



УДК 615.155.194+612.118.22:616.006

© 2007

Л. М. Гуніна, Б. В. Сорокін, В. Б. Коробко, С. А. Олійник,
В. М. Войціцький, Р. С. Гуменюк, А. В. Савоста

Мембранний механізм як нова складова розвитку анемії при злоякісних новоутвореннях травного каналу

(Представлено академіком НАН України В. П. Кухарем)

The complex analysis of the obtained findings as for the changes of indices of a structural-and-functional status of membranes of erythrocytes in cancer patients with anemia, one of the main parameters of which is the content of intraerythrocytic haemoglobin, is performed. The convincing evidence for the changes of the levels of main membrane lipids, spectrin and ankirin, quantitative and qualitative changes of lipids with accumulation of their oxidized forms in fluorescent probing, and lipid-protein spatial interrelations in membranes is presented. Alongside with the essential changes of functional properties of membranes of red blood cells and the availability of significant correlation relations between the above-mentioned parameters of membrane states as for the content of intraerythrocytic haemoglobin, the obtained data indicate the availability of a new aspect of the anemia development in patients with malignancies mediated by membrane disorders.

Анемія як нозологічна форма та як синдром різноманітних захворювань зустрічається дуже часто, і онкологічна практика не є винятком. При злоякісних новоутвореннях анемія, патогенез якої до цього часу остаточно невивчений, належить до найважливіших паранеопластичних синдромів [1]. На жаль, значення анемії в контексті загального стану онкологічного хворого в минулому недооцінювалося, оскільки вважалося, що фізіологічні механізми організму здатні компенсувати функціональну недостатність навіть при низькому вмісті гемоглобіну.

На теперішній час встановлено, що наявність анемії не тільки погіршує загальний стан хворого та є одним з важливих чинників погіршення якості його життя [2], але й безпосередньо впливає на найближчі, а деякі дослідники вважають, що й на віддалені, результати комплексного лікування хворих зі злоякісними пухлинами [3].

В клінічних умовах до цього часу найбільш поширеною є класифікація анемії, яка запропонована в 1979 р. Л. І. Ідельсоном і базується на врахуванні їх етіології та патогенезу. Незважаючи на незаперечну практичну цінність цієї класифікації, у ній, на жаль, відсутній окремий рядок відносно анемії в онкологічних хворих, патогенез якої є комплексним

і включає не тільки три великих групи анемії, що входять як складові до вищезазначеної класифікації. Складність лікування анемії у пацієнтів зі злоякісними пухлинами і обумовлена саме багатогранністю її патогенезу та можливістю виникнення та/або прогресування на будь-якому етапі лікування.

У сучасній номенклатурі МКХ-10 (1992 р.) анемія при гемобластозах, ліомпроліферативних захворюваннях і солідних пухлинах виділена окремим рядком D 63.0. За останніми даними, вона зустрічається у 15% онкологічних хворих, проте 66% пацієнтів із солідними пухлинами мають рівень гемоглобіну нижчий за 120 г/л [4]. Анемія в онкологічних пацієнтів — це найчастіше так звана анемія хронічного захворювання, для якої є характерним зниження тривалості життя еритроцитів, нездатність організму підсилувати еритропоез та утилізувати залізо, яке вивільнюється з червоних клітин, що гинуть. Важливу роль у розвитку анемії в онкологічних хворих відіграють специфічні цитокіни, які присутні в крові хворого у високих концентраціях. У першу чергу мова йде про інтерлейкін-1, фактор некрозу пухлини та інтерлейкін-6. Саме вони відповідальні за розвиток анемії, обумовлений трьома основними механізмами. По-перше, це пряме пригнічення проліферації клітин-попередників еритроїдного ряду. Другий механізм реалізується шляхом блокування продукції еритропоетину в перитубулярних фіброблестах нирок. І третій механізм полягає в несприятливому впливі на метаболізм заліза за рахунок формування ретикулоендотеліального блоку заліза, тобто порушенні процесу фагоцитозу еритроцитів, які гинуть, ретикулоендотеліальними клітинами різних органів, а також вторинної утилізації різних фрагментів молекули гемоглобіну [5].

