

И. Е. Сedaков^{1,2}, Е. Д. Якубенко¹, А. В. Борота¹, Г. Е. Полунин¹, И. В. Коктышев¹

Особенности гликолиза и энергетического статуса эритроцитов крови у больных с неспецифическим язвенным колитом, болезнью Крона и раком толстой кишки на фоне терапии лактатом натрия

1. ГОУ ВПО «Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького».

2. Республиканский онкологический центр имени профессора Г. В. Бондаря

Характерной чертой неопластической трансформации клеток является увеличение скорости гликолитического пути окисления глюкозы.

Цель исследования: изучить особенности гликолиза и энергетического статуса эритроцитов крови у больных с неспецифическим язвенным колитом (НЯК), болезнью Крона (БК) и раком ТК (РТК) на фоне терапии лактатом натрия.

Материал и методы. В крови обследуемых определяли показатели гликолиза и содержание аденозинтрифосфорной кислоты. Все больные получали терапию, которая включала препараты, содержащие лактат натрия, введение было внутривенное капельное по 7,6 грамма в сутки в течение 10 дней.

Результаты. Установлено, что избыточная активация гликолиза характерна не только для больных с РТК, но и для больных с НЯК и БК (повышенное содержания лактата (от 1,6 до 2,7 раза), пирувата (от 2,9 до 3,3 раза), активности ЛДГ в сыворотке крови в 1,5 раза, снижение содержания АТФ в эритроцитах крови у больных с НЯК и РТК в 1,2 раза).

Заключение. Применение терапии, включающей лактат натрия, привело к снижению чрезмерной активации гликолиза у больных с НЯК, БК и РТК. Самое выраженное снижение активации отмечено у пациентов с НЯК, у них же отмечено увеличение продукции АТФ в сравнении с исходными значениями. Наименьшие изменения наблюдали в группе больных с РТК.

Ключевые слова: неспецифический язвенный колит, болезнь Крона, рак толстой кишки.

Актуальность.

Неспецифический язвенный колит (НЯК) и болезнь Крона (БК) вместе составляют вид кишечной патологии, известной как неспецифические воспалительные заболевания толстой кишки (НВЗТК) [1], с неизвестной этиологией [2]. Наибольшее распространение НВЗТК получили в промышленно развитых странах [3, 4]. Одним из таких промышленно развитых регионов является и Донбасс [5].

Больные с НВЗТК находятся в группе повышенного риска развития рака толстой кишки (РТК) [6, 7, 8], подтверждая, что периодические обострения хронического воспалительного процесса стимулирует канцерогенез [9]. С увеличением длительности заболевания возрастает и риск развития КРР, причем этот риск повышен даже в молодом возрасте. Однако, механизм, лежащий в основе развития РТК через хроническое воспаление, не известен [10].

Характерной чертой неопластической трансформации клеток является увеличение скорости гликолитического пути окисления глюкозы [11]. Окисление глюкозы в эритроците имеет две функции: энергетическую и антиоксидантную, а ингибирование гликолиза приводит к нарушению этих функций и соответственно к гемолизу.

Опухолевые клетки используют глюкозу как источник энергии, нормальные же клетки (мозга, сердца, печени, почек и мышц) могут окислять лак-

тат и использовать его как альтернативное «топливо».

Активное изучение функций лактата в организме в настоящее время дает новые сведения о его роли в энергетическом обмене, репарации тканей, регуляции активности ферментов [12, 13]. В работах *in vitro* показано, что лактат натрия увеличивает скорость дезаминирования аденозина и таким образом уменьшает аденозинергическую иммуносупрессию, которая характерна для опухолевого роста.

Цель работы.

Изучить особенности гликолиза и энергетического статуса эритроцитов крови у больных с неспецифическим язвенным колитом, болезнью Крона и раком ТК на фоне терапии лактатом натрия.

Материалы и методы.

Исследования проведены у 88 человек, которые составили 4 группы: три основные (пациенты на этапе подготовки к оперативному вмешательству) и одна контрольная: 1-я группа — 34 пациента с неспецифическим язвенным колитом (НЯК), 2-я — 12 пациентов с болезнью Крона (БК), 3-я — 22 пациента с не метастатическим раком толстой кишки (РТК), 4-я — 20 здоровых лиц (контрольная группа). В крови обследуемых определяли показатели гликолиза и содержание аденозинтрифосфорной кислоты. Все больные получали терапию, которая включала

Таблица 1.

