контроль при любой локализации рака. Во 2-й гр. значения активности Г6ФДГ эритроцитов у пациентов с раком различных локализаций была минимальной, как по сравнению с контролем, так и с активностью в основной группе.

Не зависимо от локализации процесса в эритроцитах пациентов, вошедших по результатам кластерного анализа во 2-е группы, нами установлено преимущественное потребление глюкозо-6-фосфата в гликолизе. Минимальная активность Г6ФДГ в этой группе ведет к дефициту НАДФН₂.

Активность АДА снижалась во всех группах. Ее снижение наиболее выражено во 2-й гр. больных (таблица 6.1).

Нами было установлено, что АДА обратно коррелирует с уровнем аденозина в эритроцитах: при РЛ - $R=0,451$ ($p=0,05$), РЖ- $R=-0,606$ ($p<0,01$), при РК - $R=-0,504$ ($p=0,02$). Следовательно, снижение катаболизма аденозина приводит к его внутриклеточному накоплению, а он, как известно, регулирует уровни 2,3-ДФГ, непосредственно контролирующего газотранспорт, взаимосвязан с образованием патологических форм эритроцитов [183] с низкой жизнеспособностью.

В основной группе больных однонаправленное повышение ферментов углеводного обмена и снижение активности энзима пуринового обмена свидетельствует о повышенных потребностях клеток в АТФ, репаративных процессах в мембранах, дисбалансе пула аденилатов. Во 2-й группе больных всех локализаций разнонаправленные изменения активности углеводного обмена свидетельствуют об энергодефиците, т.е. из-за нарушения энергозависимых трансмембранных реакций, активации ПОЛ. Все это является особенностями патогенеза как синдрома «старения эритроцитов», так и анемического.

Следовательно, патохимические особенности обмена эритроцитов, составляющих 2-ю гр. при раках различных локализаций наиболее неблагоприятны. Могут быть связаны с их дисфункцией.

Анализируя ОРЭ всех больных, по сравнению с контролем, в группах было установлено, что в 1-й гр. эритроциты характеризуются повышенной резистентностью, а во 2-й – наоборот пониженной. Так при РЛ (min: 1-я гр. - $0,45\pm0,03\%$, $p<0,05$; 2-я гр. - $0,57\pm0,03\%$, $p<0,05$; max: 1-я гр. - $0,25\pm0,01\%$, $p=0,081$; 2-я – $0,27\pm0,02\%$, $p<0,05$; при РЖ (min: 1-я гр. - $0,45\pm0,01\%$, $p=0,011$; 2-я гр. - $0,70\pm0,02\%$, $p<0,001$; max: 1-я гр. - $0,25\pm0,008\%$, $p=0,280$; 2-я гр. – $0,25\pm0,008$, $p=0,280$; при РК (min: 1-я гр. - $0,45\pm0,012\%$, $p=0,031$; 2-я гр. – $0,65\pm0,028\%$, $p<0,001$; max: 1-я гр. - $0,25\pm0,008\%$, $p=0,114$; 2-я гр. – $0,25\pm0,007\%$, $p=0,045$ и контроль min: $0,50\pm0,01\%$ и max: $0,23\pm0,01\%$). Повышение ОРЭ отражает наличие молодых форм эритроцитов, а снижение ОРЭ свидетельствует о повышенной циркуляции в крови патологических форм эритроцитов, что согласуется со снижением активности АДА и Г6ФДГ во 2-й группе.

Следовательно, во 2-х подгруппах в кровотоке преимущественно циркулируют стареющие эритроциты на фоне снижения эритропоэза.

ССЭ была повышена у больных при всех локализациях и составила: в 1-й гр. при РЛ - $45 \pm 5\%$, РЖ $56 \pm 5,6\%$, РК $44 \pm 3\%$ и контроль - $33,5 \pm 4,0\%$, $p=0,001$, во 2-й группе повышение ССЭ было более выраженным при всех локализациях и в среднем составило $76 \pm 2\%$, $p<0,001$. ССЭ считается индикатором повреждения мембран и клеточной дезорганизацией, что подтверждает перегрузка гликокаликса эритроцитов ВНиСММ.

Таким образом, все пациенты, которые вошли во 2-ю группу имеют наиболее неблагоприятные метаболические изменения в эритроцитах, приводящие к снижению их жизнеспособности.

Таблица 6.2

Активность ферментов в лимфоцитах крови по результатам кластерного анализа при раке различной локализации, нмоль/мин·10⁶ клеток (Me±m(95%ДИ))

Активность фермента	Контроль (n=34)	РЛ		РЖКТ	
		I (n=18)	II (n=16)	I (n=40)	II (n=28)
ЛДГ	$0,35 \pm 0,07$ (0,22-0,42)	$0,31 \pm 0,03$ (0,25-0,34) $p=0,362$	$0,44 \pm 0,07$ (0,4-0,5) $p=0,243$	$\uparrow \uparrow 0,76 \pm 0,16$ (0,51-1,5) $p<0,001$	$\uparrow 0,5 \pm 0,1$ (0,23-0,81) $p<0,001$
Г6ФДГ	$0,22 \pm 0,01$ (0,19-0,25)	$0,25 \pm 0,04$ (0,12-0,30) $p>0,05$	$\uparrow 0,60 \pm 0,11$ (0,28-0,71) $p<0,001$	$0,20 \pm 0,01$ (0,16-0,24) $p>0,05$	$\uparrow 0,28 \pm 0,07$ (0,21-0,50) $p<0,001$
АДА	$40,7 \pm 10,9$ (33-62)	$\downarrow 21 \pm 2$ (18-24) $p=0,002$	$\downarrow \downarrow 10,7 \pm 1,2$ (8,5-11,2) $p=0,002$	$\downarrow 17 \pm 1,4$ (15-21) $p<0,001$	$\downarrow \downarrow 10,1 \pm 1,3$ (9-13) $p<0,001$

Изменение интенсивности важнейших для лимфоцита метаболических путей может быть связано с изменением функционального состояния

лимфоцитов при онкопатологии. Активация терминальной реакции анаэробного гликолиза и регуляторной реакции ПФП отражает повышенную потребность клеток в АТФ, преимущественно для мембранного транспорта ионов, и интенсификации образования рибозо-5-фосфата и НАДФН₂ – зависимых пластических реакций, в том числе поддержание уровня восстановленного глутатиона, который, как известно, обеспечивает полноценные эффекторные функции естественных киллеров. В тоже время, нарушение дезаминирования аденозина пагубно влияет на созревание В- и Т-лимфоцитов. Как известно, без повышенных возможностей клеток к пролиферации, синтезу цитокинов, иммуноглобулинов и других гуморальных факторов невозможно развитие иммунного ответа.

Параллельно анализируя изменения показателей активности ферментов в лимфоцитах, вошедших в 1-ю группу больных установили следующие изменения (таблица 6.3): повышение активности ЛДГ у пациентов с РЖ и РК (РЖКТ) в среднем в 2 раза ($p=0,0001$), отсутствие отличий активности Г6ФДГ от значений контроля при всех локализациях ($p>0,05$), снижение активности АДА при РЛ в 2,2 раза ($p=0,0001$), а при РЖКТ – в 2,8 раз ($p=0,0002$). Во 2-й группе было установлено изменение следующих показателей: повышение активности ЛДГ при РЛ в 1,2 раза ($p=0,243$), при РЖКТ – в 1,4 раза ($p<0,001$), повышение активности Г6ФДГ при РЛ в 3,1 раза ($p<0,001$), при РЖКТ в 1,5 раза ($p<0,001$), снижение активности АДА при РЛ в 4,3 раза ($p=0,002$), при РЖКТ в 4,5 раз ($p<0,001$). В лимфоцитах при РЛ не выявлено изменений в углеводном обмене у пациентов 1-й группы. Во 2-й группе отмечено повышение активности ключевого фермента ПФП – Г6ФДГ. При РЖКТ следует отметить, что в подгруппах изменяются пути потребления глюкозо-6-фосфата. Для 1-й подгруппы характерен гликолитический путь окисления, для 2-й – ПФП. Активация ПФП окисления глюкозо-6-фосфата в лимфоцитах у больных раком различной локализации 2-й группы указывает, что ведущим патогенетическим фактором лимфоцитарной дисфункции является СРО. Снижение активности АДА для обеих групп является крайне неблагоприятным показателем функционального состояния лимфоцитов,

что согласуется с мнением других авторов. Изменения активности ферментов в лимфоцитах пациентов больных раком различных локализаций сопоставимы с изменениями активности лишь АДА в эритроцитах у этих пациентов (рис. 6.2-6.3). В тоже время, патохимические сдвиги в углеводном обмене для лимфоцитов имели свои индивидуальные особенности, что указывает на специфичность обмена в клетках различного гистогенеза. Индивидуальные особенности метаболизма эритроцитов и лимфоцитов показывают специфичность обмена в клетках крови различного гистогенеза.

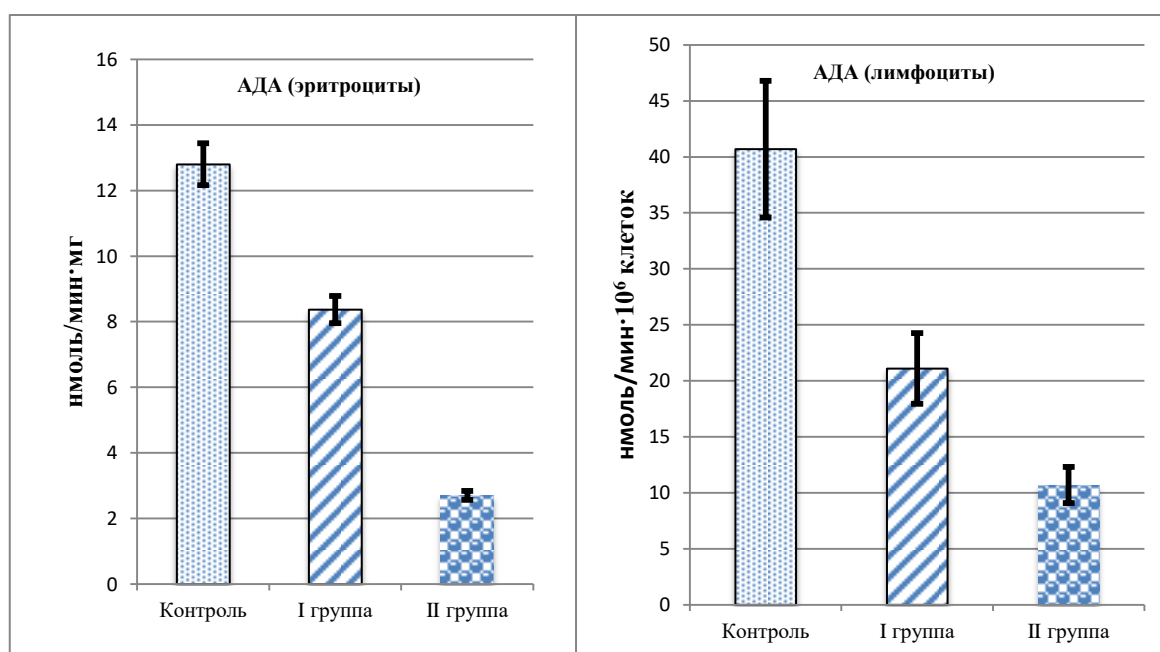


Рис. 6.2-6.3. Активность АДА в лимфоцитах и эритроцитах крови больных РЛ в подгруппах

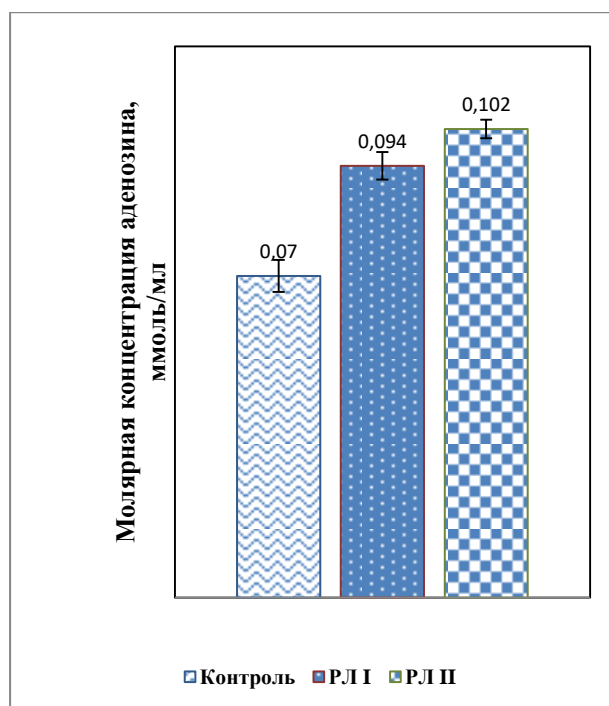


Рис. 6.4. Молярная концентрация аденозина в эритроцитах в подгруппах РЛ

Однонаправленное снижение активности АДА в клетках крови, наиболее выражено во 2-й подгруппе (рис. 6.2-6.3), сопровождается повышением уровней токсичного аденозина (рис.6.4). Зависимость активности АДА с уровнем аденозина подтверждена значениями коэффициента корреляции для всех локализаций: при РЛ - $R=0,451$ ($p=0,05$), РЖ- $R=-0,606$ ($p<0,01$), при РК - $R=-0,504$ ($p=0,02$).

В эритроцитах аденозин, как известно, регулирует уровни 2,3-ДФГ, непосредственно контролирующего газотранспорт, взаимосвязан с образованием патологических форм клеток с низкой жизнеспособностью [183, Xia Y., 2012]. В лимфоцитах снижение активности АДА при онкопатологии взаимосвязано с увеличением содержания нежизнеспособных клеток, что может быть обусловлено накоплением токсичного аденозина и способствовать его проапоптозному эффекту и нарушению иммунного ответа. Это мнение согласуется с результатами анализа о существовании обратной связи между активностью АДА содержанием нежизнеспособных лимфоцитов во всех группах: при РЛ - $R=-0,806$ ($p=0,009$), РЖ - $R=-0,814$ ($p=0,008$), РК - $R=-0,725$ ($p=0,027$).

Для понимания функционального состояния клеток крови у онкобольных используя особенности метаболизма в клетках крови в разных кластерах, нами был проведен анализ 3-летней выживаемости больных.

Исходя из данных по выживаемости, из общего числа обследуемых - умерли 29 (26%) человек по причине прогрессирования рака. Из числа умерших, 14 (13%) больных с РЛ, 8 (7%) – с РЖ и 6 (5%) – с РК. Анализ амбулаторных карт больных РЛ показал, что 14% больных имели III стадию, а 40% - I; гистологический тип опухоли большинства умерших (80%) имели плоскоклеточный рак и 20% - аденокарциному легких. Эти результаты объясняют отсутствие зависимости ферментативной активности от стадии заболевания и гистологического типа опухоли. Аналогичный анализ пациентов с РЖ и РК показал, что все больные (100%) умерли с IV стадией рака, и в 50% случаев была аденокарцинома. Следовательно, по результатам выживаемости, РЛ является наиболее агрессивной формой рака, при котором летальность происходит даже на I стадии заболевания. Полученные данные способствовали дальнейшему исследованию, направленному на поиск факторов, которые вносят существенный вклад в особенности ферментативной активности. Для этого, мы проанализировали данные геманализатора для больных РЛ. Мы обратили внимание на изменение уровней гемоглобина, гематокрита и эритроцитов в данной группе пациентов. Результаты статистической обработки данных представлены в таблице 6.3.

