

Л.М. Гунина

А.П. Кабан

В.Б. Коробко

Институт онкологии
АМН Украины, Киев

Ключевые слова: рак желудка, эритроцит, структурно-функциональное состояние мембраны, перекисное окисление липидов, гемоглобин.

РОЛЬ ИЗМЕНЕНИЙ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ МЕМБРАНЫ ЭРИТРОЦИТА В РАЗВИТИИ АНЕМИИ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЖЕЛУДКА

Резюме. *Обследовали 65 больных раком желудка в целях изучения роли мембраны эритроцита в развитии анемии. Установлено, что при развитии злокачественной опухоли происходит активация перекисного окисления липидов с нарушением функционального состояния мембраны эритроцита и уплотнением гликокаликса. При этом изменяется проницаемость мембраны эритроцита и его объем, значительно повышается степень анизоцитоза, что сопровождается снижением концентрации гемоглобина в красных клетках крови и развитием анемии.*

ВВЕДЕНИЕ

Анемия у больных раком желудка еще до начала лечения, по данным разных авторов, встречается с частотой от 21 до 73% в зависимости от стадии заболевания [1, 2]. Общеизвестными патогенетическими механизмами развития анемии являются угнетение синтеза гемоглобина, обусловленное снижением уровня кофакторов или нарушением всасывания железа и неадекватной продукцией эритропоэтина, появление микрогеморрагий, снижение уровня церулоплазмينا [3–5]. Роли изменений функционального состояния самого эритроцита уделяют мало внимания.

Между тем, нарушения структурно-функционального состояния клеточных мембран и, в частности, мембран эритроцитов, обуславливают многочисленные патофизиологические и клинические проявления опухолевого процесса [6]. При этом длительное влияние аномальных продуктов метаболизма, с одной стороны, приводит к конформации белково-фосфолипидного бислоя мембран, уплотнению их с резким снижением трансмембранной транспортной функции, формированием так называемой жесткой мембраны [7, 8]. С другой стороны, под действием мембраноповреждающих агентов (например, токсических метаболитов) происходит образование дополнительных каналов проницаемости — кластеров, что влечет за собой увеличение диффузии пластических и энергетических субстратов, а также электролитов в клетку [9–11].

Основным звеном конформационных изменений эритроцитарной мембраны является активация процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и белков в ней с накоплением высокотоксичных первичных и вторичных продуктов обмена веществ [12], что влечет за собой повышение вязкости цитозоля [13], особенно в примембранных слоях — гликокаликсе [14]. Такие изменения приводят к нарушению деформируемости эритроцитов и способствуют уменьшению скорости транспорта кислоро-

да [15]. Снижение концентрации гемоглобина в эритроцитах при этом является дополнительным фактором нарушения оксигенации тканей, что негативно сказывается на результатах лечения [16].

С учетом вышеизложенного у больных раком желудка изучена взаимосвязь между изменениями структурно-функционального состояния мембраны эритроцита и концентрацией гемоглобина в нем.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования были проведены до начала лечения у 65 больных раком желудка (T2–3N0–1M0) в возрасте от 35 до 78 лет (женщин — 15, мужчин — 50). Контрольную группу составили 25 доноров (женщин — 7, мужчин — 18) в возрасте от 30 до 59 лет.

Для определения структурно-функционального состояния эритроцита использовали несколько методов.

В целях определения сорбционной способности эритроцитов (ССЭ) по отношению к витальным красителям, то есть поглотительной способности мембраны, 1 мл суспензии эритроцитов смешивали в пробирке с 3 мл 0,025% раствора метиленового синего («Chemapol», Чехия), инкубировали 10 мин при комнатной температуре и центрифугировали в течение 10 мин при 3000 об/мин. При длине волны 630 нм определяли оптическую плотность исходного раствора и надосадочной жидкости в единицах экстинкции по отношению к изотоническому раствору натрия хлорида [17]. Количество поглощенного красителя (ССЭ) выражали в процентах.