Исходные биохимические показатели гликолиза у больных с заболеваниями толстой кишки ($M \pm \sigma$)

Показатели/ группы	Лактат, ммоль/л	Пируват, ммоль/л	ЛДГ, мккат/л	АТФ, мкмоль/мл
1-ая (НЯК) n1 = 34	3,77 $\pm$ 1,18	0,348 $\pm$ 0,123	9,36 $\pm$ 2,51	0,790 $\pm$ 0,240
2-ая (БК) n2 = 12	5,60 $\pm$ 3,25	0,314 $\pm$ 0,080	8,86 $\pm$ 2,36	1,011 $\pm$ 0,166
3-ья (РТК) n3 = 22	3,32 $\pm$ 2,26	0,307 $\pm$ 0,062	9,32 $\pm$ 3,41	0,799 $\pm$ 0,263
4-ая (контроль) n4 = 20	2,05 $\pm$ 0,26	0,105 $\pm$ 0,039	6,16 $\pm$ 1,03	0,948 $\pm$ 0,092

препараты, содержащие лактат натрия, введение было внутривенное капельное по 7,6 грамма в сутки в течение 10 дней. Значения биохимических показателей у больных определяли до и после терапии лактат-содержащим препаратом, а в контрольной группе однократно.

Концентрацию молочной кислоты (лактата) в сыворотке крови определяли с помощью набора реагентов «Лактат-Витал» («Витал Диагностика СПб», Санкт-Петербург, Россия) энзиматическим колориметрическим методом. Уровень пирувата в крови исследовали модифицированным методом Умбрайт. Для определения активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в сыворотке крови использовали наборы жидких реагентов «Лактатдегидрогеназа Liquid 100» («Плива-Лаксма», Чехия). Содержание аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ) в эритроцитах крови изучали методом Виноградовой И. Л.

Статистический анализ результатов проведен с использованием лицензионного пакета прикладных программ Statistica-6.0 (StatSoft). Учитывая то, что распределение исследуемых показателей в каждой выборке данных было отличным от нормального, применяли непараметрические критерии различия (Краскал-Уоллиса, Манна-Уитни, Вилкоксона), а также ранговые корреляции Спирмена. Полученные результаты анализировались не менее чем по двум статистическим критериям.

Результаты.

Результаты исследования показателей гликолиза в сыворотке крови и энергетического статуса эритроцитов до начала консервативного лечения представлены в таблице 1. Дисперсионный анализ показал статистически повышенное содержание лактата в сыворотке крови во всех исследуемых группах в сравнении с контрольной: у пациентов с НЯК — в среднем в 1,8 раза ($p = 0,000000$); с БК — в 2,7 раза ($p = 0,000013$); РТК — в 1,6 раза ($p = 0,034$).

Между собой по уровню лактата 1-я и 2-я группы достоверно не отличались ($p = 0,072$). Значимые различия отмечены между 1-й и 3-ей группой ($p = 0,025$) и 2-й и 3-ей группой ($p = 0,014$).

При дисперсионном анализе данных содержания пирувата в сыворотке крови до начала терапии лактатом натрия также выявлено статистически достоверное превышение контрольных значений показателя во всех исследуемых группах: у пациентов

с НЯК — в среднем в 3,3 раза ($p = 0,000000$); с БК — в 3 раза ($p = 0,000000$); РТК — в 2,9 раза ($p = 0,034$).

Между собой по уровню пирувата исследуемые группы пациентов достоверно не отличались: для 1-й и 2-й групп $p = 0,617$; для 1-й и 3-ей групп $p = 0,268$; 2-й и 3-ей групп $p = 1,000$.

До начала консервативной терапии активность ЛДГ в крови пациентов с НЯК в среднем превышала таковую в контрольной группе в полтора раза ($p = 0,000006$), в группе пациентов с БК — на 44% ($p = 0,0018$); у больных с РТК — в 1,5 раза ($p = 0,000009$).

Дисперсионный анализ данных содержания АТФ показал, что до начала консервативного лечения значения показателя в эритроцитах крови пациентов с БК в среднем не отличались от контрольного уровня ($p = 0,243$). У больных с НЯК и РТК содержание АТФ было статистически достоверно ниже, чем у здоровых добровольцев — в 1,2 раза ($p = 0,022$ и $p = 0,027$, соответственно).