Останнім часом увагу дослідників привертає практично не вивчений аспект проблеми виникнення анемії в онкологічних хворих. Мова йде про зрілий еритроцит, а точніше, про стан його мембрани. Відомості, наведені в літературі відносно якісних змін мембран еритроцитів периферичної крові у хворих із солідними злоякісними пухлинами, досить суперечливі та фрагментарні, що утруднює всебічне пояснення механізмів розвитку анемії та не дає змоги розробити комплексні патогенетично обґрунтовані методи попередження і корекції порушень в еритроні з урахуванням мембранних змін у пацієнтів даної категорії протягом лікування.

Відправною точкою нашої гіпотези щодо важливості змін структурно-функціонального стану еритроцитарної мембрани у виникненні анемії став той факт, що за умов нормального вмісту гемоглобіну в крові (Hb) у онкологічних хворих часто спостерігається істотне зниження його середнього абсолютного рівня в еритроциті (MCH) та ступеня насиченості еритроциту гемоглобіном, тобто відносного вмісту останнього (MCHC). Слід додати, що, згідно з сучасними уявленнями, саме ці показники, хоча є розрахунковими, найбільш точно свідчать про наявність анемії.

Традиційні методи діагностики, які існували раніше, не завжди давали змогу виявити її приховані прояви, оскільки до визначеного часу лікарі-онкологи не мали можливості встановити в динаміці лікування величини таких показників, як об'єм еритроцитів (MCV), середній вміст внутрішньоклітинного гемоглобіну (MCH) і ступінь насиченості ним еритроциту (MCHC), або звертали недостатню увагу на важливість їх встановлення і на трактування отриманих даних.

З появою сучасних гемоаналізаторів дослідники отримали можливість динамічного спостереження і виявили, що часто за нормального рівня гемоглобіну (Hb) в одиничному об'ємі крові відбувається істотне зниження вмісту гемоглобіну в самому еритроциті та коливання об'єму останнього в той чи інший бік. Для хворих на злоякісні пухлини травного кана-

ду має місце саме така ситуація. Тому метою нашого дослідження був пошук додаткових механізмів, які впливають на зміни вмісту гемоглобіну в еритроциті.

Проаналізовано 684 історії хвороб пацієнтів зі злоякісними пухлинами травного каналу (рак шлунка — 323 хворих у віці $53,2 \pm 7,9$ років, стадія захворювання $T_{2-4}N_{0-2}M_0$; рак прямої кишки — 351 хворий у віці $57,7 \pm 4,3$ роки, $T_{2-3}N_{0-2}M_0$). З метою встановлення впливу зрушень стану еритроцитарних мембран на величину МСН у 241 хворого із солідними пухлинами травного каналу за наявності анемії того чи іншого ступеня було проведено комплексне дослідження з подальшим кореляційним аналізом отриманих даних. Крім того, аналогічні дослідження були проведені у 59 хворих без ознак анемії, однотипних за діагнозом, стадією захворювання, статтю та віком. Мембрани еритроцитів виділяли за методом [6]. Їх структурно-функціональний стан був охарактеризований за комплексом параметрів, що включав визначення активності пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) у мембрані за вмістом одного з кінцевих продуктів — малонового діальдегіду (МДА) [7], ступеня антиоксидантного захисту за вмістом відновленого глутатіону (ВГл) [8], сорбційної здатності (СЗЕ), проникності (ПМ) та сорбційної ємності глікокаліксу (СЄГ) [9, 10], ліпідного і білкового складу мембран [11, 12], ступеня агрегації еритроцитів (САЕ), який є характеристикою їх поверхневого заряду та електрофоретичної рухомості [13].