Таблица 6.3

Изменения показателей красной крови у больных РЛ

HGB, г/л (130-160 г/л)		RBC, $\cdot 10^{12}$ /л (4-5,1 $\cdot 10^{12}$ /л)		HTC, % (37%-50%)		ЦПК 0,86-1,05	
I группа	II группа	I группа	II группа	I группа	II группа	I группа	II группа
I группа	II группа	I группа	II группа	I группа	II группа	I группа	II группа
130,4 \pm 5,7	108,8 \pm 5,5**	4,3 \pm 0,1	4,1 \pm 0,2	38,8 \pm 0,4	34,9 \pm 1,4*	0,91 \pm 0,12	0,79 \pm 0,09

Примечание: * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,001$ относительно основной группы больных

Для пациентов, вошедших в 1-й кластер, характерен был нормальный уровень гемоглобина (HGB - 130,4 \pm 5,7 г/л), эритроцитов (RBC) и гематокрита (HTC). Больные РЛ, вошедшие во 2-й кластер, имели достоверно пониженный уровень гемоглобина - 108,8 \pm 5,5 г/л, что свидетельствует о развитии анемии, т.к. снижение содержания гемоглобина до уровня менее 120 г/л в литературных источниках рассматривается как анемия. Во 2-й группе был также достоверно понижен уровень гематокрита - 34,9 \pm 1,4 %, по сравнению с 1-й группой (HTC - 38,8 \pm 0,4 %).

Таким образом, дисметаболические процессы в эритроцитах у больных РЛ взаимосвязаны с изменением свойств гликокаликса и его дезорганизацией, активацией энергопотребляющих трансмембранных реакций. Отражают функциональные способности мембран. Снижение активности АДА (в 4,7 раза), ГбФДГ (в 2,5 раза) при незначительных отклонениях от нормы активности ЛДГ (1,5 раза) на фоне перегрузки гликокаликса могут свидетельствовать о процессах старения эритроцитов и развитии анемии, следовательно, о неблагоприятном прогнозе течения заболевания.

Клетки крови чувствительны к изменению качественного и количественного состава микроокружения. Изменения в клетках крови происходят на уровне состояния клеточных мембран, внутриклеточного

метаболизма и функций. В связи с этим актуальным является поиск методики для количественной оценки прогноза неблагоприятного исхода заболевания, и отражать степень выраженности изменений в различных группах.

Разработка методики может быть основана на методе последовательного анализа Вальда, который широко используется в клинической медицине для прогнозирования исходов заболевания на основе вычисления диагностических коэффициентов [13]. Весомым аргументом в выборе метода, послужили данные об использовании метода Вальда для определения количественной оценки выраженности анемии у рожениц [48].

Для разработки методики количественной оценки выраженности анемии нами проведено исследование частоты встречаемости всех имеющихся признаков заболевания (биохимические и патофизиологические показатели). Метод основан на количественной оценке разности частоты встречаемости наиболее характерных клинических признаков заболевания в «легкой» и «тяжелой» группах, т.е. 1-й и 2-й подгруппах РЛ соответственно. Первоначально разрабатывали формализованную структуру базы данных, представляющую собой информационную карту клинических (биохимических) признаков. Анализировали 16 признаков, характеризующих клиническую картину заболевания. У 40 больных РЛ осуществлен частотный анализ объективных, субъективных и анамнестических признаков заболевания. В зависимости от выраженности заболевания сформированы «легкая» (22 человека) и «тяжелая» (18 лиц) группы. Критериями отнесения пациентов в легкую группу явились: уровень гемоглобина $130,4 \pm 5,7$ г/л; эритроцитов – $4,3 \pm 0,1 \times 10^{12}$ /л; тяжелую – $108,8 \pm 5,5$ г/л и $4,0 \pm 0,2 \times 10^{12}$ /л соответственно. После заполнения информационных карт проанализировали частотную характеристику признаков заболевания в обеих группах. При обработке информационных карт вначале исследовали абсолютную, а затем относительную частоту встречаемости признаков в обеих группах. Чем чаще встречался признак в 1-й группе и реже во 2-й, тем клиническое его значение выше, и наоборот. Заполненные карты на

каждого больного РЛ подвергали статистической обработке на ЭВМ. Результаты заполнения карт внесены в таблицу 6.4:

Таблица 6.4

**Итоговая шкала количественной оценки раннего развития анемии
(метод последовательного анализа Вальда)**

Эритроциты пациентов с РЛ (n=40)				
Признак	Абс. Знач. Р1, Р2 в «легкой» группе (n=22)	Абс. Знач. Р3, Р4 в «тяжелой» группе (n=18)	Коэффициент К1	Коэффициент К2
ЛДГ↑↑	6	2	-3,4	-6,7
ЛДГ↑	13	5		
Г6ФДГ↑	18	2	6,5	-9
Г6ФДГ↓	4	16		
АДА↓	20	6	10	-3
АДА↓↓	2	12		
Аденозин↑	18	4	6,5	-5,4
Аденозин↑↑	4	14		
ССЭ↑	14	6	3,7	-3
ССЭ↑↑	6	12		
ОРЭ↑	14	10	2,4	0,97
ОРЭ↓	8	8		
НТС (норма)	7	7	3,7	-5,2
НТС↓	3	23		

Примечание:

Значения коэффициентов К1 и К2 вычисляются по формуле:

$K1 = 10 \lg_{10}(P1/P2)$, при $K1 \leq 20$, можно ставить благоприятный прогноз;

$K2 = 10 \lg_{10}(P3/P4)$, при $K2 \geq -20$, можно ставить неблагоприятный прогноз.

В нашем исследовании для постановки прогноза дисфункции/метаболизма эритроцитов на доанемическом этапе у больных РЛ достаточно определить три показателя в эритроцитах: активность Г6ФДГ, равную $0,16 \pm 0,06$ нмоль/мин·мг белка (контроль - $0,10 \pm 0,01$ нмоль/мин·мг белка); АДА, равную $8,37 \pm 1,5$ нмоль/мин·мг белка (контроль - $12,8 \pm 1,7$ нмоль/мин·мг белка) и уровень аденозина, равный $0,094 \pm 0,003$ моль/л (контроль - $0,07 \pm 0,002$ моль/л). Для постановки прогноза развития анемии (неблагоприятный прогноз), также достаточно определить три показателя в эритроцитах: активность ЛДГ, равную $4,1 \pm 0,75$ нмоль/мин·мг белка (контроль - $2,69 \pm 0,15$); Г6ФДГ, равную $0,04 \pm 0,01$ нмоль/мин·мг белка (контроль - $0,10 \pm 0,01$ нмоль/мин·мг белка) и уровень аденозина - $0,102 \pm 0,003$ моль/л (контроль - $0,07 \pm 0,002$ моль/л).

Для характеристики информативности разработанной методики определяли:

1) чувствительность методики (процент положительных результатов теста при наличии признаков заболевания) по формуле:

$Se = (TP/D-) \times 100\%$, где Se – чувствительность, TP – истинно положительные результаты, D – количество заболевших. При этом истинно положительных результатов оказалось 17 человек среди 18 заболевших. $Se = (17/18) \times 100\% = 94,4\%$;

2) специфичность методики (процент отрицательных результатов теста при отсутствии признаков заболевания) по формуле:

$Sp = (TN/D) \times 100\%$, где Sp – специфичность, TN – истинно отрицательные случаи, D – здоровые. При этом истинно отрицательные случаи составили 20; здоровых оказалось 20: $Sp = (18/22) \times 100\% = 82\%$.

Таким образом, в работе проведена разработка методики балльной оценки развития раковой анемии с помощью вероятностного статистического анализа Вальда. Предложенная методика открывает возможность проведения лечебных мероприятий с определением выраженности заболевания, динамики его

признаков в процессе наблюдения и проводить сравнительную оценку в рандомизированных группах с вычислением критериев достоверности.

Полученные результаты были опубликованы в следующих работах:

1. 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». - 04 ноября - РФ, Таганрог. - 2020. - С. 29-31. 2. Миронова К.А., Бакурова Е.М. Нарушение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в клетках крови у пациентов с онкопатологией / Миронова К.А., Бакурова Е.М. // РИНЦ Сборник статей с материалами Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Современные достижения химико-биологических наук в профилактической и клинической медицине». - 3 декабря - РФ, Санкт-Петербург. - 2020. С. 126-131.

3. Миронова К.А., Бакурова Е.М. 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. 5-7 октября. – Рязань: ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России. – 2017. С. 126-127.

4. Миронова К.А. Дисметаболические процессы и дезорганизация гликокаликса эритроцитов у больных раком легких / Миронова К.А. // Материалы Международной научной конференции студентов и молодых ученых Донецкие чтения 2017: Русский мир как цивилизационная основа научно-образовательного и культурного развития Донбасса: (Донецк, 17-20 октября 2017 г.). – Том 2: Химико-биологические науки / под общей редакцией проф. С.В. Беспаловой. – Донецк: Изд-во ДонНУ. - 2017. С. 307– 308.

5. 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.

6. 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.

7. Миронова К.А., Бакурова Е.М. 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.

РАЗДЕЛ 7

АНАЛИЗ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Формирование индивидуальных агрессивных свойств опухоли сопряжено со снижением ее оксигенации. Важным фактором, способствующим инвазии, является дисфункция лимфоцитов, инфильтрующих строму опухоли.

Функциональная активность клеток крови тесно связана с их метаболизмом, в частности, обменом углеводов и аденозина.

Глюкоза – основной энергосубстрат для лимфоцитов, а для эритроцитов – единственный. Помимо АТФ, гликолиз в эритроците обеспечивает продукцию 2,3-ДФГ, регулирующего передачу кислорода в ткани, а гликолитический НАДН₂ необходим для восстановления нефункционального метгемоглобина. ПФП, а прежде всего его Г6ФДГ, отвечает за фонд НАДФН₂, обеспечивающего протекание глутатионзависимых реакций системы антирадикальной защиты, а также редукцию метгемоглобина.

Регуляторные эффекты аденозина по гликолитической продукции 2,3-дифосфоглицерата в эритроцитах контролируют тканевую оксигенацию. Ранее проф. Борзенко Б. Г. установила, что при раке наблюдается снижение активности АДА в лимфоцитах, сопровождающееся их функциональными нарушениями.

Исследования активности некоторых ферментов обмена глюкозы – лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ), а также фермента катаболизма аденозина – аденозиндезаминазы (АДА) в крови не выявили связи с полом. Как и в предыдущих исследованиях, нами наблюдались некоторые возрастные особенности их активности. Результаты корреляционного анализа для исследуемых ферментов плазмы крови в зависимости от возраста показали наличие связи для ЛДГ ($R = 0,404$, $p = 0,002$), для Г6ФДГ ($R = - 0,47$, $p = 0,001$) и для АДА ($R = 0,303$, $p = 0,004$). Хотя её интенсивность была слабая.

В эритроцитах контроля активность ЛДГ имела незначительную тенденцию к повышению в зрелом возрасте ($2,69 \pm 0,02$ нмоль/мин·мг), по сравнению с группой молодого и пожилого возраста ($2,49 \pm 0,11$ нмоль/мин·мг и $2,54 \pm 0,06$

нмоль/мин·мг), которые не отличались между собой. Г6ФДГ у лиц пожилого возраста была на 30% ниже, чем у лиц зрелого возраста ($p < 0,05$). АДА эритроцитов у людей пожилого возраста составила $8,6 \pm 1,2$ нмоль/мин·мг, что было ниже в 1,4 раза ($p < 0,05$) по сравнению с группой зрелого возраста ($13,0 \pm 1,2$ нмоль/мин·мг) и в 1,7 раза ниже ($p < 0,05$) группы молодого возраста ($14,9 \pm 1,7$ нмоль/мин·мг). Итак, в пожилом возрасте для эритроцитов характерно однонаправленное снижение активности ферментов ПФП окисления глюкозы и катаболизма аденозина, вероятно, это связано с интенсификацией прооксидантных реакций и формированием аденозина, регулирующего уровень 2,3-ДФГ.

Для лимфоцитов было характерно повышение скорости анаэробного гликолиза в старших возрастных группах, а также снижение скорости катаболизма аденозина. Так, активность ЛДГ в зрелом и пожилом возрасте повышена в среднем в 1,5 и 1,8 раза ($p < 0,05$) по сравнению с лимфоцитами у лиц молодого возраста. Соответственно до $0,44 \pm 0,04$ и $0,51 \pm 0,03$ нмоль/мин· 10^6 клеток по сравнению с $0,28 \pm 0,04$ нмоль/мин· 10^6 клеток. Однако между самими группами активность отличалась незначительно, согласно отсутствию ее корреляции с возрастом ($R = 0,19$, $p = 0,45$).

У лиц пожилого возраста активность АДА лимфоцитов составила $47,4 \pm 2,95$ нмоль/мин· 10^6 клеток, что на 49% ниже, чем у лиц зрелого возраста. Повышенный уровень аденозина, как известно, коррелирует с дисфункцией Т- и В-лимфоцитов, следовательно, выявленная низкая активность АДА в лимфоцитах у лиц пожилого возраста может быть сопряжена их дисфункцией.

Средние значения активности Г6ФДГ лимфоцитов достоверно не изменялись с возрастом. Согласно результатам корреляционного анализа, ее связь с возрастом не выявлена ($R = -0,39$, $p = 0,16$).

Согласно результатам, возраст не является ключевым фактором, влияющим на изменение активности изученных ферментов. Наиболее выраженные отличия их активности наблюдались в молодом возрасте. Хотя подавляющее большинство случаев при исследовании особенностей обмена клеток крови при патологии

пришлось на смежные возрастные группы зрелого и пожилого возраста, все же исследования при патологии проводили с учетом возраста. Так у пациентов наиболее выраженные изменения активности ЛДГ в эритроцитах наблюдались в пожилом возрасте по сравнению с группой зрелого возраста (45-59 лет). Активность фермента возрастала при РЖ на 12% ($p < 0,05$), РК на 14% ($p < 0,05$), но снижалась при РЛ на 16% ($p < 0,05$). Напротив, в лимфоцитах активация анаэробного гликолиза более выражена у пациентов зрелого возраста. Достоверные отличия активности Г6ФДГ как эритроцитов, так и лимфоцитов были выявлены лишь при РК у лиц пожилого возраста по сравнению с контролем и пациентами с РК зрелого возраста. Так активность фермента в лимфоцитах была на 85% выше значений активности у пациентов той же локализации в зрелой группе ($p < 0,001$). При других локализациях рака достоверные отличия Г6ФДГ не установлены.

Итак, при исследовании возрастного фактора и патологии можем отметить, что нами не выявлено универсальных тенденций, характеризующих возрастные особенности активности ферментов обмена глюкозы при раке. Также в эритроцитах и лимфоцитах они не коррелировали с изменениями ферментативной активности в плазме и были специфичны для каждой клетки крови.

При исследовании активности фермента аденозина – АДА было установлено однонаправленное снижение активности АДА в клетках крови. При этом активность фермента обратно коррелировала с возрастом. Была найдена корреляционная связь между активностью АДА эритроцитов и возрастом при РЛ ($r = -0,701$, $p = 0,01$), РЖ ($r = -0,618$, $p = 0,01$) и РК ($r = -0,504$, $p = 0,03$). Подобная связь с возрастом была выявлена для АДА лимфоцитов. У больных пожилого возраста установили не только выраженное снижение активности по сравнению с контролем, но и при всех изученных локализациях (РЛ, РЖ и РК) активность фермента снижалась в 1,3 раза (во всех случаях $p < 0,05$) по сравнению с больными зрелого возраста.

Помимо этих исследований изучили ряд других показателей, в частности, сорбционную функцию клеток крови. Для этого определяли вещества низкой и средней молекулярной массы (ВНиСММ). Это гетерогенная группа веществ, характеризующих состояние эндогенной интоксикации. Установили, что их повышение в плазме крови характерно для изучаемой патологии. Выявили повышение ВСиНММ при РЛ на 140% ($p < 0,001$); при РЖ на 195% ($p < 0,001$); при РК на 182% ($p < 0,001$). Это сопровождалось увеличением их сорбции мембранами эритроцитов. В эритроцитах при РЛ на 156% ($p = 0,002$), при РЖ на 167% ($p < 0,001$) и РК на 159% ($p < 0,001$) по сравнению с контролем, что указывает на перегрузку гликокаликса эритроцитов. В то же время установлены качественные отличия в составе ВНиСММ. При распространенном раке спектры метаболитов эритроцитов, как в периферическом кровотоке, так и в оттекающей от пораженного органа крови повышались в узком диапазоне, но более значительно, чем в самой плазме онкобольных (в среднем в 1,6 – 2,3 раза). Они соответствовали иному диапазону длин волн, а именно, 255 – 260 нм, т.е спектру катаболитов пуриновой группы. Можно предположить, что в эритроцитах они могли быть представлены продуктами деградации аденилата и свидетельствовали о напряженности энергообмена красных клеток крови. Действительно, исследование концентрации аденозина (ключевого катаболита аденилата) установило его достоверное увеличение 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 % (в каждом случае $p < 0,05$). Имеется мнение, что нарастание уровня аденозина в клетке взаимосвязано со снижением периода их активной циркуляции.