Исследовали также сорбционную емкость гликокаликса эритроцитов (СЕГ) для альцианового синего («Loba Chemie», Австрия), который является катионным красителем фталоцианиновой группы и обладает способностью связываться с гликолипидами, гликопротеидами и кислыми мукополисахаридами. В низкой концентрации альциановый синий не повреждает клетки, не проникает в цитоплазму, но сорбируется в количестве, пропорцио-

нальном содержанию белков и углеводов в гликокаликсе, отражая степень его вязкости [14]. Для определения СЕГ 1 мл суспензии эритроцитов, содержащий $4 \cdot 10^7$ клеток, смешивали с равным объемом изотонического раствора натрия хлорида, содержащего 0,005% альцианового синего, инкубировали 10 мин при температуре 21 °С и центрифугировали в течение 10 мин при 1000 об/мин. При длине волны 617 нм, используя в качестве контроля изотонический раствор натрия хлорида, измеряли концентрацию красителя в надосадочной жидкости. Количество поглощенного альцианового синего рассчитывали в граммах на 1 эритроцит (г/эр.).

Для проведения этих двух методик суспензии эритроцитов получали из 5 мл свежегепаринизированной венозной крови, дважды отмывая от плазмы в 40 объемах изотонического раствора натрия хлорида (1000 об/мин, 10 мин).

О функциональном состоянии эритроцитов судили также по накоплению малонового диальдегида (МДА), который определяли в мембранах эритроцитов соответственно уровню связывания его с тиобарбитуровой кислотой [18]. Результаты выражали в нмоль МДА в 10^6 эритроцитов (нмоль $\cdot 10^6$ эр.).

Кроме того, исследовали проницаемость мембран эритроцитов (ПМЭ) при мочевином гидролизе по методу В.Н. Колмакова [19] в модификации В.А. Михайловича и соавторов [7].

На гематологическом анализаторе «Sysmex K-1000» (Япония) определяли количество эритроцитов (эр.), гематокрит, уровень гемоглобина в крови (Hb), абсолютное содержание гемоглобина в эритроците (АСГЭ), концентрацию гемоглобина в эритроцитах (КГЭ), средний объем (СО) эритроцита, а также коэффициент анизоцитоза.

Статистическую обработку полученных результатов с учетом критерия Стьюдента и многофакторный корреляционный анализ проводили на персональном компьютере с помощью прикладного пакета программ «Stat-Graph».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно результатам исследования у больных раком желудка изменяются все показатели структурно-функционального состояния эритроцитов (табл. 1).

Таблица 1
Показатели структурно-функционального состояния эритроцитов у больных раком желудка

Показатель	Группа обследованных	
	доноры	больные
ССЭ, %	21,6 ± 2,4	35,6 ± 1,2*
СЕГ, 10^{10} г/эр.	1,82 ± 0,12	2,78 ± 0,14*
МДА, нмоль $\cdot 10^6$ эр.	3,67 ± 0,10	4,61 ± 0,15*
ПМЭ, усл. ед.	11,34 ± 0,18	18,82 ± 0,33*

* $p < 0,01$ по сравнению с показателями у доноров.

ССЭ по отношению к метиленовому синему повышается на 64,8%, СЕГ по отношению к альциановому синему увеличивается на 52,7%. Одновременно с этим происходит накопление МДА в мембране эритроцита, обусловленное активацией ПОЛ.

Эти процессы сопровождаются повышением ПМЭ на 16,6% (см. табл. 1).

Таким образом, при развитии злокачественных новообразований отмечается выраженное нарушение функционального состояния как самих мембран эритроцитов, так и гликокаликса.

По данным показателей гемограммы у больных раком желудка выявлены значимые изменения параметров эритроцита и содержания Hb (табл. 2). На первый взгляд, СО эритроцита в целом в группе больных не изменяется. Однако при более детальном анализе установлено, что у 4 из 65 (6,1%) больных СО значительно уменьшается от $84,16 \pm 1,11$ фл до $68,43 \pm 0,50$ фл, у 41 больного (63,1%) увеличивается до $89,35 \pm 0,61$ фл и у 20 — остается практически неизменным ($85,67 \pm 0,63$ фл). Показатель анизоцитоза, рассчитанный как коэффициент вариации СО эритроцитов, у больных раком желудка повышается более чем в 3 раза.