За методом флуоресцентного зондування мембранних структур визначали також ліпід-білкові просторові співвідношення з використанням зондів 1-анілінонафталін-8-сульфонату (АНС) та пірену [14]. Дослідження просторового співвідношення між білками та ліпідами в мембрані еритроцитів проводили з використанням зонда пірену “Serva” (Німеччина) шляхом його вбудовування та визначення інтенсивності флуоресценції мембранних білків при $\lambda_{36} = 296$ нм та ліпідів при $\lambda_{36} = 335$ нм, ефективності індуктивно-резонансного перенесення енергії (ІРПЕ) з донора (триптофанові залишки мембранних білків) на акцептор (пірен), який поглинає в області флуоресценції триптофанових залишків [14].

Визначення мікров'язкості ліпідів еритроцитарних мембран здійснювали за методом, який базується на існуванні залежності ступеня ексимеризації пірену, розчиненого в ліпідній фазі мембрани, від в'язкості його оточення. Для незалежного дослідження мікров'язкості зв'язаних та вільних ліпідів, збудження флуоресценції зонда проводили шляхом визначення ІРПЕ з триптофанових залишків білків при $\lambda_{36} = 280$ нм (в'язкість зв'язаних прибілкових ліпідів) і паралельно при $\lambda_{36} = 335$ нм (в'язкість вільних ліпідів) та визначення ступеня ексимеризації зонда (N_{280} та N_{335}).

Константу зв'язування ($K_{АНС}$) та кількість місць зв'язування зонда на мембрані ($N_{АНС}$) досліджували при використанні негативно зарядженого зонда магнієвої солі АНС, який при вбудовуванні в мембрани характеризує в основному зміни стану їх поверхневого шару, а саме зміни величини заряду і впорядкованості ділянок мембрани, в які проникають молекули АНС [14]. Інтенсивність флуоресценції (I_{ϕ}) та її квантовий вихід (Q) реєстрували при $\lambda_{\phi л} = 490$ нм та $\lambda_{36} = 380$ нм. Флуоресцентні вимірювання проводили на спектрофлуориметрі “Shimadzu RF-510” (Японія) у кварцовій односантиметровій кюветі при $25^{\circ}C$.

На гематологічному аналізаторі Sysmex K 1000 (Японія) досліджували вміст гемоглобіну в крові (Hb), МСН, МСV і ступінь анізоцитозу останніх (RDW).

Серед проаналізованих нами даних 684 історій хвороб пацієнтів зі злоякісними пухлинами травного каналу на момент встановлення діагнозу прояви анемії будь-якого ступеня вираженості мали місце у 38,4% хворих на рак шлунка та у 33,3% хворих на рак прямої кишки.

Якщо орієнтуватися лише на традиційні лабораторні ознаки (Hb, кількість еритроцитів, кольоровий показник), анемія з обстежених 684 хворих була зареєстрована тільки у 142 осіб (20,8%). При використанні гемоаналізатора зниження MCH, як одного з основних показників наявності анемії, встановлено у 35,2% хворих. У 24,3% випадків при дослідженні за допомогою цього приладу виявляється одночасне зменшення як Hb, так і MCH. Достатньо велика кількість онкологічних хворих без лабораторних ознак анемії, які реєструються за допомогою традиційних методів дослідження, може бути пояснена високими регенераторними можливостями червоного відростка кісткового мозку, який здатний протягом тривалого часу компенсувати підвищений рівень деструкції еритроцитів на периферії.

Біохімічні дослідження, проведені саме у 241 хворого з лабораторними ознаками анемії — зниженням MCH, MCHC, коливанням величини MCV, довели, що в мембранах еритроцитів більш істотно активується ПОЛ, що призводить до накопичення МДА порівняно з даними у 30 практично здорових осіб та хворих без лабораторних ознак анемії (табл. 1). Поряд з цим знижується ступінь антиоксидантного захисту в мембранах еритроцитів у хворих з анемією, на що вказує падіння практично втричі вмісту ВГл. Порушуються і функціональні характеристики мембран зі змінами сорбційних властивостей, СЕГ та ПМЕ.