Параллельно определяли особенности ОРЭ и ССЭ, являющихся показателями жизнеспособности эритроцитов. Нами установлены изменения минимальной ОРЭ. Для РЖ и РК было характерным ее снижение, что указывало на усиление внутрисосудистого гемолиза ($p = 0,011$ и $p = 0,031$).

Отклонениям в ОРЭ сопутствовало нарастание сорбционной способности эритроцитов (ССЭ), в частности, при РЛ на 29% ($p = 0,001$), РЖ – на 63% ($p = 0,001$), РК – на 24% ($p = 0,001$). При этом повышение сорбционной емкости эритроцитов считается индикатором повреждения мембран и клеточной дезорганизации. Таким образом, можно считать, что нарастание циркулирующих ВНиСММ ведет к дезорганизации плазматической мембраны, нарушению трансмембранных процессов в клетках крови.

Насколько перегрузка клеточной мембраны циркулирующими катаболитами является универсальным неблагоприятным фактором, исследовали при параллельном окрашивании лимфоцитов витальным красителем. Результаты эксперимента по изменению проницаемости мембран лимфоцитов больных указывают на увеличение процентного содержания среди них нежизнеспособных клеток. При РК в 2,9 раз (до $10,0 \% \pm 4,4 \%$; $p < 0,05$), при РЖ в 1,7 раз ($7,3 \% \pm 1,2 \%$; $p < 0,05$). Однако их нарастание было недостоверно при РЛ - $5,1 \% \pm 0,6 \%$ ($p > 0,05$) (контроль - $3,9 \% \pm 1,0 \%$).

Наиболее выраженные изменения проницаемости лимфоцитов в динамике развивались через 30 мин инкубации с трипановым синим. Такой подход позволил выявить универсальную закономерность – достоверное повышение числа нежизнеспособных клеток во всех группах при патологии по сравнению с окрашиванием в начальный момент времени. Так при РЛ удельный вес нежизнеспособных клеток составил $43,1 \% \pm 7,2 \%$, при РЖ – $81 \% \pm 8,0 \%$, при РК - $30,4 \% \pm 6,5 \%$ (контроль - $33,1 \% \pm 6,3 \%$). При 30 мин инкубации в контроле проницаемость увеличивается на 29 %, при РЖ – на 74 %, при РК – на 20 %, при РЛ – на 38 % (в каждом случае $p < 0,001$). Повышение содержания окрашенных клеток в препарате свидетельствует о повышении проницаемости мембран для молекул красителя и о наиболее выраженном повреждении клеток у больных при РЖ и РК. Полученные нами результаты и известные данные о возникновении пурининдуцированных пор в трансформированных клетках могут являться звеньями единой патофизиологической цепи. При анализе результатов стало очевидным, что циркуляция ВНиСММ – универсальный и существенный

фактор патогенеза мембранной дисфункции клеток крови, т.к. среди изученных раков «излюбленные» локализации, где данное нарушение выражено и для эритроцитов, и для лимфоцитов совпали – это РЖ и РК.

Проанализируем особенности метаболизма клеток крови, сопутствующие развитию мембранной дисфункции.

При патологии для клеток крови характерно повышение активности ЛДГ. В эритроцитах это наблюдали при всех изученных локализациях опухолевого процесса (соответственно, в 3,6 раз при РЛ, в 3,7 раз при РЖ и РК, $p < 0,001$), что свидетельствует о повышении потребности в АТФ и, как следствие, об усилении гликолиза. Для лимфоцитов крови установлены подобные сдвиги ферментативной активности, но менее выраженные. Так повышение активности ЛДГ при РЛ наблюдалось в 1,4 раза, при РЖ в 2,5 раза (при РК достоверного повышения не выявлено).

В эритроцитах крови активность Г6ФДГ достоверно не отличалась от контроля. По некоторому повышению активности Г6ФДГ наблюдали активацию ПФЦ в лимфоцитах в 1,4 раза лишь при РЛ ($p = 0,046$) и при РК ($p = 0,034$).

При раке активность фермента катаболизма аденозина в клетках крови всегда ниже, чем в контроле: в лимфоцитах – при РЛ – в 2,6 раз, РЖ – 3,6 раз и РК – 6,9 раз (в каждом случае $p < 0,001$). В эритроцитах – в 1,4 раза, 2 раза и 1,6 раз соответственно (в каждом случае $p < 0,001$).

Определяя взаимосвязь особенностей активности клеточных ферментов от стадии патологического процесса, лишь для АДА эритроцитов и лимфоцитов выявили корреляцию со стадией заболевания. 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 фоне снижения клеточной активности АДА в плазме крови, наоборот, установлено ее достоверное повышение. При РЛ, РЖ и РК в 1,6, 3,8 и 2,4 раза

соответственно (при всех локализациях $p < 0,001$). Следовательно, разнонаправленные изменения активности АДА в клетках и плазме подтверждают специфичность её изменений для метаболизма клеток крови.

При раке изученных локализаций в плазме крови установлено повышение активности ЛДГ по сравнению с контролем. При этом для всех локализаций лишь для активности ЛДГ в плазме выявлена прямая связь со стадией процесса. Соответственно, для РЛ, РЖ и РК: $r = 0,423$ ($p = 0,02$), $r = 0,303$ ($p = 0,31$), $r = 0,303$ ($p = 0,31$).

Активность Г6ФДГ плазмы крови не зависела от стадии процесса (соответственно при РЛ, РЖ и РК: $r = 0,02$ ($p = 0,93$), $r = -0,07$ ($p = 0,83$), $r = 0,07$ ($p = 0,83$)).

Выявлено, что при раках различной локализации изменения активности ферментов клеток крови носят системный характер. При этом сдвиги метаболизма в лимфоцитах подобны таковым в эритроцитах, однако степень их выраженности может отличаться. Как уже отмечалось, снижение активности АДА в эритроцитах сопряжено с повышением молярной концентрации аденозина (при РЛ на 12 %, РЖ и РК на 11 % (в каждом случае $p < 0,05$)). Известно, что аденозин регулирует уровни 2,3-ДФГ, непосредственно контролирующего газотранспортную функцию эритроцитов. Также известно, что избыток аденозина токсичен, т.к. связан с повышением числа патологических форм эритроцитов со сниженной жизнеспособностью (Gladwin T. M., 2011, Zhang Y., Xia Y., 2012). Это хорошо согласуется с выявленными нами изменениями показателей повреждения мембран эритроцитов – ОРЭ и ССЭ. Таким образом, описанному в литературе «синдрому старения эритрона» могут способствовать установленные нами особенности ферментативной активности в эритроцитах пациентов при раке различной локализации.

Патогенетическая связь между изменением активности АДА и функционированием эритроцитов представлена в виде схемы (рис. 7.1).



Рис. 7.1 Снижение активности АДА взаимосвязано с появлением патологических форм эритроцитов с низкой жизнеспособностью.

При онкопатологии изменение интенсивности метаболизма лимфоцитов также может быть сопряжено с нарушением их функционального состояния и жизнестойкости. Таким метаболическим неблагоприятным фактором может быть снижение активности АДА, которое, согласно полученным нами результатам, имеет универсальный характер для всех исследованных локализаций, зависит от распространенности патологического процесса. Данное предположение согласуется с результатами анализа о существовании обратной связи между активностью АДА содержанием нежизнеспособных лимфоцитов во всех группах: при РЛ - $R = -0,806$ ($p = 0,009$), РЖ - $R = -0,814$ ($p = 0,008$), РК - $R = -0,725$ ($p = 0,027$).

Патогенетическая связь между изменением активности АДА и жизнеспособностью клеток крови представлена нами в виде схемы (рис. 7.2).

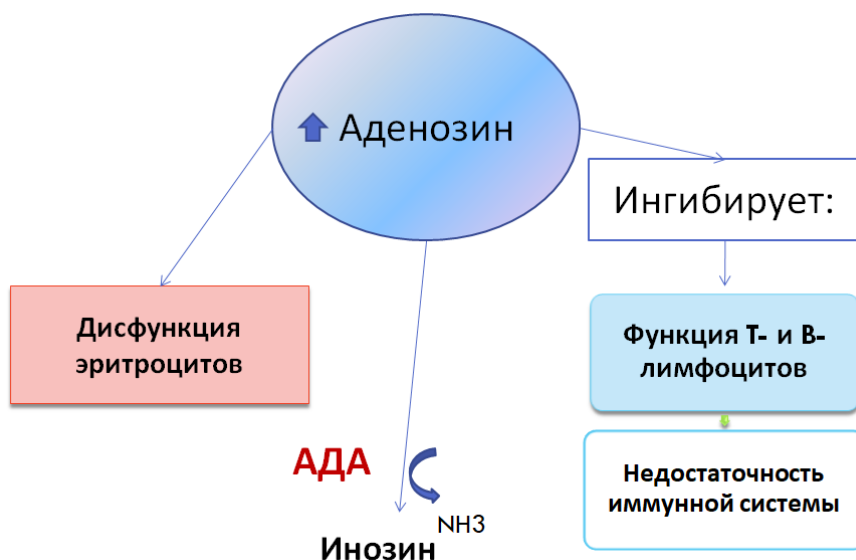


Рис. 7.2. Взаимосвязи низкой клеточной активности АДА со снижением жизнеспособности эритроцитов и лимфоцитов.

В частности, в лимфоцитах снижение АДА может способствовать проапоптозному действию избыточного аденозина. В свою очередь, выраженное снижение активности АДА может быть связано с иммуносупрессией. Поскольку известно, что аденозин нарушает дифференцировку В- и Т-лимфоцитов.

Полагаем, что низкая клеточная активность АДА, способствующая развитию токсических эффектов аденозина, – универсальный фактор патогенеза как иммуносупрессии при развитии рака, так и дисфункции эритроцитов. Поскольку известно, что повышенный уровень аденозина коррелирует с появлением патологических форм эритроцитов с низкой жизнеспособностью. Это хорошо согласуется с выявленным нами нарастанием ССЭ при всех исследуемых локализациях. 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 ($r = -0,622$, $p = 0,01$). Следовательно, установленные нарушения метаболизма эритроцитов способствуют развитию гемической гипоксии. Однако известно, что непосредственно данная форма гипоксии связана не только с качественными, но и количественными

нарушениями уровней гемоглобина (Hb). Следовательно, необходимо было сопоставить установленные особенности метаболизма с уровнями Hb.

Поскольку также была выявлена некоторая неоднородность при раке различных локализаций показателей углеводного обмена, параллельно провели кластерный анализ показателей ферментативной активности. В эритроцитах кластерный анализ абсолютных значений ферментативной активности выделил в каждой локализации по два кластера. Были сформированы две группы: 1-я – основная (кластер 1) и 2-я (кластер 2). 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.

На рис. 7.3 на примере РЛ отражены характерные сдвиги метаболизма для клеток, отнесенных при анализе в кластер 1.

Было установлено, что в 1-м кластере (основная гр.) активность ЛДГ имела максимально высокие значения, по сравнению со 2-й гр. и контролем (соответственно, при РЛ в 2,6 раза и в 4 раза; аналогично в таком кластере для рака ЖКТ – больше в 1,5 раза, чем в их 2-й гр. и в 4 раза, чем в контроле).

Активность Г6ФДГ изменялась в группах достоверно, но разнонаправленно. При РЛ в основной группе она в 1,6 раза, а при РЖ и РК в 3,2 раза выше, чем в контроле. Активность АДА несколько снижалась – в 1,5 раза как при РЛ, так и при РК и РЛ.

В 1-м кластере (т.н. основная группа) больных однонаправленное повышение ферментов углеводного обмена свидетельствует о повышенных потребностях клеток в АТФ и параллельному усилению активации прооксидантных процессов у онкобольных и потребности в НАДФН₂.

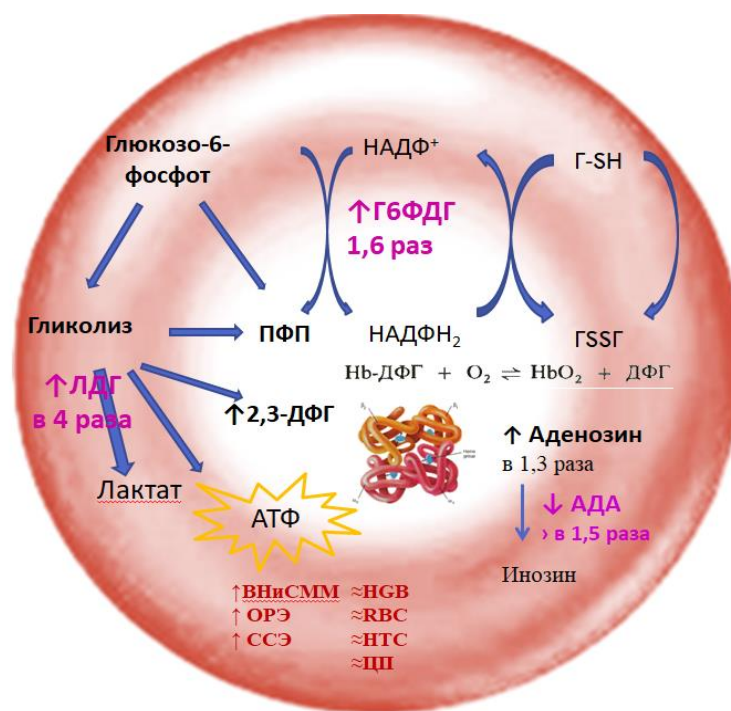


Рис. 7.3. Патохимические сдвиги в эритроцитах больных РЛ в 1-м кластере.

Особенности обмена для эритроцитов второго кластера - не столь выраженное повышение ЛДГ во 2-й гр. (лишь в 1,5 раза при всех локализациях), на фоне низкой активности Г6ФДГ (по сравнению с контролем она, наоборот, снижалась в 2,5 раза при РЛ и в 1,7 раза при раке ЖКТ) (см. рис. 7.4). Во 2-й гр. больных разнонаправленные изменения активности углеводного обмена свидетельствуют о перераспределении путей использования глюкозы. Это может свидетельствовать об оттоке метаболитов гликолиза для продукции 2,3-ДФГ. Также гликолитический НАДН₂ может быть необходим для редукции метгемоглобина. Однако при этом снижается выход АТФ, клетка страдает от энергодефицита, а значит могут нарушаться энергозависимые трансмембранные реакции. В то же время, крайне неблагоприятно снижение активности Г6ФДГ (при сопоставлении с основной гр при РЛ - в 4 раза; при РК и РЖ - меньше в 5,3 раза, чем в их основной гр.). Это неизбежно будет сопряжено с активацией ПОЛ из-за дисфункции глутатиона. Значит, в этой группе установлен дисбаланс обмена.

с циркуляцией патологических форм эритроцитов, что хорошо согласуется с резким снижением в них активности АДА и Г6ФДГ.

ССЭ была повышена у больных при всех локализациях и составила: в 1-й гр. при РЛ – $45,0 \pm 5,0$ %, РЖ $56,0 \pm 5,6$ %, РК $44,0 \pm 3,0$ % и контроль - $33,5 \pm 4,0$ %, $p = 0,001$. Однако во 2-й группе повышение ССЭ было более выраженным при всех локализациях и в среднем составило $76,0 \pm 2,0$ %, $p < 0,001$. Поскольку это считается индикатором повреждения мембран, то хорошо согласуется с выявленной нами анемией у больных, чьи эритроциты отнесены во 2-й кластер (группу). Следовательно, нам удалось установить особенности обмена глюкозы и аденозина, сопряженные с усиленным гемолизом эритроцитов и развитием анемии. Причиной декомпенсации обмена может быть длительная перегрузка гликокаликса эритроцитов ВНиСММ.