Таблица 2
Показатели гемограммы у больных раком желудка

Показатель	Группа обследованных	
	доноры	больные
Эр, $\cdot 10^{12}$ /л	4,13 ± 0,11	3,70 ± 0,09*
Hb, г/л	138,26 ± 8,74	103,57 ± 4,23*
СО, фл	84,16 ± 1,10	85,21 ± 1,24
АСГЭ, пг	32,60 ± 2,34	21,69 ± 1,92**
КГЭ, г/л	351,67 ± 4,12	330,98 ± 2,15*
Коэффициент анизоцитоза, %	12,2 ± 2,1	43,2 ± 4,2**

* $p < 0,05$ по сравнению с показателями у доноров.

** $p < 0,01$ по сравнению с показателями у доноров.

Среднее АСГЭ у больных раком желудка существенно снижается по сравнению с контролем и составляет 66,2% от него. КГЭ в значительной степени зависит от объема последнего, а не только от АСГЭ, и поэтому вполне логично, что в наших исследованиях установлено достоверное снижение КГЭ — на 20,7 г/л (см. табл. 2).

Относительно количества эритроцитов и содержания Hb в цельной крови следует отметить, что у больных раком желудка эти показатели достоверно отличаются от нормы (см. табл. 2). Средний уровень гематокрита при этом составляет $0,311 \pm 0,008$, что на 18,9% меньше соответствующего показателя у доноров ($p < 0,05$).

Корреляционный анализ выявил наличие взаимосвязи между структурно-функциональным состоянием мембраны эритроцита и СО эритроцитов. Так, коэффициент корреляции r_1 между ССЭ и СО эритроцитов составляет +0,71 ($p < 0,01$), r_2 между СЕГ и СО эритроцитов — +0,82 ($p < 0,01$), r_3 между уровнем МДА и СО эритроцитов — +0,67 ($p < 0,05$). Установлено существование взаимосвязи между ССЭ и СЕГ, с одной стороны, и СГЭ — с другой ($r_1 = +0,79$ и $r_2 = +0,86$ соответственно, $p < 0,01$ в обоих случаях).

Структурно-функциональное состояние мембраны эритроцита и вязкость его гликокаликса являются достаточно важными факторами, способствующими развитию анемии у больных раком желудка. Опухолевый процесс способствует нарушению метаболизма эритроцита, что приводит к уве-

личению количества мембраносвязанного Hb, в норме составляющего не более 7–10%, и деформации молекулы гемоглобина в связи с возникновением прочного связывания ее с патологическими полипептидными цепями мембраны [4]. Следует отметить, что существование индуцированных липид-белковым взаимодействием конформационных переходов в Hb установлено в модельных экспериментах с использованием липосом [20]. Логично предположить, что количество свободного Hb в эритроците при этом уменьшается. Это, в свою очередь, препятствует нормальному осуществлению эритроцитом своей кислород-транспортной функции и усугубляет проявления тканевой гипоксии.

