

О РОЛИ ЭРИТРОЦИТОВ В ПЕРЕРАСПРЕДЕЛЕНИИ ЖЕЛЕЗА В ТКАНЯХ У БОЛЬНЫХ РАКОМ РАСПРОСТРАНЕННЫХ СТАДИЙ

Бакурова Е.М.¹, Дорошкевич В.С.², Добаева Н.М.³, Турсунова Ю.Д.¹

¹ ГОУ ВПО «ДонНМУ им. М. Горького»

пр. Ильича, 16, г. Донецк, 283003; e-mail: 32023@mail.ru

² ГОУ ВПО «ДонНУ»

пр. Гурова, 14, г. Донецк, 283001

³ ФГОУ ВПО РостГМУ

пер. Нахичеванский, 29, г. Ростов-на-Дону, 344022, РФ

Поступила в редакцию: 29.07.20

Аннотация. В эритроцитах больных раком желудка, раком кишечника распространенных стадий исследованы уровни металлов переходной группы, особенности активности ферментов антиоксидантной системы. Определение содержания металлов в эритроцитах проводили с учетом особенностей их циркуляции в кровотоке. Установлено, что эритроциты крови, оттекающей от пораженного органа, содержат меньшее количество железа, чем эритроциты этого же пациента, циркулирующие в системном кровотоке. Перераспределению железа эритроцитов сопутствовало повышение активности их супероксидсмутазы и снижение активности глутатионпероксидазы. При сопоставлении содержания металлов в гомогенатах опухолей с их уровнями в нетрансформированных смежных тканях установили, что для железа и меди было характерным их более высокое содержание в опухоли. Установлена обратная связь между повышением содержания железа в опухоли и снижением его содержания в эритроцитах крови, оттекающей от пораженного органа (показатель корреляции Спирмена $\rho = -0,72$, т.е. отрицательная связь). Для остальных металлов такой связи не выявлено. Следовательно, эритроциты могут стать источником железа для тканей опухоли, что может способствовать формированию ее агрессивного фенотипа.

Ключевые слова: *железо, медь, кобальт, супероксидсмутаза, глутатионпероксидаза, рак, эритроциты.*

Одним из проявлений системного характера влияния опухоли на организм и ее агрессии является анемический синдром. Его развитие сопряжено с ухудшением прогноза выживаемости пациента [1]. Следовательно, является актуальным выявление патогенетических особенностей развития синдрома анемии у онкологических больных для его профилактики. Ранее нами были установлены нарушения метаболизма эритроцитов у больных раком распространенных стадий [2]. Они свидетельствуют о преимущественно гликолитическом потреблении глюкозы, напряженности энергообмена и газотранспорта. Предполагаем, что дисметаболические процессы в эритроцитах еще до развития анемии могут быть фактором развития гемической гипоксии. В свою очередь гипоксия способствует формированию агрессивного фенотипа опухоли.

Известно, что некоторые активные формы кислорода (АФК) являются универсальными сигнальными молекулами. В опухолях различных локализаций они запускают ангиогенез, миграцию клеток и их инвазию, т.е. непосредственно участвуют в формировании агрессивных черт неоплазмы [3]. В организме ионы металлов переменной валентности хелатированы, т.к. в свободном состоянии инициируют реакции свободнорадикального окисления, ответственны за продукцию АФК, т.ч. самого мощного разрушителя - гидроксильного радикала [4]. Ряд опухолей характеризуется повышенным содержанием некоторых металлов. Поскольку в эритроцитах сосредоточено до 70% железа, содержащегося в организме, нами предпринята попытка параллельного определения содержания некоторых металлов переходной группы как в тканях опухолей, так и в эритроцитах крови с учетом их циркуляции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выполнено сравнительное исследование активности ферментов в 53 образцах гемолизатов отмытых эритроцитов. При выделении из цельной крови эритроциты крови трижды отмывали физиологическим раствором, центрифугируя при 1200g. Активность антиоксидантных ферментов определяли спектрофотометрически [2]. Активность супероксидсмутазы регистрировали по подавлению окисления адреналина при pH 10,2. При расчете единиц активности учитывали 50% подавление автоокисления адреналина. Активность глутатионпероксидазы (ГПО) оценивали по изменению содержания восстановленного глутатиона, определяя окрашенные в желтый цвет его производные соединения с 2-нитро-5-тиобензоатом. Содержание металлов изучали методом атомно-эмиссионной спектроскопии (спектрометр атомно-эмиссионный СЭВ-30). Уровни железа, меди, кобальта и цинка определяли в эритроцитах и гомогенатах тканей распространенного рака (T₃₋₄N_{1-x}M_{0-x} стадий), а также нетрансформированной слизистой края резекции органа. При определении содержания металлов в эритроцитах учитывали их локальность в системном кровотоке. Для этого получали