Для прогноза развития анемии разработали методику балльной оценки с помощью вероятностного статистического анализа Вальда. Результаты анализа показали высокую информативность одновременного определения активности АДА, Г6ФДГ и ЛДГ в эритроцитах для прогноза их дисфункции и анемии.

Аналогичным образом распределялась активность ферментов и в кластерах лимфоцитов, хотя и имели свои особенности. При этом активность АДА в 1-й гр. в 2 раза ниже контрольной при РЛ; в 2,4 раза – при РК и РЖ. Во 2-х гр. её снижение в 3,8 раза при РЛ; в 4 раза при РК и РЖ. Установлена зависимость активности АДА с уровнем аденозина для всех локализаций: при РЖ $R_o = -0,606$ ($p < 0,01$), при РК $R_o = -0,504$ ($p = 0,02$), при РЛ $R_o = 0,451$ ($p = 0,05$). Выявлена связь между активностью АДА и содержанием нежизнеспособных лимфоцитов во всех группах: при РЖ $R = -0,814$ ($p = 0,008$), РК $R = -0,725$ ($p = 0,027$), РЛ $R = -0,806$ ($p = 0,01$).

Это указывает на то, что угнетение клеточной активности АДА и Г6ФДГ – 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 сорбировавших 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 ($p < 0,001$);

значительнее 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 ГбФДГ 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, Г6ФДГ, ЛДГ. Согласно методу последовательного анализа Вальда одновременное снижение активности АДА (более чем в 4,5 раза) и Г6ФДГ (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 ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Активность альдегиддегидрогеназы сердца крыс при комбинированной термической травме под влиянием динитрозильных комплексов железа / Дударь А.И., Соловьева А.Г., Корягин А.С. и др. // Биорадикалы и антиоксиданты. -2018. -№3.- С. 236-238.

2. Анализ системного иммунитета и воспаления в прогнозе аденокарциномы желудка / Хакимова Г.Г., Заботина Т.Н., Трякин А.А. и др. // Успехи молекулярной онкологии. -2020. – Т. 7. -№1. –С. 38-46.

3. Анемия воспаления: особенности, необходимость и возможность коррекции. Обзор литературы / Орлов Ю.П., Говорова Н.В., Ночная Ю.А. и др. // Вестник интенсивной терапии имени А. И. Салтанова. - 2019. -№1. С. 20-35.

4. Балукова, Е.В. Поражения печени различного генеза (токсического, лекарственного, дисметаболического): от этиологической гетерогенности к единой унифицированной терапии пациентов / Е.В. Балукова, Ю.П. Успенский, Ю.А. Фоминых. // РМЖ. -2018. - № 1(1). - С. 35-40.

5. Банколе А.В. Дефицит пируваткиназы: эпидемиология, молекулярно-генетическая характеристика и современные подходы к диагностике (обзор литературы) / Банколе А.В., Черняк Е.А. - Текст : непосредственный // РЖДГиО. 2020. №7(2). С. 86-93.

6. Башук В.В. *Патогенез старения крови и кровообращения: дис.на соискание ученой степени доктора мед. наук: 14.01.30 «геронтология и гериатрия»* /Башук Виктория Владимировна; Белгородский государственный национальный исследовательский университет. – Белгород, 2019. - 193 с. - Текст : непосредственный.

7. Бейум А. Выделение лимфоцитов, гранулоцитов и макрофагов // Лимфоциты: выделение, фракционирование и характеристика. – М.: Медицина, 1980. – С. 9-10.

8. Бережная Н.М. Физиологическая система соединительной ткани и онкогенез. I. Роль клеточных компонентов стромы в развитии опухоли / Н.М. Бережная, В.Ф. Чехун // Онкология. -2016. - Т. 18, № 1. - С. 4-14.

9. Березин П.Г. Роль эритропоэтинов в лечении анемии у онкологических больных / Березин П.Г., Милованов В.В., Иванников А.А. // Research'n Practical Medicine Journal. – 2017. - №4(2). – С. 37-42. <https://doi.org/10.17709/2409-2231-2017-4-2-5>

10. Быков И. И. Тактика ведения пациентов с диффузным раком желудка, обусловленным наследственными мутациями / Быков И. И., Немцова М. В., Хоробрых Т. В. // Siberian Journal of Life Sciences and Agriculture. 2018. №4. С.88-110.

11. Быков И. М. Изменения биохимических показателей у больных с зависимостью от психостимуляторов на фоне метаболической коррекции / Быков И. М., Любченко Д. А., Попов К. А. // Медицинский вестник Северного Кавказа. - 2019. –Т. 14. -№ 2. -С. 352-355.

12. Ващенко В. И. Эриптоз (квазиапоптоз) эритроцитов человека и его роль в лекарственной терапии / Ващенко В. И., Вильянинов В. Н. // Обзоры по клинич. фармакол. и лек. терапии. 2019. №3. С.5-38.

13. Верес И. А. Метод последовательного анализа Вальда в разработке количественной оценки выраженности сальпингоофорита / Верес И. А., Пересада О. А., Белько В. И. // Сиб. мед. журн. (Иркутск). 2016. №5. С.5-8.

14. Влияние локального иммунитета на прогноз рака желудка / Хакимова Г. Г., Трякин А. А., Заботина Т. Н. и др. // Современная онкология. -2020. – Т. 22. - №1. –С. 60-65.

15. Влияние прерывистой нормобарической гипоксии на системную гемодинамику, биохимический состав крови и физическую работоспособность лиц пожилого возраста / Ключникова Е.А., Аббазова Л.В., Лоханникова М.А. и др. // Ульяновский медико-биологический журнал. -2017. -№4.- С. 155-163.

16. Возрастные особенности эритроцитарной системы в старших возрастных группах / Малинова Л.И., Денисова Т.П., Липатова Т.Е. и др. // Саратовский научно-медицинский журнал. 2018. №2. – С. 341-345. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/vozrastnye-osobennosti-eritrotsita-rnoy-sistemy-v-starshih-vozrastnyh-gruppah> (дата обращения: 24.0.8.2021).

17. Войцеховский В. В. Лейкемоидные реакции двух и трех ростков миелопоэза / Войцеховский В. В., Целуйко С. С. // Амурский медицинский журнал. 2019. №3 (27). С.74-87.

18. Гильмутдинова И.Р. Предпосылки к использованию плазмафереза в комплексной терапии и реабилитации онкологических больных / Гильмутдинова И.Р., Еремин П.С. // Вестник восстановительной медицины. 2020. №4 (98). С. 131-134.

19. Горячковский А.М. Клиническая биохимия. Издание 2-е, исправленное и дополненное. - Одесса: «Астропринт», 1998. – с. 603.

20. Гуревич Л. Е. Основные принципы новой классификации нейроэндокринных опухолей желудочно-кишечного тракта и гепатопанкреатической системы (ВОЗ, 2019 Г) / Гуревич Л. Е. // Новости клинической цитологии России. 2019. №4. – С. 27-35. doi:10.24411/1562-4943-2019-10405.

21. Давыдовский А. Г. Проблема «молекулярного износа и старения» эритрона при противоопухолевой химиотерапии (механизмы, гипотеза" эффекта эритроцитарного свидетеля", опыт математического моделирования, перспективы) /Давыдовский А. Г. // Онкологический журнал. – 2007. – Т. 1. – №. 2. – С. 101-125.

22. Елисеев Д.Н. Компенсаторные процессы в системе крови в условиях гипотермического воздействия / Елисеев Д.Н. // Журнал фундаментальной медицины и биологии. 2018. №1. С. 32-36.

23. Знаменская Т.К. Состояние гликолиза у новорожденных с гипоксией / Знаменская Т.К., Шевченко Л.И., Курилина Т.В. // Лік. Справа – Врacheб. дело. – 2001. - №1. – С. 93-94.

24. Зуйков С. А. Исследование возрастных изменений свободнорадикального окисления у больных раком толстой кишки / Зуйков С. А., Полунин Г. Е. // Новообразование. -2020. -Т. 12. - № 4. - С. 174-178.

25. Зуйков С.А. Исследование взаимосвязи показателей обмена пуринов, прооксидантной и антиоксидантной системы у больных с опухолями желудочно-кишечного тракта при различных стадиях заболевания / Зуйков С.А, Жебеленко Я.Г. // Знание. – 2016. - №2-1. - С. 29-34.

26. Изменение ОРЭ: Патологическая физиология / под ред. А.Д. Адо и Л.М. Ишимовой. - Москва: Медицина, 1980 г. – с. 520.

27. Интоксикационный синдром у стоматологических больных и его верификация / Петросян Л.Б., Цимбалистов А.В., Лопушанская Т.А., и др. // Актуальные проблемы медицины. – Т. 41. - № 3. – 2018. – С. 379-392.

28. Интоксикационный синдром у стоматологических больных и его верификация / Петросян Л.Б., Цимбалистов А.В., Лопушанская Т.А., и др. // Актуальные проблемы медицины. - 2018. - №3. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/intoksikatsionnyy-sindrom-u-stomatologicheskikh-bolnyh-i-ego-verifikatsiya> (дата обращения: 16.09.2021).

29. Клинико-лабораторный профиль наследственного сфероцитоза / Асатрян Т. Т., Зенина М. Н., Черныш Н. Ю. и др. // Вестник Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова. 2019. №1. С. 65–72.

30. Колотьева Н. А. Роль малых молекул в регуляции обмена веществ (обзор литературы) / Колотьева Н. А., Гильмиярова Ф.Н. // Клиническая лабораторная диагностика. 2019. №64(12). С. 716-722.

31. Комплексный подход к коррекции анемии при резекциях печени у онкологических больных / Алборов А. Э., Романенко Н. А., Ханевич М. Д. и др. //

Вестник гематологии. - 2019. - №4. - С.- 29. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/kompleksnyy-podhod-k-korrekcii-anemii-pri-rezektsiyah-pecheni-u-onkologicheskikh-bolnyh> (дата обращения: 24.08.2021).

32. Куртасова Л.М. «Особенности иммунного ответа и метаболические изменения лимфоцитов периферической крови у детей раннего возраста с рецидивирующим обструктивным бронхитом» / Куртасова Л.М., Шакина Н.А. // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 5. С. 597-604. doi: 10.15789/1563-0625-2017-5-597-6044

33. Малахова М.Я. Эндогенная интоксикация и методы ее верификации / Малахова М.Я., Зубаткина О.В., Слепышева В.В.. - СПб.: Изд-во СПбМАПО, - 2011. - 87 с.

34. Манцкава М.М. Оценка кровообращения при экспериментальном опухолевом паранеопластизме / Манцкава М.М., Няшин Ю.И., Лохов В.А. // Российский журнал биомеханики. -2019. -№4. С. 592-598.

35. Марченко Л.А. Анемический синдром у людей пожилого возраста / Марченко Л.А., Кравченко И.В., Первушин Ю.В. // Сборник Крым. - 2016. С. 189-192.

36. Меликян А.Л. Материалы II конференции «Актуальные вопросы диагностики и лечения Rh-негативных и Rh-позитивных миелопролиферативных заболеваний» (15-16 марта 2019 г., ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, Москва) / Меликян А.Л., Туркина А.Г., Суборцева И. Н. // Клиническая онкогематология. -2021. - №14(2). - С. 262-298.

37. Мельникова Н. А. Влияние однократной и многократной гипоксии, вызванной физической нагрузкой до отказа, на содержание лимфоцитов и показатели их энергетического обмена / Мельникова Н. А., Седова Д. Г., Уланова Т. В. // Вестник новых медицинских технологий: Электронное издание. -2018. – Т.12. - №2. С. 63-67.

38. Мембраносвязанный гемоглобин в эритроцитах крови больных раком молочной железы / Жумакаева С.С., Муравлева Л.Е., Сирота В.Б. и др. // Онкология и радиология Казахстана. – 2019. - №5. – С. 29.

39. Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен): Учеб. Пособие / Под ред. М.И. Прохоровой. – Л.: Изд-во Ленингр. Ун-та, 1982. – 272с.

40. Микробиота кишечника как значимый фактор эндотоксемии и сосудистого риска у пациентов, находящихся на программном гемодиализе / Хрулев А.Е., Соловьева И.В., Хрулева Н.С. и др. // ПМ. -2019. -№8. –С. 11-16.

41. Миронова К.А. Патохимические изменения в клетках крови и нарушение функционального состояния мембран у онкобольных / Миронова К.А. // Университетская клиника. -2017. -№: 4-1 (25). - С. 127-130.

42. Михайлова З.Д. Особенности острого коронарного синдрома в сочетании с онкологическими заболеваниями у пациентов пожилого и старческого возраста / Михайлова З.Д., Пивоваров Д.В., Пивоварова А.Р. // Архивъ внутренней медицины. -2021. – Т. 11. -№2 (58). С. 122-131.

43. Мицура Е.Ф. Определение осмотической резистентности эритроцитов методом проточной цитометрии у пациентов с наследственным сфероцитозом / Мицура Е.Ф. , Пугачева Ж. Н., Волкова Л. И. // Сибирский научный медицинский журнал. -2020. – Т. 40. - №3. С. 81-87.

44. Молекулярные эффекты эритропоэтина на липидный состав мембраны эритроцитов крови пуповины новорожденных при цитомегаловирусной инфекции в период беременности / Ишутина Н.А., Андриевская И.А., Дорофиев Н.Н. и др. // Бюл. физ. и пат. дых. 2019. №71. С. 88-93.

45. Морфология эритроцитов периферической крови при раке яичников / Федотова А. Ю., Генинг Т. П., Абакумова Т. В. и др. // Казанский мед.ж. - 2019. - №5. – С. 855-859.

46. Некоторые вопросы патологии гемостаза и ДВС-синдрома / Ніконов В.В., Соколов А.С., Курсов С.В. и др. // МНС. -2019. - №1 (96). С. 22-33.

47. Непомнящих Т.С. Некоторые аспекты использования алло- и ксенографтных моделей при разработке противораковых вакцин и онколитических вирусов / Непомнящих Т.С., Гаврилова Е.В., Максюттов Р.А. // Медицинская иммунология. -2019. – Т. 21. - №2. С. 221-230.

48. Новая методика балльной оценки послеродовой анемии / Верес И.А., Белько В.И., Пересада О.А. и др. // Медицинские новости. 2017. №1. С.67-71.

49. Новиков Д.К. Оценка иммунного статуса / Новиков Д.К., Новикова В.И. -Москва: Витебский мединститут, 1996. — 282 с.

50. Одномоментное хирургическое лечение рака желудка и дивертикулёза тощей кишки / Юлдошев Р. З., Ходжамкулов А. А., Нуралиев Д. Ш. и др. // Вестник Авиценны. -2021. – Т. 23. -№1. –С. 124-129.

51. Окислительный и карбонильный стресс как фактор модификации белков и деструкции ДНК при сахарном диабете / Ланкин В. З., Тихазе А. К., Коновалова Г. Г. и др. // Терапевтический архив. 2018. №10. – С. 46-50. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/okislitelnyy-i-karbonilnyy-stress-kak-faktor-modifikatsii-belkov-i-destruktsii-dnk-pri-saharnom-diabete> (дата обращения: 24.08.2021)

52. Оксидантно-антиоксидантные взаимодействия и структурно-функциональное состояние плазматических мембран у больных раком прямой кишки / Жуков В. И., Перепада С. В., Винник Ю. А. и др. // Вісник проблем біології і медицини. 2010. №1. С. 116-120.

53. Опыт использования пеметрекседа в поддерживающей терапии метастатической аденокарциномы легкого / Владимирова Л.Ю., Сторожакова А.Э., Калабанова Е.А. и др. // Южно-российский онкологический журнал . 2021. №1. С.35-42.

54. Особенности изменений биохимических показателей у крыс с алкогольной интоксикацией на фоне коррекции с использованием липоевой кислоты / Бербериди Х.П., Попов К.А., Быков И.М. и др. // Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины. 2019. №3. С. 13-18.

