

ИЗМЕНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ПРОЧНОСВЯЗАННЫХ ФОСФОИНОЗИТИДОВ В ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ И ТКАНИ ЭНДОМЕТРИЯ У БОЛЬНЫХ С ГИПЕРПЛАСТИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ЭНДОМЕТРИЯ

Н.Н. Слюсарь¹, М.М. Дамиров², М.Б. Белякова¹, В.В. Жигулина¹

¹Тверской государственной медицинской университет, г. Тверь

²Государственное бюджетное учреждение здравоохранения г. Москвы

«Научно-исследовательский институт скорой помощи им.

Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения г. Москвы» г. Москва

Представлены данные об изменении содержания фосфоинозитидов в цельной крови и ткани эндометрия при инкубации в средах с разным ионным составом и тоничностью. Отмечено, что количество связанных с белками фосфоинозитидов в цельной крови больных с гиперпластическими процессами эндометрия достоверно отличается от их уровня у здоровых людей. Сходный эффект наблюдается при сравнении уровня фосфоинозитидов, в зависимости от изотонической и гипертонической сред, при исследовании нормальной и гиперплазированной ткани эндометрия. Использование экстракции подкисленными смесями растворителей позволяет более точно определить количество связанных с белками фосфоинозитидов в отличие от классических методов тонкослойной хроматографии.

Ключевые слова: фосфоинозитиды, прочносвязанные с белками фосфоинозитиды, гиперплазия эндометрия, тонкослойная хроматография.

В генезе пролиферативных заболеваний женских половых органов важную роль играют инозитсодержащие липиды, некоторые из них могут быть вторичными посредниками и основными биорегуляторами биохимических процессов в клетках [1]. Доказано, что так называемый фосфоинозитидный ответ есть не что иное, как универсальный трансмембранный сигнал, возникающий при регуляции многочисленных функций клетки, в том числе пролиферации [2, 3]. Однако, фосфоинозитиды отличаются высокой лабильностью и сведения об их содержании в крови, ткани при различных пролиферативных заболеваниях, к которым относятся гиперпластические процессы эндометрия, достаточно разноречивы [4, 5, 6]. По-видимому, это связано с тем, что в исследованиях не учитываются их зависимость от тоничности среды, рН и особенно их связи с белками при их выделении. Следовательно, целью нашей работы явилось изучение прочности связи

различных фосфоинозитидов с белками в цельной крови, ткани эндометрия при их инкубации с разным ионным составом и тоничностью.

Материал и методы исследования

Исследования фосфоинозитидов (фосфатидилинозиты (ФИ), фосфатидилинозит-4-фосфаты (ФИФ) и фосфатидилинозит-4,5-дифосфаты (ФИДФ) в цельной крови и ткани эндометрия были проведены у 30 больных с гиперплазированными процессами эндометрия (ГПЭ) в возрасте от 33 до 45 лет (II группа). У больных этой группы исследовалась гиперплазированная ткань эндометрия (ГТЭ), нормальная ткань эндометрия (НТЭ) была получена у 15 женщин репродуктивного возраста (возраст от 27 до 35 лет), у которых при морфологическом исследовании не была диагностирована патология эндометрия. Контрольную группу (I группа) для определения содержания фосфоинозитидов в цельной крови составляли 15 здоровых женщин, не имеющих гинекологической патологии в возрасте от 26 до 34 лет. Для определения прочносвязанных фосфоинозитидов использовали методику [7], позволяющую определять эти вещества в исследуемых биологических объектах в зависимости от тоничности среды и pH. Для этого цельную кровь и гомогенизированные ткани эндометрия инкубировали в течение 2 мин соответственно со смесями 0,15 М KCl в 0,05 М трис-HCl-буфере (изотоническая среда) и 0,015 М KCl в 0,05 М трис-HCl-буфере (гипотоническая среда). Затем добавляли 5 мМ дигидрофосфата натрия (Pi). После инкубации проводили согласно описанному методу мягкую, жесткую и ультразвуковую экстракции и выделение фосфоинозитидов осуществлялось методом проточной горизонтальной хроматографии. После мягкой экстракции выделили из фосфоинозитидов только ФИ, после жесткой и ультразвуковой экстракций – ФИФ, ФИДФ. После мягкой экстракции ФИФ и ФИДФ не выделялись. Содержание ФИ, ФИФ и ФИДФ рассчитывали в нМ фосфора соответствующего фосфоинозиtida на 1 мг белка. Концентрацию белка определяли биуретовым методом [8]. Статистическую достоверность различий средних величин определяли по критерию Стьюдента.