Статистически достоверные различия по содержанию АТФ отмечены между 1-й и 2-й группами ($p = 0,0043$) и 2-й и 3-ей группами ($p = 0,0143$). Различий между 1-й и 3-ей группами не было ($p = 0,867$).

Следует отметить, что только в 3-ей группе исходная концентрация лактата в сыворотке крови больных коррелирует (коэффициент корреляции Спирмена) с концентрацией АТФ в эритроцитах как до терапии ($p = 0,609$, при $p = 0,0026$), так и после терапии, включающей лактат натрия ($p = 0,427$, при $p = 0,0473$). Обнаруженная связь является прямой, чем выше исходная концентрация лактата в сыворотке крови, тем выше функциональная активность эритроцитов, о чем можно судить по концентрации АТФ.

Значительное повышение содержания лактата, пирувата и активности ЛДГ до начала консервативного лечения, во всех группах обследованных больных, свидетельствует о чрезмерной активации гликолиза у пациентов с НВЗТК и РТК.

Результаты исследования показателей гликолиза в основных и контрольной группах после консервативного лечения представлены в таблице 2.

Дисперсионный анализ результатов исследования показал, что концентрация лактата в крови пациентов с НЯК после терапии в среднем превышала таковую в контрольной группе в 1,6 раз ($p = 0,000002$). Самое высокое содержание молочной кислоты, как и до начала терапии, отмечено у пациентов с БК — в среднем в 2,1 раз выше контрольного ($p =$

Таблица 2.

Биохимические показатели гликолиза у больных с заболеваниями толстой кишки после терапии лактатом натрия ($M \pm \sigma$)

Показатели/ группы	Лактат, ммоль/л	Пируват, ммоль/л	ЛДГ, мккат/л	АТФ, мкмоль/мл
1-ая (НЯК) n1 = 34	3,21 ± 0,90	0,271 ± 0,054	7,65 ± 1,47	0,973 ± 0,143
2-ая (БК) n2 = 12	4,31 ± 1,51	0,243 ± 0,073	6,77 ± 2,04	1,006 ± 0,107
3-ья (РТК) n3 = 22	3,36 ± 1,11	0,271 ± 0,043	8,02 ± 2,74	0,792 ± 0,150

0,000003). В группе больных РТК уровень лактата после терапии отличался от такового в группе здоровых добровольцев в среднем в 1,6 раза ($p = 0,000129$).

После консервативного лечения по уровню лактата значимые различия отмечены только между 1-й и 2-й группами ($p = 0,0124$). Первая и третья группы между собой достоверно не отличались ($p = 0,383$), вторая с третьей также ($p = 0,149$).

При дисперсионном анализе данных содержания пирувата выявлено, что данный показатель в крови пациентов с НЯК и больных РТК после терапии лактатом в среднем превышал таковой в контрольной группе в 2,6 раза ($p = 0,000000$). В группе пациентов с БК концентрация пирувата в среднем в 2,3 раза превышала контрольные значения ($p = 0,000006$).

Между собой по уровню пирувата исследуемые группы пациентов после лечения достоверно не отличались: для 1-й и 2-й групп $p = 0,423$; для 1-й и 3-ей групп $p = 0,615$; 2-й и 3-ей групп $p = 0,149$.

После курса консервативной терапии активность ЛДГ в крови пациентов с НЯК в среднем превышала таковую в контрольной группе на 24% ($p = 0,000981$), в группе больных РТК — на 30% ($p = 0,0205$). В группе пациентов с БК после лечения активность фермента в среднем не отличалась от таковой в контрольной группе ($p = 0,533$).

Между собой по активности ЛДГ после терапии исследуемые группы пациентов достоверно не отличались: для 1-й и 2-й групп $p = 0,109$; для 1-й и 3-ей групп $p = 0,298$; 2-й и 3-ей групп $p = 0,195$.

После консервативного лечения уровни АТФ в эритроцитах крови пациентов с НЯК и БК в среднем не отличались от такового в контрольной группе ($p = 0,352$ и $p = 0,053$, соответственно).

В группе больных РТК после терапии различия концентраций АТФ в сравнении с группой здоровых добровольцев составили в среднем 1,2 раза ($p = 0,0025$).

Статистически достоверные различия по содержанию АТФ после лечения отмечены между 1-й и 3-ей группами ($p = 0,000015$) и 2-й и 3-ей группами ($p = 0,00013$). Различий между 1-й и 2-й группами отмечено не было ($p = 0,423$).