55. Особенности обмена гликолитических фосфотриоз в эритроцитах онкобольных / Бакурова Е.М., Добаева Н.М., Вольянинова Л.П. и др. // Журнал фундаментальной медицины и биологии. -2015. - №4. - С. 20-22. 56. Особенности развития эндогенной интоксикации при экспериментальной обструкции мочевыводящих путей / Акименко М.А., Колмакова Т.С., Оксенюк О.С. и др. // Вестник РУДН. Серия: Медицина. 2019. №3. С. 297—307.

57. Особенности редокс-регуляции в опухолевых клетках / Зенков Н. К., Кожин П. М., Вчерашняя А. В. И др. // Сибирский научный медицинский журнал 2019. №2. С. 11-26.

58. Остапчук Е.С. Клинические и возрастные аспекты госпитальной летальности при церебральном инсульте / Остапчук Е.С., Мякотных В.С. //Вестник уральской медицинской академической науки. – 2017. - Том 14. -№2. С. 131–139. - DOI: 10.22138/2500-0918-2017-14-2-131-139

59. Оценка взаимосвязи между маркером воспаления, оксидативным стрессом и основными биохимическими параметрами, характеризующими метаболический синдром у больных с абдоминальным ожирением и постинфарктным кардиосклерозом / Меликова Н.В., Гасимова Г.Н., Багирова Н. В. и др. // International scientific review. -2020. №LXXIV. -С. 76-80.

60. Оценка эндогенной интоксикации и показателей свободнорадикального окисления у больных раком молочной железы и раком Педжета / Горошинская И.А., Нескубина И. В., Сурикова Е. И. и др. // Известия вузов. Северо-Кавказский регион. Серия: Естественные науки. - 2018. - №1 (197). –С. 112-123.

61. Оценка эндогенной интоксикации и уровня белков острой фазы у онкоурологических больных в зависимости от течения заболевания / Горошинская И.А., Шевченко А.Н., Ушакова Н.Д. и др. // Клиническая лабораторная диагностика. - 2017. - №11. – С. 666-667.

62. Параметры эритропоэза и цитоархитектоника циркулирующих эритроцитов крыс с асцитной опухолью яичников / Генинг Т.П., Федотова А.Ю.,

Долгова Д.Р. и др. // Ульяновский медико-биологический журнал. 2019. №1. С. 119-125.

63. Патогенетическая и заместительная коррекция анемии у пациентов со злокачественными новообразованиями / Романенко Н.А., Алборов А.Э., Бессмельцев С.С. и др. // ОГ. -2020. -№3. – С. 95-106.

64. Пашина Е.В. Комплекс биохимических показателей в оценке формирования стадий эндогенной интоксикации в клетке / Пашина Е.В., Золотавина М.Л. // Современные проблемы науки и образования. – 2019. – № 6. URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=29437> (дата обращения: 07.09.2021).

65. Показатель проницаемости эритроцитарных мембран в оценке функционального состояния организма / Мойсеенко В.А., Л.И. Антоненко, Л.Л. Аршинникова и др. // Крымский терапевтический журнал. – 2007. - No2. - т. 2. - С. 103-107.

66. Получение и исследование состава субстанции MIBI / Дилшод А. Х., Алишер Х. Х., Саидахмад Х. и др. // Science and Education. 2021. №4. С. 265-270.

67. Практические рекомендации по лечению анемии у онкологических больных / Снеговой А. В., Аарго М., Гладков О. А. и др. // Злокачественные опухоли. – 2016. – № 4. Спец выпуск 2. – С. 368–377.

68. Применение методов экстракорпоральной гемокоррекции в комплексной терапии злокачественных опухолей и реабилитации онкологических больных / Гильмутдинова И. Р., Еремин П. С., Фесюн А.Д. и др. // Сибирский онкологический журнал. - 2020.- №5. -С. 114-120.

69. Принципы лечения поздних лучевых повреждений прямой кишки у онкологических больных / Пасов В. В., Коротков В. А., Касымов М. Р. И др. // Андрология и генитальная хирургия. -2021. – Т. 22. -№1. - С. 21-27.

70. Прогностическое значение анемического синдрома у плановых хирургических пациентов (обзор литературы) / Калюта Т.Ю., Кажекин О.А., Илясова Т.А. и др. // Актуальные проблемы медицины. - 2020. - №1. – С. 165-175.

URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/prognosticheskoe-znachenie-anemicheskogo-sindroma-u-planovyh-hirurgicheskikh-patsientov-obzor-literatury> (дата обращения: 24.08.2021).

71. Противовозрастная саплементация системой Фамвیتال: влияние на процессы старения и здоровье (клинико-фармакологическое досье, данные доказательной медицины) / Громова О.А., Сорокин М.А., Рахтеенко А.В. и др. // МС. - 2018. - №13. - С. 142-154.

72. Реакция эритроидного ростка кроветворения на опухолевый рост у больных раком легкого / Глебова С.Е., Ершова И.Л., Дербугов В.Н. и др. // Сибирский онкологический журнал. – 2017. - 16 (1). - С. 53–58.

73. Редокс формы глутатиона при злокачественном поражении желудка разной степени агрессивности / Горошинская И.А., Сурикова Е.И., Франциянц Е.М. и др. // Бюллетень сибирской медицины. - 2020. - №4. - С. 53-60.

74. Саидов Г. Н. Эпидемиологические показатели первично-множественных опухолей (обзор литературы) / Саидов Г. Н., Абдукаримов У. Г., Махмудова Г. Ф. // Биология и интегративная медицина. - 2019. - №11 (39). – С.31-42.

75. Сахин В. Т. Значение интерлейкина 6 в патогенезе анемии у больных с солидными опухолями и возможности терапевтической коррекции / Сахин В. Т., Крюков Е. В., Рукавицын О. А. // Вестник гематологии. -2019. -№1. –С.82-90.

76. Седаков, И. Е. Онкологическая служба Донецкой Народной Республики в 2014-2017 годы – показатели работы / Седаков, И. Е. и др. //Новообразование. - 2018. –Т. 10. - № 2. –С. р. 84 – 89.

77. Сергеева Е. В. Иммунологическая реактивность людей пожилого и старческого возраста на Севере / Сергеева Е. В., Леванюк А. И. // Экология человека. - 2017. - № 1. - С. 34–40.

78. Серебряная Н. Б. Эритроциты как бактерицидные клетки, участники и регуляторы воспаления / Серебряная Н. Б., Якуцени П. П. // Иммунология. -2020. -№5. –С.458-469.

79. Славянская Т. А. Прецизионная медицина в онкологии: миф или реальность? / Славянская Т. А., Сальникова С. В. // Вестник РГМУ. -2019. -№2. – С.176-179.

80. Современное состояние многопрофильного лечения желудочной аденокарциномы / Рагулин Ю.А., Измestьева О.С., Вапняр В.В. и др. // Биология и интегративная медицина. -2020. -№1 (41). -С. 51-53.

81. Современные представления о метаболизме железа /Вазенмиллер Д.В., Муравлева Л.Е., Понамарева О.А. и др. // Медицина и экология. – 2019. - №1 (90). – С. 15-22.

82. Спасов В.В. Выраженность эндогенной интоксикации под влиянием производного глицина в токсикологическом эксперименте / Спасов В.В., Кочергина А.С., Батенев Н.А. // FORCIPE. -2019. -№ Приложение. – С. 354-355.

83. Структурное разнообразие эритроцитов пациентов с наследственным сфероцитозом / Стародубцева М.Н., Мицура Е.Ф., Челнокова И.А. и др. // Проблемы здоровья и экологии. -2018. -№2 (56). - С.109-114.

84. Структурно-функциональные показатели мембран эритроцитов крови больных раком желудка с разным гистотипом опухоли и стадией злокачественного процесса / Горошинская И.А., Немашкалова Л.А., Франциянц Е.М. и др. // Бюллетень сибирской медицины. - 2020. - №2. – С. 20-27.

85. Тактика коррекции анемии перед хирургическим лечением у больных раком желудка / Юрьев Е. Ю., Ханевич М. Д., Гипарович М. А. и др. // Вестник гематологии. - 2019. - №4. - С. 55-56. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/taktika-korreksii-anemii-pered-hirurgicheskim-lecheniem-u-bolnyh-rakom-zheludka> (дата обращения: 24.08.2021).

86. Тодоров Й. Клинические лабораторные исследования в педиатрии. // Медицина и физкультура. – 1961. – С. 295-298.

87. Федоренко О. Ю. Характеристика мембраносвязанного пула лактатдегидрогеназы лейкоцитов у здоровых мужчин разного возраста /

Федоренко О. Ю. и др. // Физиология человека. – 2015. – том 41. – № 4. – с. 119–122.

88. Хатамова М. Т. Актуальность эндоскопического исследования и гастроэнтерологические, морфологические особенности рака желудка / Хатамова М. Т., Файзуллоева Н., Бурханова Мастура // Биология и интегративная медицина. -2021. -№1 (48). – С. 89-97.

89. Цереброваскулярные заболевания и коморбидность: проблемы нейропротекции / Юсупов Ф.А., Нурматов Ш.Ж., Эрматова Ж.Б. и др. // The Scientific Heritage. -2021. – Т. 61. -№ 2. – С. 38-64.

90. Шалбаева Р. Ш. Возраст как фактор риска при раке вульвы / Шалбаева Р. Ш., Кайрбаев М. Р., Макимбетов Э. К. // Вестник российских университетов. Математика. -2017. – Т.22.- №2. –С. 247-252.

91. Эволюция взглядов на гемотрансфузию с позиций патофизиолога / Орлов Ю.П., Корпачева О.В., Говорова Н.В. и др. // Новости хирургии. -2021. - №1. С. 20-35.

92. Establishing immune scoring model based on combination of the number, function, and phenotype of lymphocytes / Tang, Guoxing et al. // Aging. – 2020. – V. 12, 10. – P. 9328-9343. doi:10.18632/aging.103208

93. 8-Chloro-Adenosine Inhibits Proliferation of MDA-MB-231 and SK-BR-3 Breast Cancer Cells by Regulating ADAR1/p53 Signaling Pathway / Ding HY, Yang WY, Zhang LH, et al. // Cell Transplant. – 2020. – V. 29. - P.963689720958656. doi:10.1177/0963689720958656

94. A Novel Non-frameshift ADA Deletion Detected by Whole Exome Sequencing in an Iranian Family with Severe Combined Immunodeficiency / Talebi T, Biglari A, Shahrooei M, et.al. // Iran J. Allergy Asthma Immunol. – 2020. – V. 19(1). – P. 94-101. doi: 10.18502/ijaai.v19i1.2422. PMID: 32245326.

95. A small molecule G6PD inhibitor reveals immune dependence on pentose phosphate pathway / Ghergurovich JM, García-Cañaveras JC, Wang J, et al. // Nat Chem Biol. – 2020. – V. 16(7). – P. 731-739. doi:10.1038/s41589-020-0533-x

96. A trade off between catalytic activity and protein stability determines the clinical manifestations of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency // Boonyuen U, Chamchoy K, Swangsri T, et al. // *Int J Biol Macromol.* – 2017. - V. 104(Pt A). - P. 145-156. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.06.002

97. Active-loop dynamics within the Michaelis complex of lactate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus* / Nie B, Lodewyks K, Deng H, et.al. // *Biochemistry.* – 2016. – V. 55(27). – P. 3803–3814.

98. ADA activity is decreased in lymphocytes from patients with advanced stage of lung cancer / Zanini D, Manfredi LH, Pelinson LP, et.al. // *Medical Oncology.* – 2019. – V. 36(9). – P. 78. DOI: 10.1007/s12032-019-1301-1

99. ADAR1 RNA editing enzyme regulates R-loop formation and genome stability at telomeres in cancer cells / Shiromoto Y, Sakurai M, Minakuchi M, et.al. // *Nat Commun.* – 2021. – V. 12(1). – P. 1654. Published 2021 Mar 12. doi:10.1038/s41467-021-21921-x

100. ADAR1 Suppresses Interferon Signaling in Gastric Cancer Cells by MicroRNA-302a-Mediated IRF9/STAT1 Regulation / Jiang L, Park MJ, Cho CJ, et al. // *Int J Mol Sci.* – 2020. – V. 21(17). – P. 6195. Published 2020 Aug 27. doi:10.3390/ijms21176195

101. Adenosine deaminase 2 activity negatively correlates with age during childhood / Bowers SM, Gibson KM, Cabral DA, Brown KL. // *Pediatr Rheumatol Online J.* – 2020. - V. 18(1). – P. 54. Published 2020 Jul 10. doi:10.1186/s12969-020-00446-5

102. Adenosine deaminase activity in pig saliva: analytical validation of two spectrophotometric assays / Tecles F, Rubio CP, Contreras-Aguilar MD, et al. // *J. Vet. Diagn. Invest.* – 2018. – V. 30(1). – P. 175-179. doi:10.1177/1040638717742947

103. Adenosine Deaminase as a Biomarker of Tenofovir Mediated Inflammation in Naïve HIV Patients / Conesa-Buendía FM, Llamas-Granda P, Atencio P, et al. // *Int J Mol Sci.* – 2020. – V. 21(10). – P. 3590. Published 2020 May 19. doi:10.3390/ijms21103590

104. Adenosine deaminase inhibition suppresses progression of 4T1 murine breast cancer by adenosine receptor-dependent mechanisms / Kutryb-Zajac B, Koszalka P, Mierzejewska P, et al. // *J. Cell Mol. Med.* – 2018. – V. 22(12). – P. 5939-5954. doi:10.1111/jcmm.13864

105. Adenosine deaminase-1 enhances germinal center formation and functional antibody responses to HIV-1 Envelope DNA and protein vaccines / Gary E, O'Connor M, Chakhtoura M, et.al. // *Vaccine.* – 2020. – V. 38 (22). – P. 3821-3831. doi: 10.1016/j.vaccine.2020.03.047. Epub 2020 Apr 10. PMID: 32280045; PMCID: PMC7190415.

106. Adenosine Metabolism in COPD: A Study on Adenosine Levels, 5'-Nucleotidase, Adenosine Deaminase and Its Isoenzymes Activity in Serum, Lymphocytes and Erythrocytes / Singh Patidar B, Meena A, Kumar M, et.al. // *COPD.* – 2018. – V. 15(6). – P. 559-571. doi: 10.1080/15412555.2018.1537365. Epub 2019 Jan 19. PMID: 30663435.

107. Adenosine Metabolism in the Cerebral Cortex from Several Mice Models during Aging / Sánchez-Melgar A, Albasanz JL, Pallàs M, et.al. // *Int J Mol Sci.* – 2020. – V. 21(19). – P.7300. Published 2020 Oct 2. doi:10.3390/ijms21197300

108. Adenosine signaling and adenosine deaminase regulation of immune responses: impact on the immunopathogenesis of HIV infection / Passos DF, Bernardes VM, da Silva JLG, et.al. // *Purinergic Signal.* – 2018. – V. 14(4). – P. 309-320. doi:10.1007/s11302-018-9619-2

109. Adenosine: The common target between cancer immunotherapy and glaucoma in the eye / Hallaj S, Mirza-Aghazadeh-Attari M, Arasteh A, et.al. // *Life Sci.* – 2021. – V. 1; 282. – P. 119796. doi: 10.1016/j.lfs.2021.119796. Epub 2021 Jul 8. PMID: 34245774.

110. 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.

111. Ahmad S. Mercury chloride toxicity in human erythrocytes: enhanced generation of ROS and RNS, hemoglobin oxidation, impaired antioxidant power, and inhibition of plasma membrane redox system / Ahmad S, Mahmood R. // *Environ Sci Pollut Res Int.* – 2019. - V. 26(6). -P. 5645-5657. doi: 10.1007/s11356-018-04062-5. Epub 2019 Jan 5. PMID: 30612358.

112. Alnakshbandi, Abdulkadir A. “Aminoglycosides induce fragility of human red cell membrane: an in vitro study / Alnakshbandi, Abdulkadir A. // *Indian journal of pharmacology.* – 2015. - vol. 47,1. P. 114-6. doi:10.4103/0253-7613.150375

113. Anti-Inflammatory and Anti-Platelet Properties of Lipid Bioactives from Apple Cider By-Products / Tsoupras A, Moran D, Byrne T, et.al. // *Molecules.* – 2021. – V. 26(10). – P. 28-69. doi: 10.3390/molecules26102869. PMID: 34066136; PMCID: PMC8150973.