Результаты исследований и их обсуждение

Используя известный метод [7] инкубации цельной крови, НТЭ и ГТЭ в условиях изотонической и гипотонической сред с последующей мягкой, жесткой и ультразвуковой экстракцией липидов извлечены 3 типа фосфоинозитидов, связанных с белками: слабо-, жестко- и ультразвуко-связанные ФИ, жестко- и ультразвуко-связанные ФИФ и ФИДФ. Жестко- и ультразвуко-связанные фосфоинозитиды были объединены в группу прочносвязанных с белками фосфоинозитидов.

Анализ биохимических показателей позволил установить (таблица 1), что количество ФИ в цельной крови в условиях изотонической и гипотонической сред у больных с ГПЭ в среднем в 1,8 раза ниже в сравнении со значениями у здоровых женщин. Та же тенденция сохранялась и при исследовании в цельной крови содержания ФИФ и ФИДФ. Вместе с тем, присутствие фосфата снижало количество ФИ и ФИДФ в цельной крови в гипертонической среде в отличие от изотонической среды у пациентов II группы. Вместе с тем, присутствие фосфата в цельной крови в изотонической среде способствовало снижению содержания ФИ, ФИФ и ФИДФ у обследуемых I группы. Обнаружены существенные различия показателей фосфоинозитидов в цельной крови у обследуемых I-II групп при изменении рН от 7,35 до 6,6. Анализируя данные содержания ФИФ и ФИДФ в цельной крови после жесткой и ультражесткой экстракций можно отметить следующие особенности их изменений: количество ФИФ в цельной крови в изотонической среде (рН 6,6 и рН 6,6 Pi) у больных ГПЭ достоверно отличалось от их уровней у здоровых женщин. При этом содержание ФИДФ в цельной крови в изотонической среде (рН 7,35 и рН 7,35 Pi) было в среднем в 1,3 раза выше, в отличии от их значений в изотонической среде (рН 6,6 и рН 6,6 Pi) у обследуемых I-II групп. Обращает на себя внимание тот факт, что количество ФИДФ в цельной крови в изотонической среде (рН 7,35 Pi, ультражесткая экстракция) в среднем в 2,4 раза выше их значений в гипотонической среде (рН 7,35 Pi, ультражесткая экстракция) у обследуемых II группы.

Исследование содержания слабо и прочносвязанных с белками фосфоинозитидов показало (таблица 2), что в ГТЭ количество ФИ в среднем в 1,5 раза выше их значений в НТЭ, та же тенденция сохраняется при увеличении уровня ФИФ в изотонической среде (рН 7,35 и рН 6,6). Вместе с тем, добавление фосфата в изотоническую среду ГПЭ и НТЭ не способствовало различиям в уровне ФИ. В гипертонической среде с добавлением фосфата обнаружено снижение содержания ФИ в ГТЭ в сравнении с НТЭ. При исследовании показателей фосфоинозитидов (ФИФ и ФИДФ) в тканях при инкубации в предложенных средах были получены следующие результаты. Количество ФИФ в ГТЭ в изотонической и гипотонической средах при рН 7,35 и рН 6,6 было в среднем в 2,2 раза ниже их значений в НТЭ. Добавление фосфата не влияло на изменение уровня ФИ в исследуемых тканях. Вместе с тем, при ультражесткой экстракции количество ФИДФ в среднем в 2,4 раза ниже у ГТЭ в сравнении с НТЭ. При этом не обнаружено статистически значимых различий в исследованиях ФИДФ в ГТЭ в зависимости от среды инкубации.

