

УДК 616.345-002-006-008.9:612.396-085:547.472.333

© Коллектив авторов, 2012.

ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ СТАТУС ЭРИТРОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ С НЕСПЕЦИФИЧЕСКИМ ЯЗВЕННЫМ КОЛИТОМ И РАКОМ ТОЛСТОЙ КИШКИ НА ФОНЕ ТЕРАПИИ ЛАКТАТОМ НАТРИЯ

Г.Е. Полуни¹, И.Е. Сedaков², И.И. Зинкович, О.П. Шатова³, Е.В. Хомутов³, М.А. Сташкевич⁴
¹Донецкий национальный медицинский университет им.М.Горького, кафедра общей хирургии и хирургических болезней стоматологического факультета, ²кафедра онкологии, ³кафедра химии, г. Донецк; ⁴Национальный медицинский университет им. А.А. Богомольца, кафедра биоорганической, биологической и фармацевтической химии, г. Киев.

ENERGETIC STATUS OF ERYTHROCYTES IN PATIENTS WITH NONSPECIFIC ULCERATIVE COLITIS AND COLON CANCER ON SODIUM LACTATE THERAPY BACKGROUND

G.E. Polunin, I.E. Sedakov, I.I. Zinkovych, O.P. Shatova, E.V. Khomutov, M.A. Stashkevych

SUMMARY

The patients with nonspecific ulcerative colitis (NUC) and with the cancer of colon (CC) were treated with the drugs containing sodium lactate. The drug was administrated in the dose 4 g per day during 10 days intravenously. The biochemical indexes were determined before and after lactate-containing therapy and compared between erythrocytes and blood serum. It was found that patients with NUC and CC had higher level of pyruvate in the blood in comparison with the control group. Original LDH activity upon NUC is significantly higher than upon CC. After sodium lactate therapy the patients with ulcerative colitis differ from patients with colon cancer by higher concentration of ATP in the erythrocytes. Absence of the dynamics of changes of index of the ATP in the erythrocytes of patients with an ulcerative colitis after therapy with the usage of lactate allows us to reveal development of malignant process in this group of patients.

ЕНЕРГЕТИЧНИЙ СТАТУС ЕРИТРОЦИТІВ У ХВОРИХ НА НЕСПЕЦИФІЧНИЙ ВИРАЗКОВИЙ КОЛІТ ТА РАК ТОВСТОЇ КИШКИ НА ФОНІ ТЕРАПІЇ ЛАКТАТОМ НАТРІЮ

Г.Є. Полунін, І.Є. Сedaков, І.І. Зінкович, О.П. Шатова, Є.В. Хомутов, М.А. Сташкевич

РЕЗЮМЕ

Хворі на неспецифічний виразковий коліт (НВК) та з рак товстої кишки (РТК) отримували терапію, яка включала препарати, що містять лактат натрію. Введення було внутрішньовенне краплинне по 4 грами в добу протягом 10 днів. Значення біохімічних показників визначали до і після терапії препаратом в еритроцитах та сироватці крові. Нами встановлено, що хворі на НВК та РТК мають вищий рівень пірувату в сироватці крові в порівнянні з контрольною групою. Початкове значення активності лактатдегідрогенази (ЛДГ) при НВК статистично вище, ніж при раці. Після терапії лактатом натрію хворі з виразковим колітом відрізняються від хворих з раком товстої кишки вищою концентрацією АТФ в еритроцитах, а відсутність динаміки змін показника АТФ в еритроцитах у пацієнтів з виразковим колітом після терапії з використанням лактату дозволяє нам передбачити наявність злого процесу у цієї групи хворих.

Ключевые слова: рак толстой кишки, неспецифический язвенный колит, лактат натрия.

Активное изучение функций лактата в организме в настоящее время дает новые сведения о его роли в энергетическом обмене, репарации тканей, регуляции активности ферментов [1, 2]. Продукция лактата влияет на концентрацию гликолитических метаболитов таких как фруктозо-6-фосфат, фруктозо-1,6-бисфосфат, фосфоенолпируват [3]. Лактат регулирует активность аллостерического фермента гликолиза – фосфофруктокиназу (ФФК). Примечательно, что ингибирование ФФК путем диссоциации субъединиц происходит при pH 7,4. Лактат является координатором клеточного метаболизма многих тканей и органов.

В эритроцитах гликолиз обеспечивает сохранение структуры и функции гемоглобина, целостность мембраны и образование энергии для ионных насосов. Около 90 % поступающей глюкозы в эритроциты используется в гликолизе и только 10 % в пентозо-фосфатном пути (ПФП) окисления.