114. Asymmetric dimerization of adenosine deaminase acting on RNA facilitates substrate recognition / Thuy-Boun AS, Thomas JM, Grajo HL, et al. // *Nucleic Acids Res.* – 2020. – V. 48(14). – P. 7958-7972. doi:10.1093/nar/gkaa532

115. Augoff K. Lactate dehydrogenase 5: an old friend and a new hope in the war on cancer / Augoff K, Hryniewicz-Jankowska A, Tabola R.// *Cancer Lett.* -2015. V. 358(1). – P. 1–7.

116. Bax BE. Erythrocytes as Carriers of Therapeutic Enzymes / Bax BE. // *Pharmaceutics.* – 2020. - V. 12(5). – P. 435. Published 2020 May 8. doi:10.3390/pharmaceutics12050435

117. Bioluminescence-based cytotoxicity assay for simultaneous evaluation of cell viability and membrane damage in human hepatoma HepG2 cells / Uno K, Murotomi K, Kazuki Y, et.al. // *Luminescence.* – 2018. – V. 33(3). – P. 616-624. doi: 10.1002/bio.3454. Epub 2018 Feb 8. PMID: 29424036.

118. Blockade of 6-phosphogluconate dehydrogenase generates CD8⁺ effector T cells with enhanced anti-tumor function / Daneshmandi S, Cassel T, Lin P, et.al. //

Cell Rep. – 2021. – V. 9;34(10). – P. 108831. doi: 10.1016/j.celrep.2021.108831. PMID: 33691103; PMCID: PMC8051863.

119. Blocking Antibodies Targeting the CD39/CD73 Immunosuppressive Pathway Unleash Immune Responses in Combination Cancer Therapies / Perrot I, Michaud HA, Giraudon-Paoli M, et.al. // Cell Rep. – 2019. – V. 27(8). – P. 2411-2425.e9. doi: 10.1016/j.celrep.2019.04.091. PMID: 31116985.

120. Blood pressure and risk of cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition / Christakoudi S, Kakourou A, Markozannes G, et al. // Int J Cancer. – 2020. – V. 146(10). – P. 2680-2693. doi:10.1002/ijc.32576

121. Brand A. LDHA-Associated Lactic Acid Production Blunts Tumor Immunosurveillance by T and NK Cells / Brand A, Singer K, Koehl GE. // Cell Metab. – 2016. – V. 8;24(5). –P. 657-671. doi: 10.1016/j.cmet.2016.08.011. Epub 2016 Sep 15. PMID: 27641098.

122. Cachexia as Evidence of the Mechanisms of Resistance and Tolerance during the Evolution of Cancer Disease / Maccio A, Sanna E, Neri M, et.al. // Int J Mol Sci. – 2021. – V. 22(6). – P.28-90. Published 2021 Mar 12. doi:10.3390/ijms22062890

123. Campos-Contreras ADR. Purinergic Signaling in the Hallmarks of Cancer / Campos-Contreras ADR, Díaz-Muñoz M, Vázquez-Cuevas FG. // Cells. – 2020. – V. 9(7). – P. 1612. Published 2020 Jul 3. doi:10.3390/cells9071612

124. CD73 facilitates EMT progression and promotes lung metastases in triple-negative breast cancer / Petruk N, Tuominen S, Åkerfelt M, et.al. // Sci Rep. – 2021. – V. 11(1). – P. 6035. doi: 10.1038/s41598-021-85379-z. PMID: 33727591; PMCID: PMC7966763.

125. CD73 or CD39 Deletion Reveals Different Mechanisms of Formation for Spontaneous and Mechanically Stimulated Adenosine and Sex Specific Compensations in ATP Degradation / Wang Y, Copeland J, Shin M, et.al. // ACS Chem Neurosci. – 2020. – V. 11(6). – P. 919-928. doi: 10.1021/acscchemneuro.9b00620. Epub 2020 Mar 4. PMID: 32083837; PMCID: PMC7335217.

126. Changes in the blood antioxidant defense of advanced age people / Kozakiewicz M, Kornatowski M, Krzywińska O, et.al. // Clin Interv Aging. – 2019. – V. 1; 14. – P. 763-771. doi: 10.2147/CIA.S201250. PMID: 31118597; PMCID: PMC6507109.

127. Characterization of the N⁶-etheno-bridge method to assess extracellular metabolism of adenine nucleotides: detection of a possible role for purine nucleoside phosphorylase in adenosine metabolism / Jackson EK, Gillespie DG, Cheng D, et.al // Purinergic Signal. – 2020. – V. 16(2). – P. 187-211. doi:10.1007/s11302-020-09699-x

128. Characterization of total adenosine deaminase activity (ADA) and its isoenzymes in saliva and serum in health and inflammatory conditions in four different species: an analytical and clinical validation pilot study / Contreras-Aguilar MD, Tvarijonaviciute A, Monkeviciene I, et al. // BMC Vet Res. – 2020. – V. 16(1). – P. 384. Published 2020 Oct 12. doi:10.1186/s12917-020-02574-2

129. Chemoprotective effect of atorvastatin against benzo(a)pyrene-induced lung cancer via the inhibition of oxidative stress and inflammatory parameters / Du X, Li D, Wang G, et al. // Ann Transl Med. – 2021. – V. 9(4). – P. 355. doi:10.21037/atm-20-7770

130. Chen WR. Phthalides serve as potent modulators to boost fetal hemoglobin induction therapy for β -hemoglobinopathies / Chen WR, Chou CC, Wang CC. // Blood Adv. – 2019. – V. 14;3(9). - P. 1493-1498. doi: 10.1182/bloodadvances.2019031120. PMID: 31072835; PMCID: PMC6517670.

131. Chung SS. Aging, hematopoiesis, and the myelodysplastic syndromes / Chung SS, Park CY. // Hematology Am Soc Hematol Educ Program. – 2017. – V. 8;2017(1). – P. 73-78. doi: 10.1182/asheducation-2017.1.73.

132. Clustering of adenosine A_{2B} receptors with ectonucleotidases in caveolin-rich lipid rafts underlies immunomodulation by *Leishmania amazonensis* / Figueiredo AB, de Oliveira E Castro RA, Nogueira-Paiva NC, et.al. // FASEB J. – 2021. – V. 35(5). – P. e21509. doi: 10.1096/fj.202002396RR. PMID: 33813781.

133. Colchicine Alleviates Cholesterol Crystal-Induced Endothelial Cell Pyroptosis through Activating AMPK/SIRT1 Pathway / Yang M, Lv H, Liu Q, et.al. // *Oxid Med Cell Longev.* – 2020. – V. 2020. – P. 9173530. doi: 10.1155/2020/9173530. PMID: 32733639; PMCID: PMC7378601.

134. Comparison of pleural effusion features and biomarkers between talaromycosis and tuberculosis in non-human immunodeficiency virus-infected patients / Qiu Y, Zeng W, Zhang H, et.al. // *BMC Infect Dis.* – 2019. – V. 19(1). – P. 745. Published 2019 Aug 27. doi:10.1186/s12879-019-4376-6

135. Compendium of Genetic Modifiers of Mitochondrial Dysfunction Reveals Intra-organelle Buffering / To TL, Cuadros AM, Shah H, et.al. // *Cell.* – 2019. – V. 179(5). – P. 1222-1238.e17. doi: 10.1016/j.cell.2019.10.032. PMID: 31730859; PMCID: PMC7053407.

136. Crystal structure of Plasmodium falciparum adenosine deaminase reveals a novel binding pocket for inosine / Jaruwat A, Riengrunroj P, Ubonprasert S, et.al. // *Arch Biochem Biophys.* – 2019. – V. 30; 667. – P. 6-13. doi: 10.1016/j.abb.2019.04.002. Epub 2019 Apr 16. PMID: 31002765.

137. Cumming BM. Relevance of the Warburg Effect in Tuberculosis for Host-Directed Therapy / Cumming BM, Pacl HT, Steyn AJC. // *Front Cell Infect Microbiol.* – 2020. – V. 10. – P. 576596. Published 2020 Sep 18. doi:10.3389/fcimb.2020.576596

138. Cytotoxic effect of juglone on human peripheral blood lymphocytes / Vardhini et al. // *Asian J Pharm Clin Res*, Vol 6 Issue 4, 2013 – P. 178-186.

139. Defining the ATPome reveals cross-optimization of metabolic pathways / Bennett NK, Nguyen MK, Darch MA, et.al. // *Nat Commun.* – 2020. V. 28;11(1). – P.4319. doi: 10.1038/s41467-020-18084-6. PMID: 32859923; PMCID: PMC7455733.

140. Deletion of Lactate Dehydrogenase-A in Myeloid Cells Triggers Antitumor Immunity / Seth P, Csizmadia E, Hedblom A.et.al. // *Cancer Res.* – 2017. 77(13). – P. 3632-3643. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-2938. Epub 2017 Apr 26. PMID: 28446465; PMCID: PMC5505499.

141. Development of Adenosine Deaminase-Specific IgY Antibodies: Diagnostic and Inhibitory Application / Łupicka-Słowik A, Psurski M, Grzywa R, et.al. // *Appl Biochem Biotechnol.* – 2018. – V. 184(4). – P.1358-1374. doi: 10.1007/s12010-017-2626-x. Epub 2017 Oct 17. PMID: 29043661; PMCID: PMC5889419.

142. Diagnostic Accuracy of Pleural Fluid Adenosine Deaminase for Diagnosing Tuberculosis / Palma RM, Bielsa S, Esquerda A, et.al. // *Meta-analysis of Spanish Studies. Arch Bronconeumol (Engl Ed).* – 2019. – V. 55(1). – P. 23-30. English, Spanish. doi: 10.1016/j.arbres.2018.05.007. Epub 2018 Jun 30. PMID: 30612601

143. Diagnostic Accuracy with Total Adenosine Deaminase as a Biomarker for Discriminating Pleural Transudates and Exudates in a Population-Based Cohort Study Maranhão BHF, da Silva Junior CT, Barillo JL, et.al. // *Dis Markers.* – 2021. – V. 10; 2021. – P. 6648535. doi: 10.1155/2021/6648535. PMID: 33936323; PMCID: PMC8055387.

144. Differences in cytotoxicity of lung epithelial cells exposed to titanium dioxide nanofibers and nanoparticles: Comparison of air-liquid interface and submerged cell cultures / Medina-Reyes EI, Delgado-Buenrostro NL, Leseman DL, et.al. // *Toxicol In Vitro.* – 2020. – V. 65. – P. 104798. doi: 10.1016/j.tiv.2020.104798. Epub 2020 Feb 19. PMID: 32084520. Ding F. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) / Biomembranes.* – 2013. – V. 1466. - Issues 1–2. – P. 306-314.

145. Ding J. Elevated lactate dehydrogenase (LDH) can be a marker of immune suppression in cancer: Interplay between hematologic and solid neoplastic clones and their microenvironments / Ding J, Karp JE, Emadi A. // *Cancer Biomark.* – 2017. – V. 4;19(4). – P. 353-363. doi: 10.3233/CBM-160336. PMID: 28582845

146. Dolly A, Dumas JF, Servais S. Cancer cachexia and skeletal muscle atrophy in clinical studies: what do we really know? / Dolly A, Dumas JF, Servais S.J // *Cachexia Sarcopenia Muscle.* – 2020. – V. 11(6). – P. 1413-1428. doi:10.1002/jcsm.12633

147. Donor glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency decreases blood quality for transfusion / Francis RO, D'Alessandro A, Eisenberger A, et.al. // *J Clin*

Invest. – 2020. – V. 1;130 (5). – P. 2270-2285. doi: 10.1172/JCI133530. PMID: 31961822; PMCID: PMC7191001.

148. Dwyer KM. Conversion of extracellular ATP into adenosine: a master switch in renal health and disease / Dwyer KM, Kishore BK, Robson SC. // *Nat Rev Nephrol.* – 2020. – V. 16(9). – P. 509-524. doi: 10.1038/s41581-020-0304-7. Epub 2020 Jul 8. PMID: 32641760.

149. Emerging Landscapes of Tumor Immunity and Metabolism / Wu F, Cheng Y, Wu L. Et.al. // *Front Oncol.* – 2020. – V. 7; 10. – P. 575037. doi: 10.3389/fonc.2020.575037. PMID: 33117713; PMCID: PMC7575711

150. Endothelial Cells as Tools to Model Tissue Microenvironment in Hypoxia-Dependent Pathologies / Majewska A, Wilkus K, Brodaczewska K, et.al. // *Int J Mol Sci.* – 2021. – V. 22(2). – P. 520. Published 2021 Jan 7. doi:10.3390/ijms22020520

151. Enzymatic and thermodynamic profiles of a heterotetramer lactate dehydrogenase isozyme in swine / Goto T, Sugawara K, Nakamura S, et.al. // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2016. – V. 28; 479 (4). – P. 860-867. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.09.118. Epub 2016 Sep 23. PMID: 27671200.

152. Erythrocyte Metabolic Reprogramming by Sphingosine 1-Phosphate in Chronic Kidney Disease and Therapies / Xie T, Chen C, Peng Z, et.al. // *Circ Res.* – 2020. – V. 127(3). – P. 360-375. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.119.316298. Epub 2020 Apr 14. PMID: 32284030.

153. Expression of Adenosine A_{2B} Receptor and Adenosine Deaminase in Rabbit Gastric Mucosa ECL Cells / Arin RM, Vallejo AI, Rueda Y, et.al. // *Molecules.* – 2017. V. 22(4). P.625. Published 2017 Apr 12. doi:10.3390/molecules22040625

154. Extracellular ATP and P2 purinergic signalling in the tumour microenvironment / Di Virgilio F, Sarti AC, Falzoni S, et.al. // *Nature Reviews Cancer.* – 2018. – V. 18(10). – P. 601-618. DOI: 10.1038/s41568-018-0037-0

155. Extracellular lactate: a novel measure of T cell proliferation / Grist JT, Jarvis LB, Georgieva Z, et.al. // *J Immunol.* – 2018. – V. 200(3). – P. 1220–1226.

156. First Occurrence of Plasmablastic Lymphoma in Adenosine Deaminase-Deficient Severe Combined Immunodeficiency Disease Patient and Review of the Literature / Migliavacca M, Assanelli A, Ponzoni M, et al. // *Front Immunol.* – 2018. – V. 9. – P. 113. Published 2018 Feb 2. doi:10.3389/fimmu.2018.00113

157. Fischer A. Gene therapy for severe combined immunodeficiencies and beyond / Fischer A, Hacein-Bey-Abina S. // *J Exp Med.* – 2020. – V. 6;217(2). –P. 20190607. doi: 10.1084/jem.20190607. PMID: 31826240; PMCID: PMC7041706.

158. Gastric cancer - clinical and epidemiological aspects / Venerito M, Link A, Rokkas T, et.al. // *Helicobacter.* – 2016. – V. 21. – Suppl. 1. – P. 39-44. doi: 10.1111/hel.12339. PMID: 27531538.

159. GBD 2017 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017 [published correction appears in *Lancet.* 2019 Jun 22;393(10190):e44]. *Lancet.* 2018;392(10159):1789-1858. doi:10.1016/S0140-6736(18)32279-7

160. Geltink RIK. Unraveling the complex interplay between T cell metabolism and function / Geltink RIK, Kyle RL, Pearce EL. // *Annu Rev Immunol.* – 2018. – V. 36. – P. 461–488. 10.1146/annurev-immunol-042617-053019

161. Generation of erythroid cells from polyploid giant cancer cells: re-thinking about tumor blood supply / Yang Z, Yao H, Fei F, et.al. // *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* - 2018. – V. 144(4). – P. 617-627. doi: 10.1007/s00432-018-2598-4. Epub 2018 Feb 7. PMID: 29417259.