Таблица 1

Содержание фосфонозитидов в цельной крови в зависимости от типа экстракции и состава среды инкубации (M±m)

Фосфонозитиды	Группы обследуемых	Изогониическая среда					Гипогониическая среда						
		pH 7,35	pH 7,35 + Pi	pH 6,6	pH 6,6 + Pi	pH 7,35	pH 7,35 + Pi	pH 6,6	pH 6,6 + Pi	pH 7,35	pH 7,35 + Pi	pH 6,6	pH 6,6 + Pi
ФИ	IM	7,2±0,1	6,1±0,2	5,9±0,3	5,4±0,1	6,2±0,2	7,7±0,1	5,0±0,1	4,7±0,2				
	Ж	1,9±0,2	1,7±0,1	1,3±0,2	0,9±0,01	2,7±0,1	1,8±0,2	2,4±0,3	1,0±0,1				
	У	0,6±0,01	0,72±0,11	1,1±0,3	0,4±0,02	1,6±0,1	0,8±0,01	0,65±0,04	0,88±0,03				
ФИ	ПМ	5,2±0,1*	4,3±0,1*	4,7±0,2*	4,2±0,1*	3,5±0,2*	2,7±0,1*	1,4±0,4*	2,1±0,1*				
	Ж	0,7±0,02*	0,8±0,02*	0,5±0,01*	0,4±0,02*	1,2±0,1*	0,7±0,03*	0,43±0,02*	0,65±0,02*				
	У	0,3±0,01*	0,06±0,001	0,1±0,02*	0,4±0,01*	0,8±0,01*	0,2±0,01*	0,2±0,01*	0,05±0,001*				
ФИФ	IM	-	-	-	-	-	-	-	-				
	Ж	0,14±0,01	0,09±0,02	0,18±0,03	0,12±0,01	0,21±0,04	0,15±0,01	0,31±0,01	0,16±0,02				
	У	0,06±0,002	0,02±0,001	0,09±0,002	0,03±0,001	0,01±0,001	0,03±0,002	0,05±0,003	0,08±0,002				
ФИДФ	ПМ	-	-	-	-	-	-	-	-				
	Ж	0,35±0,01*	0,27±0,02*	0,31±0,01*	0,39±0,02*	0,42±0,01*	0,32±0,02*	0,28±0,03	0,4±0,01*				
	У	0,03±0,001*	0,06±0,01*	0,08±0,01	0,04±0,03	0,01±0,001*	0,035±0,002*	0,08±0,002	0,05±0,002*				
ФИДФ	IM	-	-	-	-	-	-	-	-				
	Ж	0,22±0,02	0,25±0,01	0,11±0,02	0,09±0,001	0,25±0,02	0,23±0,04	0,16±0,01	0,15±0,02				
	У	0,02±0,002	0,01±0,001	0,03±0,002	0,02±0,001	0,01±0,001	0,012±0,003	0,02±0,001	0,01±0,001				
ФИДФ	ПМ	-	-	-	-	-	-	-	-				
	Ж	0,31±0,03*	0,41±0,05*	0,32±0,01*	0,24±0,02*	0,36±0,01*	0,28±0,02	0,31±0,04*	0,22±0,05*				
	У	0,01±0,001	0,05±0,003*	0,02±0,002	0,13±0,001*	0,03±0,001*	0,016±0,002	0,03±0,002	0,03±0,001*				

Примечание. Здесь и в таблице 2: М – мягкая экстракция, Ж – жесткая экстракция, У – ультражесткая экстракция;

I – здоровые женщины, II – больные с ГПЭ; * – различия в содержании слабо и прочносвязанных фосфонозитидов в цельной крови. I и II группы достоверны (p<0,05).

Таблица 2

Содержание фосфонозитидов в ткани эндометрия в зависимости от типа экстракции и состава среды инкубации (M±m)