Отличительная особенность гликолиза в эритроцитах – присутствие в них фермента бисфосфоглицератмутаза. Единственным источником АТФ в эритроците является анаэробный гликолиз. Регуляция активности гликолиза и соответственно образования лактата в эритроцитах осуществляется инсулином, путем фосфорилирования ФФК. Увеличивая образование АТФ и НАДН, инсулин препятствует гемолизу [4]. Гликолиз и ПФП в эритроцитах являются поставщиками НАДН и НАДФН, которые восстанавливают метгемоглобин [5]. Таким образом окисление глюкозы в эритроците имеет две функции: энергетическую и антиоксидантную, а ингибирование гликолиза приводит к нарушению этих функций и соответственно к гемолизу. По данным Young нарушение ресинтеза АТФ или других фосфорных соединений, которые необходимы для поддержания нормальной двояковогнутой формы

эритроцитов, может привести к изменению формы эритроцита на сфероподобную и соответственно к повышенному гемолизу. При падении уровня АТФ ниже 10% от нормального значения эритроциты теряют ионы калия и происходит их сферуляция [6]. По данным современных авторов мембрана эритроцитов содержит актомиозиноподобные белки, обладающие контрактильной функцией и аденозинтрифосфатазной активностью [6]. Целью нашей работы было изучить влияние терапии, которая включала лактат натрия на уровень АТФ в эритроцитах и на сывороточную концентрацию лактата, пирувата и активность ЛДГ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования была сыворотка и эритроциты 18 здоровых добровольцев – контрольная группа (КГ) и 28 больных с неспецифическим язвенным колитом (НЯК), 26 больных с раком толстой кишки (РТК). Все больные получали терапию, которая включала препараты, содержащие лактат натрия, введение было внутривенное капельное по 4 грамма в сутки в течение 10 дней. Значения биохимических показателей у больных определяли до и после терапии лактат-содержащим препаратом.

В эритроцитах здоровых и больных определяли уровень АТФ. Принцип метода основан на определении разности содержания неорганического фосфата в пробе, подвергшейся семиминутному гидролизу, и в пробе до гидролиза [7]. Экстинкции пробы регистрировали на спектрофотометре Specord 200 при длине волны 670 нм.

Активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в сыворотке крови определяли с помощью набора «Лактатдегидрогеназа Liquid 100» («Плива-Лахема», Чехия). Принцип метода заключается в том, что ЛДГ катализирует превращение пирувата в лактат с одновременным окислением НАДН в НАД.

Уменьшение поглощения НАДН при длине волны 340 нм прямо пропорционально активности ЛДГ в пробе. Экстинкции пробы регистрировали на спектрофотометре Specord 200.

Концентрацию молочной кислоты (лактата) в сыворотке крови определяли с помощью набора реагентов «Лактат-Витал» («Витал Диагностика СПб», Санкт-Петербург, Россия) энзиматическим колориметрическим методом. Принцип метода заключается в том, что из лактата в присутствии лактатоксидазы образуется перекись водорода, которая, реагируя с пара-хлорфенолом и 4-аминоантипирином, дает хинониминный окрашенный. Уровень пирувиноградной кислоты (пирувата) в крови определяли модифицированным методом Умбрайт [8]. Пирувиноградная кислота при реакции с 2,4-динитрофенилгидразином образует гидразон, дающий в щелочной среде коричневую окраску. Измерения проводили на КФК-3 при длине волны 440 нм.

Статистический анализ результатов проведен с использованием лицензионного пакета прикладных программ Statistica-6.0 (StatSoft). Все исследования проводились при согласии больных, отборы проб осуществлялись под непосредственным контролем лечащего врача.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При сравнительном анализе показателей здоровых с группами больных нами установлено, что при НЯК статистически достоверно отличается только уровень пирувата в сыворотке крови, тогда как уровень лактата не отличается от контрольного значения. Исходный уровень концентрации пирувата в сыворотке крови у больных с НЯК статистически значимо выше, чем у здоровых-добровольцев. Активность ключевого фермента гликолитического пути окисления глюкозы – ЛДГ в сыворотке крови больных с НЯК статистически значимо выше, чем в норме (табл. 1).

Таблица 1

Биохимические показатели углеводного обмена у больных с НЯК до терапии лактатом натрия

	Сумма рангов НЯК	Сумма рангов здоровые	U	Z	p
Лактат сыворотка	263,0	143,0	88,0	0,096	0,923
Пируват сыворотка	335,5	70,5	15,5	3,57	0,0003*
ЛДГ сыворотка	324,0	82,0	27,0	3,02	0,0025*
АТФ эритроциты	268,0	138,0	83,0	0,336	0,737

Примечание: * - критерий Манна-Уитни.