Таблица 1. Содержание металлов в тканях распространенного рака желудка и кишечника, мкг/г (медиана, первый и третий квартили)

Fe		Cu		Co		Zn	
К-ль	О	К-ль	О	К-ль	О	К-ль	О
43,5	65,5**	9,4	15,3	60,0	24,9	5,0	3,6
(26,0;	(49,0;	(3,5;	(8,3;	(25,0;	(6,0;	(1,1;	(0,5;
97,5)	152,0)	39,4)	49,8)	110,0)	32,0)	8,4)	5,0)

Примечание. К-ль – нетрансформированная слизистая края резекции (контроль); О – опухоль;
* - $p < 0,01$ в опухоли по сравнению с контролем.

образцы крови, взятой во время операции из локтевой вены, а также из вены, выносящей кровь от оперируемого отдела желудка или кишечника. Получение гомогенатов тканей проводили по стандартной методике, используя 0,25 М раствор сахарозы в 0,005 М трис-НСl-буфере рН 8,1 и 0,15 М КСl. Для определения содержания металлов использовали по 10 пар образцов тканей (опухоль-нетрансформированная слизистая). Статистическая обработка полученных результатов исследования проводилась с помощью лицензионных программ «MedStat» (Альфа). Для проверки распределения на нормальность использовался критерий W Шапиро-Уилка, что позволяет корректно проводить проверку при небольших объемах выборки. При анализе данных для оценки генеральной совокупности использовались стандартные характеристики.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Содержание железа в гомогенатах карцином желудка и кишечника было наивысшим по сравнению с металлами-микроэлементами. В опухолях – от 150 мкг/г до 50 мкг/г, в нетрансформированных тканях – от 98 до 26 мкг/г (табл. 1).

При сравнении образцов тканей в каждом отдельном случае (опухоль/нетрансформированная ткань края резекции) – уровни железа в опухолях были выше, чем в тканях в 1,3-1,6 раза ($p = 0,03$).

В отличие от цинка и кобальта содержание меди в опухоли также было выше по сравнению со слизистой края резекции (в 1,6-2,4 раза, $p < 0,05$). Повышение содержания железа и меди в карциномах желудка и кишечника способствует формированию в них токсичных форм АФК. Например, в реакциях Хабера-Вейса, Фентона генерируется радикал гидроксила ($\text{HO}\cdot$). Он стимулирует ангиогенез [3]. Обладая мощным повреждающим действием на ДНК, РНК, способствует гибели перитуморальных клеток, опосредует инвазию опухолевого клона.

При определении непараметрического коэффициента ранговой корреляции лишь между уровнями железа и меди в тканях карцином выявлена прямая сильная связь (коэффициент Спирмена $\rho = 0,83$, $p < 0,05$). Данная взаимосвязь указывает на некоторую синергию между металлами переменной валентности, т.к. одновременное повышение их уровней будет усиливать прооксидантные процессы. Для остальных металлов, как в контрольных тканях, так и в опухолевых, корреляции не выявлено.

В данном исследовании нас интересовал вопрос о возможных причинах перераспределения содержания некоторых металлов в опухолях. Параллельно с тканями мы провели исследование уровней этих же металлов в эритроцитах крови. При этом эритроциты выделяли из крови, забранной из локтевой вены (э.в) и из вены, выносящей кровь от оперируемого органа (э.о).

Содержание железа в эритроцитах периферической крови значительно варьировало от 6340 до 1862 мкг/г. В эритроцитах крови, оттекающей от органа – от 5397 до 1023 мкг/г (табл. 2).

В каждом индивидуальном случае в эритроцитах крови, оттекающей от органа, содержание железа было всегда ниже его уровней в эритроцитах в системном кровотоке. По сравнению с остальными металлами эти различия были характерны лишь для железа ($p = 0,005$). Установлена обратная связь между повышением содержания железа в опухоли и снижением его содержания в эритроцитах крови, оттекающей от пораженного

Таблица 2. Содержание металлов в эритроцитах при распространенных формах рака желудка и кишечника, мкг/г (медиана, первый и третий квартили)

Fe		Cu		Co		Zn	
Э.в	Э.о	Э.в	Э.о	Э.в	Э.о	Э.в	Э.о
2844,5	2327,5*	10,6	12,3	137,0	124,7	2,7	2,8
(2272,0;	(1281,00;	(7,3;	(4,3;	(65,0;	(51,0;	(1,4;	(1,9;
4820,0)	3390,0)	14,7)	15,4)	158,0)	272,0)	4,0)	5,2)

Примечание. Э.в – эритроциты периферической крови (контроль); э.о – эритроциты крови, оттекающей от органа; * - $p < 0,01$ по сравнению с контролем.