162. Glucose as a Major Antioxidant: When, What for and Why It Fails? / Cherkas A, Holota S, Mdzinarashvili T, et.al. // *Antioxidants (Basel).* – 2020. – V. 5;9(2). – P. 140. doi: 10.3390/antiox9020140. PMID: 32033390; PMCID: PMC7070274.

163. Glutathione peroxidase, glutathione-S-transferase, catalase, xanthine oxidase, Cu-Zn superoxide dismutase activities, total glutathione, nitric oxide, and

malondialdehyde levels in erythrocytes of patients with small cell and non-small cell lung cancer / Kaynar H, Meral M, Turhan H, et.al. // *Cancer Lett.* – 2005. – V. 28; 227(2). – P. 133-9. doi: 10.1016/j.canlet.2004.12.005. Epub 2005 Jan 8. PMID: 16112416.

164. Glycolysis - a key player in the inflammatory response / Soto-Herederó G, Gómez de Las Heras MM, Gabandé-Rodríguez E, et.al. // *FEBS J.* – 2020. – V. 287(16). – P. 3350-3369. doi: 10.1111/febs.15327. Epub 2020 Apr 27. PMID: 32255251; PMCID: PMC7496292.

165. Hu X. Central role of lactate and proton in cancer cell resistance to glucose deprivation and its clinical translation / Hu X, Chao M, Wu H. // *Signal Transduct Target Ther.* – 2017. – V. 2. – P. 16047. Published 2017 Mar 10. doi:10.1038/sigtrans.2016.47

166. Hypertension and Prohypertensive Antineoplastic Therapies in Cancer Patients / Van Dorst DCH, Dobbin SJH, Neves KB, et al. // *Circ Res.* – 2021. – V. 128(7). – P. 1040-1061. doi:10.1161/CIRCRESAHA.121.318051

167. Ibtissam Marchiq. Hypoxia, cancer metabolism and the therapeutic benefit of targeting lactate (H⁺symporters) / Ibtissam Marchiq, Jacques Pouysségur // *J Mol Med.* – 2016. – V. 94. – P. 155–171. doi: 10.1007/s00109-015-1307-x

168. Immune cell concentrations among the primary tumor microenvironment in colorectal cancer patients predicted by clinicopathologic characteristics and blood indexes / Guo G, Wang Y, Zhou Y, et.al. // *J Immunother Cancer.* – 2019. – V. 12; 7(1). – P. 179. doi: 10.1186/s40425-019-0656-3. PMID: 31300050; PMCID: PMC6625045

169. Immunosuppression in Gliomas via PD-1/PD-L1 Axis and Adenosine Pathway / Scheffel TB, Grave N, Vargas P, et.al. // *Front Oncol.* – 2021. – V.10. – P. 617385. doi: 10.3389/fonc.2020.617385. PMID: 33659213; PMCID: PMC7919594.

170. Impaired antioxidant capacity causes a disruption of metabolic homeostasis in sickle erythrocytes / Chaves NA, Alegria TGP, Dantas LS, et.al. // *Free Radic Biol*

Med. – 2019. – V. 141. – P. 34-46. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.05.034. Epub 2019 Jun 1. PMID: 31163255.

171. Impairment of testicular function in electronic cigarette (e-cig, e-cigs) exposed rats under low-voltage and nicotine-free conditions / Vivarelli F, Canistro D, Cirillo S, et.al. // Life Sci. – 2019. – V. 228. – P. 53-65. doi: 10.1016/j.lfs.2019.04.059. Epub 2019 Apr 25. PMID: 31029780.

172. Increased Cytokeratin 19 Fragment Levels Are Positively Correlated with Adenosine Deaminase Activity in Malignant Pleural Effusions from Adenocarcinomas / Barillo JL, da Silva Junior CT, Silva PS, et al. // Dis Markers. – 2018. - V. 2018. P. 2609767. Published 2018 May 8. doi:10.1155/2018/2609767

173. Individual osmotic fragility distribution: a new parameter for determination of the osmotic properties of human red blood cells / Walski, Tomasz et al. // BioMed research international. – 2014. – V. 2014. – P. 162102. doi:10.1155/2014/162102

174. Inflammatory Bowel Diseases: It's Time for the Adenosine System / Antonioli L, Fornai M, Pellegrini C, et.al. // Front Immunol. – 2020. V. 11. – P. 1310. Published 2020 Jul 29. doi:10.3389/fimmu.2020.01310

175. Inhibiting Adenosine Receptor Signaling Promotes Accumulation of Effector CD4⁺ T Cells in the Lung Parenchyma During Severe Tuberculosis / Amaral EP, Machado de Salles É, Barbosa Bomfim CC, et.al. // J Infect Dis. – 2019. V. 23;219(6). P. 964-974. doi: 10.1093/infdis/jiy586. PMID: 30307561.

176. Inhibition of G6PD activity attenuates right ventricle pressure and hypertrophy elicited by VEGFR inhibitor + hypoxia / Kitagawa A, Jacob C, Jordan A, et.al. // J Pharmacol Exp Ther. – 2021. – V. 23: JPET-AR-2020-000166. doi: 10.1124/jpet.120.000166. Epub ahead of print. PMID: 33758056.

177. Janko Nikolich-Žugich. The twilight of immunity: emerging concepts in aging of the immune system / Janko Nikolich-Žugich. // Nat Immunol. – 2018. – V. 19(1). – P. 10-19. doi: 10.1038/s41590-017-0006-x. Epub 2017 Dec 14.

178. Kasprzak A. The Role of Tumor Microenvironment Cells in Colorectal Cancer (CRC) Cachexia // *Int J Mol Sci.* – 2021. – V. 22(4). – P. 1565. Published 2021 Feb 4. doi:10.3390/ijms22041565

179. Kishton RJ. Metabolic regulation of T cell longevity and function in tumor immunotherapy / Kishton RJ, Sukumar M, Restifo NP. // *Cell Metab.* – 2017. – V. 26. – P. 94–109. 10.1016/j.cmet.2017.06.016

180. Ko J. Sustained adenosine exposure causes endothelial mitochondrial dysfunction via equilibrative nucleoside transporters / Ko J, Rounds S, Lu Q. // *Pulm Circ.* – 2020. – V. 10(2). – P. 20458940-20924994. Published 2020 May 18. doi:10.1177/2045894020924994

181. Kuhn V. Red Blood Cell Function and Dysfunction: Redox Regulation, Nitric Oxide Metabolism, Anemia / Kuhn, V. // *Antioxidants & Redox Signaling.* – 2017. – V. 26. – P. 718 - 742.

182. Lactate dehydrogenase a promotes the invasion and proliferation of pituitary adenoma / An J, Zhang Y, He J, Zang Z, et.al. // *Sci Rep.* – 2017. V. 7(1). P. 4734.

183. Lactate dehydrogenase A: A key player in carcinogenesis and potential target in cancer therapy / Feng Y, Xiong Y, Qiao T, et.al. // *Cancer Med.* – 2018. – V. 7(12). - P. -:6124-6136. doi: 10.1002/cam4.1820. Epub 2018 Nov 6. PMID: 30403008; PMCID: PMC6308051.

184. Lactate dehydrogenase inhibition synergizes with IL-21 to promote CD8⁺ T cell stemness and antitumor immunity / Hermans D, Gautam S, García-Cañaveras JC, et. Al. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2020. – V. 17; 117(11). – P. 6047-6055. doi: 10.1073/pnas.1920413117. Epub 2020 Mar 2. PMID: 32123114; PMCID: PMC7084161.

185. Lactic Acidosis and Hypoglycemia in a Patient with Gastric Diffuse Large B-Cell Lymphoma due to the Warburg Effect / Hamada T, Kaku T, Mitsu S, et.al. // *Case Rep Oncol.* – 2020. – V. 13(2). – P. 1047-1052. Published 2020 Sep 1. doi:10.1159/000509510

186. Lebelo MT. Warburg effect and its role in tumourigenesis / Lebelo MT, Joubert AM, Visagie MH. // Arch Pharm Res. – 2019. – V. 42(10). – P. 833-847. doi: 10.1007/s12272-019-01185-2. Epub 2019 Aug 31. PMID: 31473944.

187. Lowry O.H., Rosenbrouch N.J., Parr A.L. // Biol. Chem. – 1951. – V.193, №1. – P. 265-267.

188. Magni G. Adenosine Signaling in Autoimmune Disorders / Magni G, Ceruti S. // Pharmaceuticals (Basel). – 2020. – V. 13(9). – P.260. Published 2020 Sep 22. doi:10.3390/ph13090260

189. Management of cancer-associated anemia with erythropoiesis-stimulating agents: ASCO/ASH clinical practice guideline update / Julia Bohlius, Kari Bohlke, Roberto Castelli et. al. // Blood Adv. – 2019. – V. 3 (8). – P. 1197–1210. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2018030387>

190. Martinez M. CAR T Cells for Solid Tumors: New Strategies for Finding, Infiltrating, and Surviving in the Tumor Microenvironment / Martinez M, Moon EK. // Front Immunol. – 2019. - V.5;10. – P. 128. doi: 10.3389/fimmu.2019.00128. PMID: 30804938; PMCID: PMC6370640.

191. Mary Risinger. Red cell membrane disorders: structure meets function Affiliations expand / Mary Risinger, Theodosia A Kalfa. // Blood. – 2020. – V. 10; 136(11). – P. 1250-1261. doi: 10.1182/blood.2019000946.

192. Mass media and risk factors for cancer: the under-representation of age / Macdonald S, Cunningham Y, Patterson C, et.al. // BMC Public Health. – 2018. – V. 26; 18(1). – P. 490. doi: 10.1186/s12889-018-5341-9. PMID: 29695238; PMCID: PMC5918870.

193. Massaccesi L. Erythrocytes as markers of oxidative stress related pathologies / Massaccesi L, Galliera E, Corsi Romanelli MM. // Mech Ageing Dev. – 2020. – V. 191. – P. 111-333. doi: 10.1016/j.mad.2020.111333. Epub 2020 Aug 16. PMID: 32814082.

194. Metabolic Flexibility as an Adaptation to Energy Resources and Requirements in Health and Disease / Smith, Reuben L et al. // *Endocrine reviews*. – 2018. – V. 39, 4. – P. 489-517. doi:10.1210/er.2017-00211

195. Metabolic Remodeling, Inflammasome Activation, and Pyroptosis in Macrophages Stimulated by *Porphyromonas gingivalis* and Its Outer Membrane Vesicles / Fleetwood AJ, Lee MKS, Singleton W, et. Al. // *Front Cell Infect Microbiol*. – 2017. – V. 4;7. – P. 351. doi: 10.3389/fcimb.2017.00351. PMID: 28824884; PMCID: PMC5543041.

196. Metastatic Testicular Choriocarcinoma: An Unusual Cause of Upper Gastrointestinal Bleed / Chaar A, Mouabbi JA, Alrajjal A, et.al. // *Cureus*. – 2019. – V. 26;11(7). – P. 5243. doi: 10.7759/cureus.5243. PMID: 31565641; PMCID: PMC6759043.

197. Mikashinovich Z.I. Biochemical Changes in Erythrocytes as a Molecular Marker of Cell Damage during Long-Term Simvastatin Treatment / Mikashinovich Z.I., Belousova E.S. // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. – 2016. – V. 161, Issue 4, - P. 600–603.

198. Mittelbrunn M. Hallmarks of T cell aging / Mittelbrunn M, Kroemer G. // *Nat Immunol*. – 2021. – V. 22(6). – P. 687-698. doi: 10.1038/s41590-021-00927-z. Epub 2021 May 13. PMID: 33986548.

199. Mutational landscape of severe combined immunodeficiency patients from Turkey / Firtina S, Yin Ng Y, Hatirnaz Ng O, et.al. // *Int J Immunogenet*. – 2020. – V. 47(6). – P. 529-538. doi: 10.1111/iji.12496. Epub 2020 May 22. PMID: 32445296.

200. NAD⁺ precursor modulates post-ischemic mitochondrial fragmentation and reactive oxygen species generation via SIRT3 dependent mechanisms / Klimova N, Fearnow A, Long A, et.al. // *Exp Neurol*. – 2020. – V. 325. – P. 113-144. doi: 10.1016/j.expneurol.2019.113144. Epub 2019 Dec 16. PMID: 31837320.

201. NADPH homeostasis in cancer: functions, mechanisms and therapeutic implications / Ju, H. Q., Lin, J. F., Tian, T., et.al. // *Signal transduction and targeted therapy*. – 2020. – V. 5(1). – P. 231. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00326-0>

202. NADPH levels affect cellular epigenetic state by inhibiting HDAC3-Ncor complex / Li W, Kou J, Qin J, et.al. // *Nat Metab.* – 2021. – V. 3(1). – P. 75-89. doi: 10.1038/s42255-020-00330-2. Epub 2021 Jan 18. PMID: 33462516.

203. Navas LE. NAD⁺ metabolism, stemness, the immune response, and cancer / Navas LE, Carnero A. // *Signal Transduct Target Ther.* – 2021. – V. 6(1). – P. 2. doi: 10.1038/s41392-020-00354-w. PMID: 33384409; PMCID: PMC7775471.

204. New role for an old molecule: The 2,3-diphosphoglycerate case / Tellone E, Barreca D, Russo A, Galtieri A, Ficarra S. // *Biochim Biophys Acta Gen. Subj.* – 2019. – V. 1863(10). – P. 1602-1607. doi: 10.1016/j.bbagen.2019.07.002. Epub 2019 Jul 4. PMID: 31279646.

205. Normal Tumor Markers and Increased Adenosine Deaminase in Pericardial Effusion Misdiagnosed as Tuberculous Pericarditis Ultimately Proven as Lung Adenocarcinoma with Pericardial Metastasis: a Case Report and Literature Review / Ge YL, Liu CH, Zhang Q, et.al. // *Clin Lab.* – 2019. – V. 1;65(5). doi: 10.7754/Clin.Lab.2018.181036. PMID: 31115232.

206. Omenn syndrome caused by a novel homozygous mutation in recombination activating gene 1 / Benhsaien I, Essadssi S, Elkhatabi L, et.al. // *Immunobiology.* – 2021. V. 226(3). – P. 152090. doi: 10.1016/j.imbio.2021.152090. Epub 2021 Apr 28. PMID: 33964732.

207. Oral supplementation with liposomal glutathione elevates body stores of glutathione and markers of immune function / Sinha R, Sinha I, Calcagnotto A, et.al. // *Eur J Clin Nutr.* – 2018. – V. 72(1). – P. 105-111. doi: 10.1038/ejcn.2017.132. Epub 2017 Aug 30. PMID: 28853742; PMCID: PMC6389332.

208. Oxidative stress assessment in breath-hold diving / Mrakic-Sposta S, Vezzoli A, Rizzato A, et.al. // *Eur J Appl Physiol.* – 2019. – V. 119 (11-12). – P. 2449-2456. doi: 10.1007/s00421-019-04224-4. Epub 2019 Sep 13. PMID: 31520216.

209. Oxidized proteins and activity of the Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger in erythrocytes of patients with acute alcohol intoxication / Deminchik L., Kolesnikova Y., Klyuyev D., et.al. // *Acta Biochimica Polonica.* – 2019. - V.66. - №3. – P. 351-354.

210. Pathogenesis and Treatment Options of Cancer Related Anemia: Perspective for a Targeted Mechanism-Based / Clelia Madeddu, Giulia Gramignano, Giorgio Astara et. al. // Approach Front. Physiol. – 2018. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01294>

211. Pawelec G. Immunosenescence and cancer / Pawelec G. // Biogerontology. – 2017. – V. 18(4). – P.717-721. doi: 10.1007/s10522-017-9682-z. Epub 2017 Feb 20. PMID: 28220304.

212. Pelegrin P. P2X7 receptor and the NLRP3 inflammasome: Partners in crime / Pelegrin P. // Biochem Pharmacol. – 2021. – V. 187. – P. 114-385. doi: 10.1016/j.bcp.2020.114385. Epub 2020 Dec 20. PMID: 33359010.