При РТК в сравнении с группой здоровых-добровольцев статистически значимо отличается только уровень пирувата в сыворотке крови. Так сумма рангов составляет при РТК 79,00, а в норме 57,00 (U=2,0, при p=0,002). Таким образом, уровень пирувата и при НЯК и при РТК выше, чем в норме у здоровых-добровольцев.

После терапии лактатом натрия, для НЯК показатель АТФ в эритроцитах статистически достоверно выше, чем для группы с диагнозом РТК (p=0,049). Таким образом, уровень АТФ в эритроцитах после терапии лактатом натрия взаимосвязан с наличием злокачественной пролиферации в кишечнике. Следует отметить, что

показатель концентрации АТФ в эритроцитах имеет больший разброс в группах больных до терапии лактатом натрия, а после проведенной терапии вариабельность данного показателя становится ниже.

Примечательно, что у больных с НЯК активность ЛДГ до терапии лактатом была статистически значимо выше, чем при РТК ($p = 0,023$). Интересно отметить, что высокая активность ЛДГ в сыворотке крови отражает высокий уровень АТФ в эритроцитах после терапии лактатом натрия. Таким образом, увеличение уровня АТФ в эритроцитах после терапии лактатом натрия является хорошим прогностическим признаком, т.к. это может свидетельствовать о том, что у больного колит, а не злокачественная пролиферация. Назначение лактата натрия при НЯК целесообразно, т.к. приводит к стимуляции гликолиза в эритроцитах, увеличению их функциональной активности и снижению степени гипоксии.

При использовании коэффициента ранговой корреляции Спирмена мы оценили тесноту связи между уровнем АТФ в эритроцитах и длительностью заболевания. Установлено, что чем длительнее заболевание, тем ниже концентрация АТФ в эритроцитах ($r=0,4$). Следует отметить, что уровень АТФ в эритроцитах положительно связан с уровнем лактата до ($r=0,32$) и после ($r=0,45$) терапии, которая включала лактат натрия, теснота взаимосвязи выше после терапии. Косвенно по уровню лактата в сыворотке можно судить об уровне АТФ в эритроцитах.

ВЫВОДЫ

После терапии лактатом натрия больные с НЯК отличаются от больных с РТК более высокой концентрацией АТФ в эритроцитах. Установлено, что уровень АТФ в эритроцитах больных статистически значимо связан с длительностью заболевания и с уровнем лактата в сыворотке крови. Отсутствие динамики изменений показателя АТФ в эритроцитах у пациентов после терапии с использованием лактата

позволяет нам предположить наличие злокачественного процесса у данной группы больных. Полученные данные свидетельствуют о необходимости проведения дальнейших исследований у пациентов с неспецифическими воспалительными заболеваниями и раком толстой кишки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Gladden L.B. A lactic perspective on metabolism // *Med Sci. Sports Exerc.* - 2008. - V. 40, №3. - P. 477-485.
2. Gladden L.B. Lactate metabolism: a new paradigm for the third millennium // *J Physiol.* - 2004. - V. 558, №Pt 1. - P. 5-30.
3. Costa L.T., Da S.D., Guimaraes C.R., Zancan P., Sola-Penna M. Lactate favours the dissociation of skeletal muscle 6-phosphofructo-1-kinase tetramers down-regulating the enzyme and muscle glycolysis // *Biochem. J.* - 2007. - V. 408, №1. - P. 123-130.
4. Zancan P., Sola-Penna M. Regulation of human erythrocyte metabolism by insulin: cellular distribution of 6-phosphofructo-1-kinase and its implication for red blood cell function // *Mol. Genet. Metab.* - 2005. - V. 86, №3. - P. 401-411.
5. Siems W.G., Sommerburg O., Grune T. Erythrocyte free radical and energy metabolism // *Clin. Nephrol.* - 2000. - V. 53, №1 Suppl. - P. S9-17.
6. Вплив лактату літію на гемоліз еритроцитів / О. П. Шатова, Е. В. Хомутов, Т. А. Журавель, Е. В. Богатырева, З. М. Скоробогатова, И. И. Зинкович // *Медична хімія.* – 2009. Т. 11, № 4. – С. 8688.
7. Виноградова И. Л., Багрянцева С. Ю., Дервиз Г. В. Метод одновременного определения 2,3-ДФГ и АТФ в эритроцитах / И. Л. Виноградова, С. Ю. Багрянцева, Г. В. Дервиз // *Лаб. дело.* – 1980. - N 7. - С. 424-426.
8. Горячковкий А.М. Клиническая биохимия. – Одесса: Астропринт, 1998. – С. 325-326.