Таблица 3. Особенности активности ГПО в эритроцитах при распространенных формах рака желудка и кишечника, мкмоль/мин·мг

Группа	Контроль (n = 19)	РЖ (n = 18)		КРР (n = 16)	
		I	II	I	II
ГПО	6,67 ± 1,75	5,31 ± 0,87	1,10 ± 0,29*	4,15 ± 1,65	0,99 ± 0,69*

Примечание. * - $p < 0,01$ по сравнению с контролем.

органа (коэффициент Спирмена $\rho = -0,66$ т.е. отрицательная связь). Для остальных металлов такой связи не выявлено. Следовательно, эритроциты – наиболее вероятные доноры железа для тканей опухоли, что может способствовать формированию ее агрессивного фенотипа.

Как было отмечено нами ранее, нарушения метаболизма эритроцитов могут стать причиной их структурно-функциональных изменений, обуславливающих их более раннюю элиминацию из кровотока или внутрисосудистый гемолиз. Ключевыми факторами в патогенезе синдрома «старения эритроцитов» считают процессы свободнорадикального окисления, карбонилирования и нитрозилирования гемоглобина (Hb). В них участвует железо гема, а Hb переходит из растворимого в мембраносвязанное состояние (МСНб). Нарастание уровней нефункционального МСНб ускоряет гемолиз [5].

При изучении активности супероксидсмутазы (СОД) и глутатионпероксидазы (ГПО) в эритроцитах периферической крови установили преимущественное нарастание активности СОД по сравнению с контролем. Вероятно, что в этих случаях в эритроцитах мог формироваться супероксидный радикал ($O_2^{\cdot-}$). Супероксиданион способен инициировать восстановительное высвобождение ионов металлов переменной валентности, в особенности железа, из их комплексов с биологическими молекулами [4]. В системе эритроцита – это глобиновые цепи Hb. К тому же, протонированная форма этого радикала гидрофобна. Аккумулируясь в мембране, запускает цепные реакции перекисного окисления липидов (ПОЛ) [4]. Следствием их усиления будет сокращение периода активной системной циркуляции эритроцита, или внутрисосудистый гемолиз.

По результатам кластерного анализа группа больных по активности эритроцитарной ГПО оказалась неоднородной (табл. 3). Статистический анализ выделил 2 кластера (I и II группа). В одном кластере активность фермента достоверно не отличалась от контроля (I группа). В другом кластере она была снижена (II группа). Вероятно, что в этих случаях в эритроцитах мог формироваться пероксид водорода (H_2O_2). В результате корреляционного анализа установлена обратная отрицательная связь между активностями СОД и ГПО в эритроцитах (коэффициент Спирмена $\rho = -0,65$).

Известно, что удельная активность ГПО зависит от содержания в клетке восстановленного глутатиона. Низкая активность фермента может быть обусловлена снижением его уровней. Восстановленный глутатион, помимо детоксикации H_2O_2 , играет ключевую роль в инактивации органических гидропероксидов, а также дикарбониллов и токсичных для клетки конечных продуктов гликирования [6, 7]. Следовательно, можно предположить снижение устойчивости не только к оксидативному, но и к карбонильному, гликативному стрессам эритроцитов, вошедших по результатам статистического анализа во второй кластер.

Следовательно, дисбаланс активностей СОД и ГПО в эритроцитах, сформировавших II группу, может способствовать усилению прооксидантных процессов, в частности, формированию условий для протекания реакции Фентона [4]. В ходе ее неферментативное взаимодействие пероксида водорода с ионом железа приводит к образованию из H_2O_2 крайне агрессивного HO^{\cdot} . Следовательно, из-за интенсификации ПОЛ, окислительной модификации белков будут создаваться метаболические предпосылки к развитию синдрома «раннего старения эритроцита». Они же обусловят дегенерацию МСНб и выход липофильного гема из эритроцита, из-за его способности проникать через мембрану. Благодаря железу гем сам обладает выраженными прооксидантными эффектами. Можно предполагать, что следствием дисметаболических процессов в эритроцитах циркулирующей крови у пациентов с распространенными формами рака будет развитие их дисфункции и гемической гипоксии. Период активной циркуляции красных клеток крови будет уменьшаться. В результате сами эритроциты могут быть источником железа для опухоли за счет деградации мембраносвязанного Hb.

Таким образом, в карциномах желудка и кишечника выявлено преимущественное повышение концентраций железа по сравнению с нетрансформированными смежными тканями. В перераспределении железа в организме у онкобольных могут участвовать эритроциты. Выявленный дисбаланс активности СОД и ГПО, рассмотрен в качестве патогенетического фактора развития анемического синдрома и опухолевой агрессии.