Об'єм та ступінь анізоцитозу еритроцитів, які є похідними від стану метаболічних параметрів мембран, також змінюються в онкологічних хворих при розвитку анемії. Проте якщо RDW зростає, то MCV нібито залишається незмінним. Однак детальний аналіз величин зрушень цього показника свідчить про те, що при розвитку злоякісних новоутворень у 21,4% хворих цей показник є сталим, у 35,5% — зростає на 18,5%, а у 40,1 % — зменшується практично на чверть. Саме це і відображає збільшення ступеня анізоцитозу. Слід зазначити, що зменшення середнього об'єму еритроциту звичайно свідчить про формування жорсткої мембрани, що призводить до зниження здатності еритроцитів до деформації [15] та, цілком логічно, супроводжується порушенням функціональних можливостей молекули гемоглобіну.

Зміни інтенсивності метаболічних процесів, насамперед прооксидантно-антиоксидантного балансу, приводять до накопичення окиснених форм фосфоліпідів, зрушення співвідношення “холестерин/фосфоліпідів” і змін ліпід-білкової взаємодії з наступним формуванням жорсткої мембрани.

Таблиця 1. Характеристики структурно-функціонального стану мембран еритроцитів та вмісту гемоглобіну у хворих на рак травного каналу ($M \pm m$)

Показник	Здорові особи	Хворі без ознак анемії	Хворі з ознаками анемії
МДА, нмоль · 10 ⁶ ер.	3,67 ± 0,10	4,07 ± 0,54	5,46 ± 0,60**
ВГл, 10 ⁻¹² ммоль/ер.	1,83 ± 0,11	2,13 ± 0,12	0,65 ± 0,06**
СЗЕ, %	21,6 ± 2,4	26,8 ± 1,6*	35,4 ± 3,2**
СЕГ, 10 ⁻¹² г/ер.	1,82 ± 0,12	2,06 ± 0,19	3,14 ± 0,48**
САЕ, бали	8,2 ± 0,2	11,3 ± 0,5*	15,0 ± 0,4**
ПМЕ, ум. од.	11,34 ± 0,12	13,12 ± 0,14	19,23 ± 1,96**
MCH, пг	32,6 ± 2,3	31,9 ± 2,6	28,4 ± 1,7**
MCV, фл	84,16 ± 1,10	83,75 ± 1,34	78,21 ± 1,22**
RDW, фл	21,2 ± 2,3	32,6 ± 1,9*	41,5 ± 1,5**

* Різниця достовірна порівняно з даними у здорових осіб.

** Різниця достовірна порівняно з даними у хворих без ознак анемії.

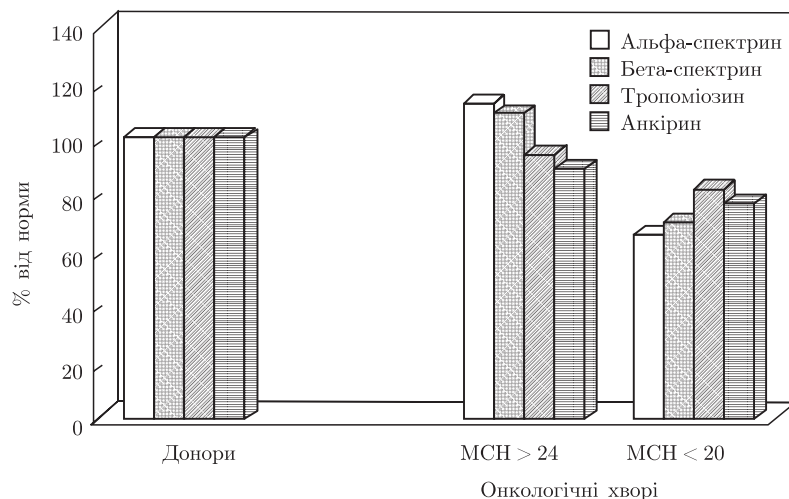


Рис. 1. Зміни білкового складу мембран еритроцитів при розвитку анемії у хворих на рак травного каналу