Таким образом, результаты проведенного исследования свидетельствуют, что развитие злокачественного процесса в организме сопровождается нарушениями структурно-функционального состояния плазматической мембраны эритроцитов, что проявляется активацией ПОЛ, нарушениями сорбционной способности мембраны эритроцита и гликокаликса, изменением мембранной проницаемости. Это сопряжено с изменением размеров и формы красных кровяных клеток со снижением концентрации Hb в них.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Василенко ВХ, Рапопорт СИ, Сальман ММ.** Опухоли желудка. Клиника и диагностика. Москва: Медицина, 1989. 243 с.
2. **Клименков АА, Патиютко ЮМ, Губина ГИ.** Опухоли желудка. Москва: Медицина, 1988. 256 с.
3. **Белоус АМ, Конник КТ.** Физиологическая роль железа. Киев: Наук думка, 1991. 189 с.
4. **Backer J, Cornbleet PI.** Erythrocyte disorders. In: Laboratory medicine—test selection and interpretation. Eds. Howanitz IH, Howanitz PI. New-York: Churchill Livingstone, 1991: 447–98.
5. **Rodak BF.** Diagnostic hematology. Philadelphia ect: Saunders, 1995: 720 p.
6. **Коробко ВВ, Гунина ЛМ, Кабан АП.** Клинические и биохимические особенности статуса больных раком желудка, подвергшихся воздействию ионизирующего излучения в результате аварии на ЧАЭС. Врач дело 1995; (5–6): 19–22.
7. **Михайлович ВА, Марусанов ВЕ, Бичун АБ.** Проницаемость эритроцитарной мембраны и ее сорбционная способность – оптимальные критерии тяжести эндогенной интоксикации. Анестезиология и реаниматология 1993; (5): 66–9.
8. **Мардар ГІ, Коваленко СВ.** Морфофункціональні зміни еритроцитів при судинних ураженнях мозку у хворих на гіпертонічну хворобу та церебральний атеросклероз. Лік справа 1998; (8): 7–10.
9. **Кагава Я.** Биомембраны: Пер с японск. Москва: Мир, 1985. 216 с.
10. **Кирпичева ТМ, Милотин АА.** Влияние гемосорбции на физико-химические характеристики мембран эритроцитов.

В: Материалы VII Межд симп по гемосорбции. Киев: Наук думка, 1986: 112–3.

11. **Стариков ВИ.** Нарушения взаимодействия эритроцитов у больных раком прямой кишки. Клини онкология. Респ межвед сб. Киев, 1985 (5): 21–3.
12. **Бажан КВ.** Стан перекисного окислення ліпідів та антиоксидантної системи в осіб, які зазнали впливу екстремальних факторів. Лік справа 1998; (8): 47–50.
13. **Мишук ИИ, Березовская ЗБ, Оссовская АБ.** Нарушение деформируемости эритроцитов. Анестезиология и реаниматология 1993; (2): 72–7.
14. **Семко ГА.** Структурно-функциональные изменения мембран и внешних примембранных слоев эритроцитов при гиперэпидермопозе. Укр биохим журн 1998; 70 (3): 113–8.
15. **Степовая ЕА, Часовских НЮ, Новицкий ВВ.** Обратимая агрегация эритроцитов у онкологических больных. Клини лаб диагностика 1998; (6): 21–2.
16. **Бондарь ГВ, Думанский ЮВ, Яковец ЮИ.** Непосредственные результаты хирургического лечения рака желудка, осложненного анемией. Клини хирургия 1992; (5): 1–4.
17. **Тогайбаев АА, Кургузкин АВ, Рикун ИВ.** Способ диагностики эндогенной интоксикации. Лаб дело 1988; (9): 22–4.
18. **Банкова ВВ, Прищепова НФ, Авратинский ОИ.** Способ оценки патологических изменений плазматической мембраны у детей при различных заболеваниях. Патол физиология и эксперим терапия 1987; (3): 78–81.
19. **Колмаков ВН.** Хронический гепатит и цирроз. Ленинград: Наука, 1993: 26–8.
20. **Вальовка ГЙ, Назаренко ВІ, Коробов ВМ, Великий ММ.** Фізико-хімічна характеристика і функціональні властивості мембранозв'язаного гемоглобіну. Укр біохім журн 1998; 70 (6): 59–63.

THE ROLE OF STRUCTURAL AND FUNCTIONAL CHANGES OF ERYTHROCYTE MEMBRANE IN ANEMIA DEVELOPED IN GASTRIC CANCER PATIENTS

L.M. Gunina, A.P. Kaban, V.B. Korobko

Summary. *Sixty five gastric cancer patients were examined with the view to study the role of erythrocyte membranes in the development of anemia. It was found that the development of malignant tumors is associated with activation of peroxide oxidation of lipids; functional alterations in the state of erythrocyte membranes; and consolidation of the adjacent membrane layers in cytosole. In addition, the level of penetrability of erythrocyte membranes and the volume of erythrocytes change and these changes are accompanied by a significant increase in the anisocytosis index and a decrease in the hemoglobin content in red blood cells.*

Key Words: gastric cancer, erythrocyte, structural and functional state of membrane, peroxide oxidation of lipids, hemoglobin.