Список литературы / References:

1. Aapro M., Osterborg A., Gascon P., Ludwig H., Beguin Y. Prevalence and management of cancer-related anaemia, iron deficiency and the specific role of i.v. iron. *Annals of Oncology*, 2012, vol. 23, pp. 1954-1962. DOI: 10.1093/annonc/mds112.
2. Бакурова Е.М. Особенности энергетического метаболизма эритроцитов у больных раком распространенных стадий. *Актуальные вопросы биологической физики и химии. БФФХ-2016: материалы XI международной научно-технич. конференции*, г. Севастополь, 25-29 апреля 2016 г.: в 2 т. Т. 2. Севастополь:

Севастопольский государственный университет, 2016, 226 с. [Bakurova E.M. The Energy Metabolom of Red Blood Cells Features in Patients with Advanced Tumors. *Modern Trends in Biological Physics and Chemistry. BPPC-2016: Proceedings of XI International Science-Technical Conference*, Sevastopol, 25-29 of April, 2016, vol. 2. Sevastopol: Sevastopol State University, 2016, 226 p. (In Russ.)]

3. Mistry R.K., Brewer A.C. Redox regulation of gasotransmission in the vascular system: A focus on angiogenesis. *Free Radic. Biol. Med.*, 2017, vol. 108, pp. 500-516. DOI: 0.1016/j.freeradbiomed.2017.04.025.

4. Шендрик А.Н., Каниболоцкая Л.В. *Радикальные реакции в клетке. Уч-метод. Пособие*. Донецк: ДонНУ, 2007, 152 с. [Shendrik A.N., Kanibolotskaya L.V. *Radikalnyie reaksii v kletke. Uch-metod. Posobie*. Donetsk: DonNU, 2007, 152 p. (In Russ.)]

5. Kosmachevskaya O.V., Shumaev K.B., Nasybullina E.I., Gubkina S.A., Topunov A.F. Interaction of S-nitrosoglutathione with methemoglobin under conditions of modeling carbonyl stress. *Hemoglobin*, 2013, vol. 37, no. 3, pp. 205-218.

6. Буко И.В., Цапаева Н.Л. Диагностическая информативность показателей системы глутатиона эритроцитов, окислительного стресса и воспаления при ишемической болезни сердца. «*Лабораторная диагностика. Восточная Европа*», 2019, т. 8, № 2, с. 227-236. [Buko I., Tsapaeva N. Diagnostic Informational Content of the Indices of Erythrocyte Glutathione System, Oxidative Stress and Inflammation in Ischemic Heart Disease. "Laboratory Diagnostics. Eastern Europe", 2019, vol. 8, no. 2, pp. 227-236. (In Russ.)]

7. Lin J.A., Wu C.H., Lu C.C. et al. Glycative stress from advanced glycation end products (AGEs) and dicarbonyls: An emerging biological factor in cancer onset and progression. *Mol Nutr Food Res*, 2016, vol. 60, no. 8, pp. 1850-1864. DOI: 10.1002/mnfr.201500759.

THE ROLE OF ERYTHROCYTES IN THE REDISTRIBUTION OF IRON IN ADVANCED TUMORS OF GASTRIC OR COLON CANCER

Bakurova E.M.¹, Doroshkevich V.S.², Dobaeva N.M.³, Tursunova Yu.D.¹

¹ Maksim Gorky National Medical University

pr. Il'icha, 16, Donetsk, 283003, e-mail: 32023@mail.ru

² Donetsk National University

Gurova Ave., 14, Donetsk, 283001,

³ Rostov State Medical University

Nakhichevansky per., 29, Rostov-on-Don, 344022, Russia

Abstract. A comparative study of antioxidant system enzymes activity and the levels of transition group metals in erythrocytes and tumor tissues of advanced gastric or colon cancer was carried out. Determination of metal content in erythrocytes was carried out according to peculiarities of their bloodstream circulation. It was found that erythrocytes of blood flowing from the affected organ contain less iron than erythrocytes of the same patient circulating in the systemic blood flow. The redistribution of iron in erythrocytes was accompanied by an increase in the activity of their superoxide dismutase and a decrease in the glutathione peroxidase activity. When comparing the metal content in tumor homogenates with their levels in nontransformed adjacent tissues, it was found that iron and copper were characterized by their higher content in tumors. Feedback between the increase of iron content in tumor and decrease of its content in erythrocytes of blood flowing from the affected organ was established (Spirman correlation index $\rho = -0.66$, i.e. negative correlation). For other metals this pattern has not been revealed. Therefore, erythrocytes may become a source of iron for tumor tissues, which may contribute to the formation of their aggressive phenotype.

Key words: iron, copper, cobalt, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, cancer, erythrocytes.