Визначення вмісту вільного холестерину (ХС) та сумарного вмісту фосфоліпідів (ФЛ) в мембрані еритроцитів показало, що у онкологічних хворих при наявності анемії збільшується вміст ХС при одночасному зниженні загального вмісту ФЛ (абсолютного та відносного). За рахунок таких змін величина співвідношення ХС/ФЛ істотно — майже у 5 разів — знижується (табл. 2), що свідчить про порушення ліпідної будови мембрани та узгоджується з даними літератури щодо активації мембранних фосфоліпаз та зниження вмісту фосфатидилхоліну з відносним підвищенням рівня його лізоформи при розвитку злоякісних пухлин.

Крім того, нами вивчено зміни білкового складу мембрани еритроцитів у хворих на рак травного каналу (рис. 1). Згідно з результатами досліджень, відносні показники вмісту білків у мембранній композиції при МСН нижче 20 пг істотно змінюються: знижується приблизно на третину вміст альфа- і бета-спектрину, на 16,3% — вміст тропоміозину і на чверть — вміст анкірину порівняно з показниками у хворих на рак органів травного каналу з рівнем МСН, вищим за 24 пг.

Зростання кількості спектрину, одного з основних високомолекулярних білків мембрани, що утворює разом з актином білкову сітку на її поверхні, свідчить про більш щільне порівняно з нормою упакування мембранного білка, що може призводити до зниження об'єму еритроцитів та їхньої здатності до деформації. При одночасному зменшенні кількості анкірину, основного глікопротеїду мембрани, порушується трансмембранний транспорт води, катіонів, різних ферментів.

Імовірно, що в основі змін вмісту мембранних білків лежить інтенсифікація процесів вільнорадикального окиснення з генерацією активних форм кисню. При пухлинних проце-

Таблиця 2. Зміни вмісту холестерину і фосфоліпідів та їх співвідношення у мембранах еритроцитів у онкологічних хворих з анемією (M + m)

Показник	Здорові особи	Хворі
ХС, мкмоль/мг білка	0,39 ± 0,03	0,63 ± 0,02*
ФЛ, мкмоль Р/мг білка	1,67 ± 0,14	0,32 ± 0,02*
ХС/ФЛ	0,23 ± 0,02	1,97 ± 0,16*

* Різниця достовірна ($p < 0,05$) порівняно з даними у здорових осіб.

сах, особливо поширених, коли компенсаторна активність антиоксидантів знижена, накопичення активних форм кисню ініціює окисну денатурацію мембранних білків еритроцитів. При цьому також послаблюється взаємодія між білками не тільки цитоскелета, але й суто мембрани еритроцитів, порушуються ліпід-білкові взаємодії в мембранах, на що вказують і отримані нами раніше дані.

Для підтвердження такого роду перебудов у мембранах при розвитку анемії в онкологічних хворих на наступному етапі дослідження було проведено флуоресцентне зондування мембран еритроцитів. Виявлено, що у хворих на рак травного каналу достовірно зменшується кількість місць його зв'язування (табл. 3). Водночас зменшується інтенсивність флуоресценції АНС та квантовий вихід флуоресценції, розраховані у відносних одиницях порівняно до даних у донорів, та вірогідно зростає величина $K_{АНС}$, що свідчить про порушення фізичних властивостей поверхневого шару мембрани та зміни її електрокінетичного потенціалу.

Тобто в основі зниження флуоресценції АНС у хворих на рак травного каналу за наявності анемії при зв'язуванні з мембранами лежить зменшення кількості ділянок фіксації зонда, можливо, за рахунок модифікації ліпідної компоненти в області полярних голівок та гліцеринових залишків фосфоліпідів, що може призводити до порушення ліпід-білкових взаємодій, а також за рахунок зростання на поверхні мембран кількості від'ємно заряджених груп у результаті накопичення продуктів ПОЛ.