Таким образом, после терапии лактатом натрия отмечена нормализация значений показателей, характеризующих активность ЛДГ в сыворотке крови у пациентов с БК и содержание АТФ в эритроцитах крови пациентов с НЯК и БК.

Установлена тесная положительная связь между уровнями лактата и АТФ в крови больных с НЯК после терапии ($p = 0,463$, при $p = 0,0058$). Данный факт свидетельствует о положительном влиянии терапии с применением лактата натрия на функциональную активность эритроцитов.

Для сравнения показателей до и после лечения применяли Т-критерий Вилкоксона.

Содержание лактата в сыворотке крови больных с НЯК после лечения снизилось на 17% ($p = 0,0019$), у пациентов с БК — достоверно не изменилось ($p = 0,308$), как и у больных с РТК ($p = 0,322$).

При сравнении концентрации пирувиноградной кислоты в сыворотке крови обследованных обнаружено, что во всех группах пациентов значения данных показателей достоверно снизились: в 1-й группе — на 28% ($p = 0,00036$), во 2-й группе — на 29% ($p = 0,0022$), в 3-ей группе — на 13% ($p = 0,0011$).

При сравнительном анализе активности ЛДГ в сыворотке крови пациентов до и после лечения лактатом натрия отмечено, что активность фермента достоверно снизилась у больных с НЯК и БК: на 22% ($p = 0,0052$) и на 31% ($p = 0,0121$). У пациентов с РТК также наблюдали снижение активности ЛДГ на 16%, однако оно не было статистически значимым ($p = 0,123$).

Уровень АТФ в эритроцитах крови после лечения статистически значимо увеличился только у больных 1-й группы: на 23% ($p = 0,0029$). У пациентов 2-й и 3-ей групп содержание АТФ осталось на прежнем уровне: $p = 0,875$ и $p = 0,223$, соответственно. Следует отметить, что данные значения показателей у пациентов с НЯК и БК соответствовали контрольным. И только у больных с РТК концентрация АТФ была ниже на 20%.

Учитывая полученные результаты, можно предложить использование показателя уровня АТФ в эритроцитах для дифференциальной диагностики НЯК с НЯК-раком толстой кишки. Терапевтическую ценность препарат имеет для группы с НЯК, так как приводит к увеличению продукции АТФ в эритроцитах больных с колитом. Таким образом, можно предположить, что при увеличении лактата в сыворотке крови больных колитом, в их эритроцитах ускоряется гликолитическое окисление глюкозы, чего не происходит в организме больных с РТК.

Известно, что гипоксия является одной из характерных черт опухолевого микроокружения и является патогенетическим фактором в канцерогенезе. До проведения соответствующей терапии уровень

АТФ в эритроцитах 1-й и 3-ей групп статистически значимо не отличался, а применение лактата натрия у больных РТК, возможно, демонстрирует имеющуюся дисфункцию эритроцитов, что является характерной чертой для онкопроцесса.

Заключение.

Повышенное содержание лактата, пирувата и активности ЛДГ до начала консервативного лечения, во всех группах обследованных больных, свидетельствует об активации гликолиза у пациентов с неспецифическими воспалительными и опухолевыми заболеваниями толстой кишки.

Применение терапии, включающей лактат натрия, привело к снижению чрезмерной активации гликолиза у больных с НВЗТК и РТК. Самое выраженное снижение активации отмечено у пациентов с НЯК, у них же отмечено увеличение продукции АТФ в сравнении с исходными значениями. Наименьшие изменения наблюдали в группе больных с РТК.

Можно сделать предположение, что низкая концентрация АТФ в эритроцитах после проведения терапии, которая включала лактат, может быть маркером злокачественного роста. Следует отметить, что применение лактата натрия у больных с НЯК и у больных с БК имеет хороший прогностический эффект и способствует увеличению энергообеспеченности эритроцитов, а соответственно уменьшает гипоксический компонент в тканях в изученных патологиях.

Список литературы.