213. Performance of the quantification of adenosine deaminase and determination of the lactate dehydrogenase/adenosine deaminase ratio for the diagnosis of pleural tuberculosis in children and adolescents / Vieira JL, Foschiera L, Ferreira ICS, et.al. // J. Bras Pneumol. – 2021. – V. 47(2). – P. e20200558. English, Portuguese. doi: 10.36416/1806-3756/e20200558. PMID: 34008761.

214. Plasma Adenosine Deaminase (ADA)-1 and -2 Demonstrate Robust Ontogeny Across the First Four Months of Human Life / Odumade OA, Plotkin AL, Pak J, et.al. // Front Immunol. – 2021. – V. 12. – P. 578-700. doi: 10.3389/fimmu.2021.578700. PMID: 34122398; PMCID: PMC8190399.

215. Prado-Garcia H. Lactic Acidosis in the Presence of Glucose Diminishes Warburg Effect in Lung Adenocarcinoma Cells / Prado-Garcia H, Campa-Higareda A, Romero-Garcia S. // Front Oncol. – 2020. – V. 10. – P. 807. Published 2020 Jun 12. doi:10.3389/fonc.2020.00807

216. Probing inhibition mechanisms of adenosine deaminase by using molecular dynamics simulations / Tian X, Liu Y, Zhu J, et.al. // PLoS One. – 2018. – V. 13(11). – P. e0207234. doi: 10.1371/journal.pone.0207234. PMID: 30444912; PMCID: PMC6239307.

217. Prognostic significance of neutrophil/lymphocyte ratio (NLR) and correlation with PET-CT metabolic parameters in small cell lung cancer (SCLC) /

Mirili C, Guney IB, Paydas S. Et.al. // *Int J Clin Oncol.* – 2019. – V. 24(2). – P. 168-178. doi: 10.1007/s10147-018-1338-8. Epub 2018 Aug 14. PMID: 30109543.

218. Prognostic significance of serum lactate dehydrogenase in patients with breast cancer: a meta-analysis / Liu D, Wang D, et.al. // *Cancer Manag Res.* – 2019. – V. 11. – P. 3611–3619.

219. Proliferating tumor cells mimick glucose metabolism of mature human erythrocytes / Ghashghaieinia M, Köberle M, Mrowietz U, et.al. // *Cell Cycle.* – 2019. – V. 18(12). – P. 1316-1334. doi: 10.1080/15384101.2019.1618125. Epub 2019 Jun 3. PMID: 31154896; PMCID: PMC6592250.

220. Purine metabolism in sprint- vs endurance-trained athletes aged 20–90 years / Zieliński J, Slominska EM, Król-Zielińska M, et.al. // *Sci. Rep.* – 2019. – V. 19; 9(1). – P. 12075. doi: 10.1038/s41598-019-48633-z. PMID: 31427706; PMCID: PMC6700101.

221. Purinergic Regulation of Endothelial Barrier Function / Aslam M, Gündüz D, Troidl C, et. Al. // *Int J Mol Sci.* – 2021. V. 22(3). - P.1207. Published 2021 Jan 26. doi:10.3390/ijms22031207

222. Purinergic Signaling in Pancreas-From Physiology to Therapeutic Strategies in Pancreatic Cancer / Novak I, Yu H, Magni L, et.al. // *Int J Mol Sci.* – 2020. – V. 21(22). – P. 8781. doi: 10.3390/ijms21228781. PMID: 33233631; PMCID: PMC7699721.

223. Recipient Epidemiology and Donor Evaluation Study-III (REDS III). Stored RBC metabolism as a function of caffeine levels / D'Alessandro A, Fu X, Reisz JA, et.al. // *Transfusion.* – 2020. – V. 60(6). – P. 1197-1211. doi: 10.1111/trf.15813. Epub 2020 May 11. PMID: 32394461; PMCID: PMC7990510.

224. Redox regulation of nitrosyl-hemoglobin in human erythrocytes / Dei Zotti F, Verdoy R, Brusa D, et.al. // *Redox Biol.* – 2020. – V. 34. – P. 101399. doi: 10.1016/j.redox.2019.101399. Epub 2019 Dec 5. PMID: 31838004; PMCID: PMC7327715.

225. Reductive stress in striated muscle cells / Bellezza I, Riuzzi F, Chiappalupi S, et.al. // *Cell Mol Life Sci.* – 2020. – V. 77(18). – P. 3547-3565. doi: 10.1007/s00018-020-03476-0. Epub 2020 Feb 18. PMID: 32072237.

226. Restricting Glycolysis Preserves T Cell Effector Functions and Augments Checkpoint Therapy / K, Bruss C, Schnell A, et.al. // *Cell Rep.* – 2019. – V. 1; 29(1). – P. 135-150.e9. doi: 10.1016/j.celrep.2019.08.068. PMID: 31577944.

227. Role of Adenosine and Purinergic Receptors in Myocardial Infarction: Focus on Different Signal Transduction Pathways / Procopio MC, Lauro R, Nasso C, et al. // *Biomedicines.* – 2021. – V. 9(2). – P. 204. Published 2021 Feb 18. doi:10.3390/biomedicines9020204

228. ROS homeostasis and metabolism: a critical liaison for cancer therapy Kim, Jongdoo et al. // *Experimental & molecular medicine.* – 2016. - V. 48, 11. – P. e269. 4 Nov. 2016, doi:10.1038/emm.2016.119

229. Ryan K. Current investigations on clinical pharmacology and therapeutics of Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency / Ryan K, Tekwani BL. // *Pharmacol Ther.* – 2020. – V. 222. – P.107788. doi: 10.1016/j.pharmthera.2020.107788. Epub ahead of print. PMID: 33326820.

230. Sadaf A. L-glutamine for sickle cell disease: Knight or pawn? / Sadaf A, Quinn CT. // *Exp Biol Med (Maywood).* – 2020. – V. 245(2). – P. 146-154. doi: 10.1177/1535370219900637. Epub 2020 Jan 27. PMID: 31985279; PMCID: PMC7016414.

231. Sáez-Cirión A. Immunometabolism and HIV-1 pathogenesis: food for thought / Sáez-Cirión A, Sereti I. // *Nat Rev Immunol.* – 2021. – V. 21(1). – P. 5-19. doi: 10.1038/s41577-020-0381-7. Epub 2020 Aug 6. PMID: 32764670.

232. Savage DT, Hilt JZ, Dziubla TD. In Vitro Methods for Assessing Nanoparticle Toxicity / Savage DT, Hilt JZ, Dziubla TD. // *Methods Mol Biol.* – 2019. – V. 1894. – P. 1-29. doi: 10.1007/978-1-4939-8916-4_1. PMID: 30547452; PMCID: PMC6984383.

233. Serum Adenosine Deaminase as a Useful Marker to Estimate Coronary Artery Calcification in Type 2 Diabetes Mellitus Patients / Yu M, Zhou H, Li Q, et.al. // *Thromb Hemost.* – 2021. – V. 27. – P. 1076029621999722. doi:10.1177/1076029621999722

234. Simvastatin protects ischemic spinal cord injury from cell death and cytotoxicity through decreasing oxidative stress: in vitro primary cultured rat spinal cord model under oxygen and glucose deprivation-reoxygenation conditions / Sohn HM, Hwang JY, Ryu JH, et.al. // *J. Orthop Surg Res.* – 2017. – V. 12(1). – P. 36. doi: 10.1186/s13018-017-0536-9. PMID: 28241838; PMCID: PMC5330028.

235. Siska PJ. T cell metabolic fitness in antitumor immunity / Siska PJ, Rathmell JC. // *Trends Immunol.* – 2015. – V. 36. – P. 257–264. doi: 10.1016/j.it.2015.02.007

236. Stucki D. Carbon monoxide - beyond toxicity? / Stucki D, Stahl W. // *Toxicol Lett.* – 2020. – V. 33. – P. 251-260. doi: 10.1016/j.toxlet.2020.08.010. Epub 2020 Aug 26. PMID: 32860873.

237. Suicidal death of erythrocytes in cancer and its chemotherapy: A potential target in the treatment of tumor-associated anemia / Lang E, Bissinger R, Qadri SM, et.al. // *Int J Cancer.* – 2017. – V. 15; 141(8). – P. 1522-1528. doi: 10.1002/ijc.30800. Epub 2017 Jun 21. PMID: 28542880.

238. Systematic Identification of Regulators of Oxidative Stress Reveals Non-canonical Roles for Peroxisomal Import and the Pentose Phosphate Pathway / Dubreuil MM, Morgens DW, Okumoto K, et.al. // *Cell Rep.* – 2020. – V. 4;30(5). P. 1417-1433.e7. doi: 10.1016/j.celrep.2020.01.013. PMID: 32023459; PMCID: PMC7184925.

239. Systematic Review of Interventions to Reduce Operating Time in Lung Cancer Surgery / Hoefsmit PC, Cerfolio RJ, de Vries R, et.al. // *Clin. Med. Insights Oncol.* – 2021. – V. 15.- P. 1179554920987105. doi: 10.1177/1179554920987105. PMID: 33795942; PMCID: PMC7970684.

240. T cell immunoglobulin and mucin domain protein 3 inhibits glycolysis in RAW 264.7 macrophages through Hexokinase 2 / Zhang J, Hou C, Dou S, et.al. //

Scand J. Immunol. – 2021. – V. 93(2). – P. e12981. doi: 10.1111/sji.12981. Epub 2020 Oct 24. PMID: 33031600.

241. TCR Dependent Metabolic Programming Regulates Autocrine IL-4 Production Resulting in Self-Tuning of the CD8⁺ T Cell Activation Setpoint / Crofts KF, Holbrook BC, Soto-Pantoja DR, et.al. // Front Immunol. – 2020. – V. 31;11. – P. 540. doi: 10.3389/fimmu.2020.00540. PMID: 32300344; PMCID: PMC7145404.

242. Technical Report: WHO Report on Cancer: Setting Priorities, Investing Wisely and Providing Care for All. World Health Organization; Geneva, Switzerland: 2020.

243. The Adenosine System at the Crossroads of Intestinal Inflammation and Neoplasia / D'Antongiovanni V, Fornai M, Pellegrini C, et.al. // Int J Mol Sci. – 2020. – V. 21(14). – P. 5089. Published 2020 Jul 18. doi:10.3390/ijms21145089

244. The Glycocalyx and Its Role in Vascular Physiology and Vascular Related Diseases / Weinbaum S, Candel LM, Fu BM, et.al. // Cardiovasc Eng. Technol. – 2021. – V. 12(1). – P. 37-71. doi:10.1007/s13239-020-00485-9

245. The Pentose Phosphate Pathway as a Potential Target for Cancer Therapy / Cho, E. S., Cha, Y. H., Kim, H. S., et.al. // Biomolecules & therapeutics. - 2018. –V. 26(1). –P. 29–38. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2017.179>

246. The TGF- β profibrotic cascade targets ecto-5'-nucleotidase gene in proximal tubule epithelial cells and is a traceable marker of progressive diabetic kidney disease / Cappelli C, Tellez A, Jara C, Alarcón S, et.al. // Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis. – 2020. – V. 1;1866(7). –P.165796. doi: 10.1016/j.bbadis.2020.165796. Epub 2020 Apr 11. PMID: 32289379.

247. The usefulness of lactate dehydrogenase measurements in current oncological practice / Forkasiewicz A, Dorociak M, Stach K, et.al. // Cell Mol Biol Lett. – 2020. – V. 9; - P. 25:35. doi: 10.1186/s11658-020-00228-7. PMID: 32528540; PMCID: PMC7285607.

248. Therapeutic Perspectives of Adenosine Deaminase Inhibition in Cardiovascular Diseases / Kutryb-Zajac B, Mierzejewska P, Slominska EM, et.al. //

Molecules. – 2020. – V. 25(20). – P. 46-52. Published 2020 Oct 12. doi:10.3390/molecules25204652

249. Ticagrelor Prevents Endothelial Cell Apoptosis through the Adenosine Signalling Pathway in the Early Stages of Hypoxia / Feliu C, Peyret H, Brassart-Pasco S, et al. // Biomolecules. – 2020. – V. 10(5). P. 740. Published 2020 May 9. doi:10.3390/biom10050740

250. Tritsch G.L. Validity of the continuous spectrophotometric assay of Kalckar for adenosine deaminase activity // Ann. Biochem. – 1983. – V.29. – P.207-209.

251. Tu. Low Red Blood Cell Vitamin C Concentrations Induce Red Blood Cell Fragility: A Link to Diabetes Via Glucose, Glucose Transporters, and Dehydroascorbic Acid // Tu, Hongbin. // EBioMedicine. – 2015. – V. 2, 11. – P. 1735-1750. doi:10.1016/j.ebiom.2015.09.049

252. Untersuchung von therapierelevanten Rezeptoren bei Knochenmarkkarzinosen: Ein Vergleich pathologischer und klinischer Parameter [Analysis of therapy-relevant receptors in bone marrow carcinosis : Comparison of pathological and clinical parameters] / Massenkeil G, Gropp C, Kreipe H, et.al. // Pathologe. – 2017. – V. 38(4). – P. 317-323. German. doi: 10.1007/s00292-017-0300-2. PMID: 28577052.

253. Urbańska K. Unappreciated Role of LDHA and LDHB to Control Apoptosis and Autophagy in Tumor Cells / Urbańska K, Orzechowski A. // Int J. Mol. Sci. – 2019. – V. 20(9). – P.20-85. doi: 10.3390/ijms20092085. PMID: 31035592; PMCID: PMC6539221.

254. Wang P. Purinergic signalling in liver diseases: Pathological functions and therapeutic opportunities / Wang P, Jia J, Zhang D. // JHEP Rep. 2020 Jul 30;2(6):100165. doi: 10.1016/j.jhepr.2020.100165. PMID: 33103092; PMCID: PMC7575885.

255. Wang Q. Oxidative Stress and Thrombosis during Aging: The Roles of Oxidative Stress in RBCs in Venous Thrombosis / Wang Q, Zennadi R. // Int J Mol Sci.

– 2020. – V. 21(12). – P. 42-59. doi: 10.3390/ijms21124259. PMID: 32549393; PMCID: PMC7352981.

256. Wang Y. Calcium regulation of T cell metabolism / Wang Y, Tao A, Vaeth M, et.al // Curr Opin Physiol. – 2020. – V. 17. – P. 207-223. doi: 10.1016/j.cophys.2020.07.016. Epub 2020 Aug 18. PMID: 33103016; PMCID: PMC7584116.

257. Weyand CM. Aging of the Immune System. Mechanisms and Therapeutic Targets / Weyand CM, Goronzy JJ. // Ann Am Thorac Soc. – 2016. – V. 13. - Suppl 5. – P. S422-S428. doi: 10.1513/AnnalsATS.201602-095AW. PMID: 28005419; PMCID: PMC5291468.

258. Where Metabolism Meets Senescence: Focus on Endothelial Cells / Sabbatinelli J, Prattichizzo F, Olivieri F, et.al. // Front Physiol. – 2019. – V. 10. – P. 15-23. doi: 10.3389/fphys.2019.01523. PMID: 31920721; PMCID: PMC6930181.

259. Whole blood viscosity and red blood cell adhesion: Potential biomarkers for targeted and curative therapies in sickle cell disease / Kucukal E, Man Y, Hill A, et al. // Am J Hematol. – 2020. – V. 95(11). – P. 1246-1256. doi:10.1002/ajh.25933

260. Xiao W. Metabolic Responses to Reductive Stress / Xiao W, Loscalzo J. // Antioxid Redox Signal. – 2020. – V. 32(18). – P. 1330-1347. doi: 10.1089/ars.2019.7803. Epub 2019 Jul 18. PMID: 31218894; PMCID: PMC7247050.

261. Crosstalk_between_the_Purinergic_and_Immune_Systems_Implications_for_the_Glutathione_Antioxidant_System_in_Health_and_Disease / Charles Elias Assmann, Naiara Stefanello, Nathieli Bianchin Bottari, et.al. – 2020. – P. 1-26. DOI:10.5772/intechopen.92881. <https://www.researchgate.net/publication/342684934>

262. Hasky G, Cronstein B. Regulation of inflammation by adenosine. Frontiers in Immunology. – 2013. - №4:- P. 1-21. DOI: 10.3389/fimmu.2013.00085