Дослідження мікрів'язкості мембран еритроцитів у онкологічних хворих з анемією проводили за допомогою флуоресцентного зонда пірену, який звичайно локалізується в зоні жирнокислотних ланцюгів фосфоліпідів суспензії мембран, де він здатний утворювати тривало існуючі ексимери (димери збудженої та незбудженої молекул). При заданих температурі та концентрації зонда ступінь ексимеризації пірену визначається головним чином в'язкістю середовища і, відповідно, може її характеризувати [14].

На існування в анемізованих хворих на рак травного каналу явища перенесення енергії з мембранних білків еритроцитів на пірен вказують дані з визначення флуоресценції мембрани еритроцитів у його присутності. При збільшенні концентрації пірену в пробі еритроцитарних мембран хворих на рак травного каналу з 5 до 10 мкМ зменшувалась інтенсивність флуоресценції при 335 нм, що свідчить про міграцію енергії з триптофанових залишків на пірен та зміни поверхневого заряду мембран.

Вищезазначені ліпід-білкові просторові перебудови приводять до зниження плинності і підвищення жорсткості еритроцитарної мембрани [2]. За умов зменшення середнього об'єму еритроцитів це супроводжується деформацією молекули гемоглобіну і порушенням її кисень-транспортної функції. Прогресуюча тканинна гіпоксія знову запускає ланцюгову реакцію нагромадження активних форм кисню і порочне коло замикається.

Таблиця 3. Спектральні характеристики флуоресцентного зонда АНС, зв'язаного з мембранами еритроцитів хворих на рак травного каналу ($M \pm m$)

Показник	Донори	Хворі на рак травного каналу з анемією
I_f , відн. од.	1,0	$0,73 \pm 0,04^*$
$K_{АНС}$, $10^{-4}/M$	$3,2 \pm 0,3$	$4,4 \pm 0,1^*$
$N_{АНС}$, нмоль/пг	$34,1 \pm 2,0$	$21,8 \pm 1,7^*$
Q , відн. од.	1,0	$0,83 \pm 0,06^*$

* Зміни вірогідні ($p < 0,05$) порівняно з даними у донорів.

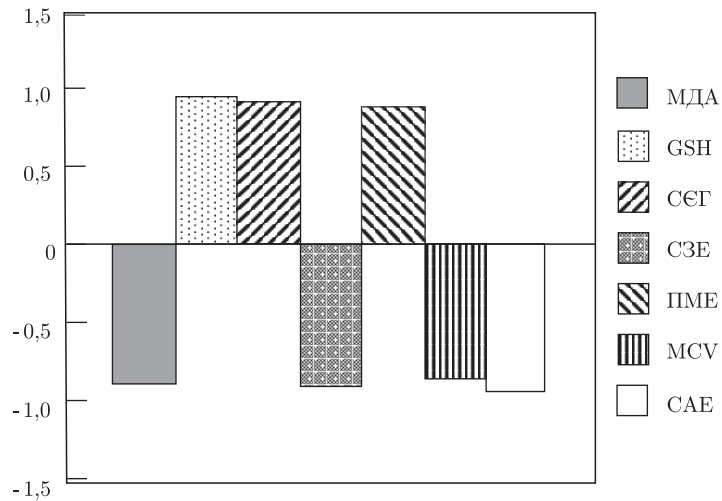


Рис. 2. Коефіцієнти кореляції між показниками структурно-функціонального стану мембран еритроцитів хворих на рак травного каналу та МСН

На останньому етапі дослідження був проведений багатofакторний кореляційний аналіз між змінами біохімічних та структурних параметрів мембрани еритроцитів, з одного боку, та вмісту гемоглобіну в еритроциті, з іншого. Встановлено, що в обстежених хворих на рак травного каналу при зниженому вмісті гемоглобіну в еритроциті паралельно змінювалися всі перераховані вище характеристики структурно-функціонального стану мембран еритроцитів (рис. 2). У пацієнтів з рівнем МСН, меншим за 20 пг, отримані вірогідно значущі, вищі за $\pm 0,8$ ($p < 0,05$), коефіцієнти кореляції.