1. Gladden L.B. Lactate metabolism: a new paradigm for the third millennium // *J Physiol.*— 2004.— Vol. 558, № 1.— P. 5–30.
2. Geboes K. What histologic features best differentiate Crohn's disease from ulcerative colitis? / K. Geboes // *Inflamm. Bowel Dis.*— 2008.— Vol. 14, № 2.— P. 168–169.
3. Ignatenko G.A. Resistance in patients with ulcerative colitis / G.A. Ignatenko, I.V. Mukhin, I.A. Plahotnikov // *Bulletin of emergency and reconstructive surgery.*— 2018.— Vol. 3, № 1.— P. 25–33.
4. Khalif I.L. Inflammatory bowel disease (ulcerative colitis and Crohn's disease) clinic, diagnosis, treatment / I.L. Khalif, I.D. Loranskaya.— Moscow: Miklosh, 2004.— 88 p.
5. Bondar G.V., Glushkov A.N., Kuznetsova L.N., Dmukhovskaya E.A. Prediction of the oncological situation in coal mining regions // *Materials of the XII Congress of Ukrainian Oncologists, September 20–22, 2011 — Sudak, ARC.*— P. 3.
6. Cancer Risk in Inflammatory Bowel Disease: A 6-Year Prospective Multicenter Nested Case-Control IG-IBD Study / L. Biancone, A. Armuzzi, M. L, Scribano [et al.] // *Inflamm. Bowel Dis.*— 2020.— Vol. 26, № 3 — P. 450–459.
7. Similarities and differences in clinical and pathologic features of inflammatory bowel disease-associated colorectal cancer in China and Canada / J. Li, W.X. Zhou, S. Liu S [et al.] // *Chin. Med. J.*— 2019.— Vol. 132, № 2.— P. 2664–2669.
8. Ansell J, Grass F, Merchea A. Surgical Management of Dysplasia and Cancer in Inflammatory Bowel Disease // *Surg. Clin. North. Am.*— 2019.— Vol. 99, № 6.— P. 1111–1121.
9. Relationship between the polymorphism of tumor necrosis factor- α -308 G>A and susceptibility to inflammatory bowel diseases and colorectal cancer: a meta-analysis / W. Fan, W. Maoqing, C. Wangyang [et al.] // *Eur. J. Hum. Genet.*— 2011.— Vol. 19, № 4.— P. 432–437.
10. Endo Y. Involvement of activation-induced cytidine deaminase in the development of colitis-associated colorectal cancers / Y. Endo, H. Marusawa, T. Chiba // *J. Gastroenterol.*— 2011.— Vol. 46, № 1.— P. 6–10.
11. Mesenchymal stromal cells protect cancer cells from ROS-induced apoptosis and enhance the Warburg effect by secreting STC1 / S. Ohkouchi, G.J. Block, A.M. Katsha [et al.] // *Mol. Ther.*— 2012.— Vol. 20, № 2.— P. 417–423.
12. Gladden L.B. A lactic perspective on metabolism // *Med Sci. Sports Exerc.*— 2008.— Vol. 40, № 3.— P. 477–485.
13. Gladden L.B. Lactate metabolism: a new paradigm for the third millennium // *J Physiol.*— 2004.— Vol. 558, № 1.— P. 5–30.

Particular features of glycolysis and the energy status of red blood cells in patients with nonspecific ulcerative colitis, Crohn's disease and colorectal cancer during therapy with sodium lactate

1. State Educational Institution of Higher Professional Education «M. Gorky Donetsk National Medical University»

2. G. V. Bondar Republican Cancer Center

A characteristic feature of neoplastic cell transformation is an increase in the rate of glycolytic glucose oxidation pathway.

Objective: our goal is to study the glycolysis and energy status of red blood cells in patients with nonspecific ulcerative colitis (NUC), Crohn's disease (CD) and colorectal cancer (CRC) during therapy with sodium lactate.

Materials and methods. In the blood of the experimental subjects, glycolysis indicators and adenosine triphosphoric acid content were determined. All the patients received the therapy with sodium lactate in intravenous drip infusions of 7.6 grams per day for 10 days.

Results. It has been established that excessive activation of glycolysis is typical not only for patients with CRC, but also for patients with NUC and CD (high lactate content (1.6 to 2.7 times), pyruvate (2.9 to 3.3 times), LDH activity in blood serum to 1.5 times, reduction of ATP content in red blood cells in patients with NUC and CRC to 1.2 times).

Conclusion. The use of sodium lactate therapy has reduced the excessive activation of glycolysis in patients with NUC, CD, and CRC. The most significant decrease in activation was noted in patients with NUC, while the increase in ATP production was noted compared to the baseline values. The smallest changes were observed in the group of patients with CRC.

Key words: nonspecific ulcerative colitis, Crohn's disease, colorectal cancer.