Можливо, що першопричиною існування мембранної складової багатокомпонентного механізму виникнення анемії при солідних злоякісних новоутвореннях є властива пухлині тканинна гіпоксія і супровідні їй метаболічні порушення. Саме гіпоксія разом з масою пухлини при солідних новоутвореннях є незалежними чинниками сприяє прогнозу захворювання. Функціональна неповноцінність клітин червоної крові та анемічний синдром, що її супроводжує, призводять до поглиблення гіпоксичного стану та сприяють формуванню замкненого метаболічного ланцюга, погіршуючи перебіг захворювання. Це вказує на необхідність урахування встановлених метаболічних та структурних порушень стану мембран еритроцитів при корекції анемії в онкологічних хворих.

1. *Benoist S., Panis Y., Pannegion V. et al.* Predictive factors for perioperative blood transfusion in rectal resection for cancer: a multivariate analysis of a group of 212 patients // *Surgery*. – 2001. – **129**. – P. 433–439.
2. *Van Belle S.J.-P., Cocquit V.* Impact of haemoglobin levels on the outcome of cancer treated with chemotherapy // *Crit. Rev. Oncol. / Haematol.* – 2003. – **47**. – P. 1–11.
3. *Ротар О. В., Кулачек Ф. Г., Сентютович Р. В. та ін.* Анемія як фактор розвитку ускладнень після операцій на товстій кишці // *Актуальні питання терапії супроводу злоякісних новоутворень: Матеріали наук.-практ. конф.* – Чернівці, 2004. – P. 8–13.
4. *Stasi R.* Anaemia management in cancer patients // *Hosp. Pharm. Eur.* – 2005. – **23**. – P. 19–23.
5. *Cazzola M.* A pathophysiological and a treatment of anemia in oncological patients // *Anemia in oncological patients*. – 2002. – **1**, No 1. – P. 11–16.
6. *Dodge J. T., Mitchell I. Z., Hanahan D. J. et al.* The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes // *Arch. Biochem. and Biophys.* – 1963. – **100**. – P. 119–130.

7. Банкова В. В., Прищепова Н. Ф., Авратинский О. И. Способ оценки патологических изменений плазматической мембраны у детей при различных заболеваниях // Патол. физиология и эксперим. терапия. – 1987. – № 3. – С. 78–81.
8. Зайцев В. Г., Закревский В. И., Давыдов А. И. Уровень гипергликемии у больных сахарным диабетом // Клин. лаб. диагностика. – 1999. – № 11. – С. 32–33.
9. Михайлович В. А., Марусанов В. Е., Бичун А. Б. Проницаемость эритроцитарной мембраны и ее сорбционная способность – оптимальные критерии тяжести эндогенной интоксикации // Анестезиология и реаниматология. – 1993. – № 5. – С. 66–69.
10. Семко Г. А. Структурно-функциональные изменения мембран и внешних примембранных слоев эритроцитов при гиперэпидермопозе // Укр. біохім. журн. – 1998. – 70. – С. 113–118.
11. Сторожок С. А., Санников А. Г., Захаров Ю. М. Молекулярная структура мембран эритроцитов и их механические свойства. – Тюмень: Изд-во Тюмен. ун-та, 1997. – 125 с.
12. Покровский А. А. Биохимические методы исследования в клинике. – Москва: Медицина, 1969. – С. 84–95.
13. Владимиров Ю. А., Добрецов Г. Э. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. – Москва: Наука, 1980. – 287 с.
14. Крылов В. Н., Дерюгина А. В. Типовые изменения электрофоретической подвижности эритроцитов при стрессовых воздействиях // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2005. – 139. – С. 364–366.

*Інститут онкології АМН України, Київ
 Національний університет фізичного
 виховання і спорту України, Київ
 Інститут експериментальної патології,
 онкології та радіобіології ім. Р. Є. Кавецького
 НАН України, Київ
 Київський національний університет
 ім. Тараса Шевченка*

Надійшло до редакції 11.12.2006