Фосфонозитиды	Группы обследуемых	Изоотоническая среда				Гипотоническая среда			
		pH 7,35	pH 7,35 + Pi	pH 6,6	pH 6,6 + Pi	pH 7,35	pH 7,35 + Pi	pH 6,6	pH 6,6 + Pi
ФИ (НТЭ)	М	78,6±6,4	95,4±5,7	80,6±6,2	72,0±6,0	93,0±6,0	83,4±5,2	101,0±8,0	94,0±3,7
	Ж	14,3±3,7	22,5±5,2	16,3±5,0	14,7±4,2	21,6±4,3	19,0±4,0	13,8±5,3	24,3±4,9
	У	0,39±0,01	0,31±0,02	0,41±0,03	0,29±0,01	0,35±0,03	0,46±0,02	0,41±0,01	0,24±0,02
ФИ (ГТЭ)	М	152,3±8,4*	135,0±7,0	144,0±8,0*	150,0±5,0*	131,0±5,0*	162,0±9,0*	156,0±8,0*	149,0±7,0*
	Ж	28,7±3,8*	18,3±4,3	30,4±5,7*	19,5±2,8	24,5±3,8	14,6±3,2	9,5±2,1	12,6±1,9*
	У	1,1±0,4*	1,3±0,2*	1,9±0,4*	0,9±0,01*	1,4±0,3*	1,7±0,2*	2,6±0,5*	1,1±0,2*
ФИФ (НТЭ)	М	-	-	-	-	-	-	-	-
	Ж	5,2±0,2	4,8±0,1	4,4±0,3	5,5±0,1	5,3±0,2	4,1±0,1	3,7±0,3	5,8±0,2
	У	0,03±0,001	0,025±0,002	0,04±0,001	0,028±0,002	0,02±0,001	0,01±0,0006	0,06±0,002	0,09±0,001
ФИФ (ГТЭ)	М	-	-	-	-	-	-	-	-
	Ж	2,8±0,3*	2,2±0,2*	1,9±0,2*	2,6±0,2	2,1±0,3*	1,7±0,2*	1,3±0,2*	2,4±0,1
	У	0,02±0,001	0,09±0,001*	1,0±0,1*	0,06±0,003*	0,01±0,002	0,016±0,001	0,09±0,008	0,04±0,002*
ФИДФ (НТЭ)	М	-	-	-	-	-	-	-	-
	Ж	9,3±0,2	8,1±0,1	7,9±0,2	6,9±0,3	7,7±0,2	8,5±0,2	10,3±1,1	8,7±0,2
	У	0,9±0,01	1,4±0,1	1,3±0,3	1,1±0,2	1,5±0,3	1,3±0,2	0,91±0,001	1,1±0,3
ФИДФ (ГТЭ)	М	-	-	-	-	-	-	-	-
	Ж	4,5±0,3*	5,1±0,2*	4,2±0,3*	1,8±0,1*	3,4±0,1*	5,6±0,1*	6,0±0,2*	2,5±0,4*
У	0,06±0,003*	0,05±0,002*	0,08±0,04*	0,02±0,003*	0,08±0,002*	0,04±0,001*	0,03±0,003*	0,042±0,003*	

* - различия в содержании фосфонозитидов в нормальной ткани эндометрия (НТЭ) и гиперплазированной ткани эндометрия (ГТЭ) достоверны (p<0,05).

Таким образом, в цельной крови, ГТЭ количество фосфоинозитидов у больных с ГПЭ достоверно отличается от их содержания в НТЭ и в цельной крови у здоровых женщин. При этом были выделены слабо и прочносвязанные с белками различные фосфоинозитиды, количество которых находилось в прямой зависимости от тоничности среды, добавления фосфата и видов экстракций. В определенной мере наши данные подтверждают исследования других авторов [7], свидетельствующие о том, что в клетках крови, ткани существуют два пула фосфоинозитидов – пул подвижных фосфоинозитидов и значительный пул фосфоинозитидов, которые не экстрагируются обычными методами [4,5], а положение их равновесия между подвижными и связанными фосфоинозитидами регулируется составом среды инкубации. Эти особенности их изменений необходимо учитывать при исследованиях уровня фосфолипидов, фосфоинозитидов в различных биологических объектах для выяснении патогенеза заболевания, а также разработке диагностических критериев.

Список литературы.

1. Дамиров М.М., Слюсарь Н.Н. Роль фосфоинозитидов в регуляции пролиферативных процессов в организмах // Вестник Тверского государственного университета, серия Химия. 2022. № 2 (48). С. 125-135.
2. Hammond C.R.V., Burke J.E. Novel roles of phosphoinositides in signaling, lipid transport and disease. // *Curr Opin Cell Biol.* 2020; 63; 57-67. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2019.12.007>.
3. Boss U.E., Jm Y J. Phosphoinositide signaling. // *Annu Rev Plant Biol.* 2012; V. 63. P: 409-429. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042110-103840>.
4. Дамиров М.М. Гиперпластические процессы в матке: роль фосфоинозитидов в патогенезе, диагностике и оценке результатов лечения: автореф. дисс. ... д-ра мед. наук: СПб., 2020.
5. Слюсарь Н.Н. Динамика быстрых изменений фосфоинозитидов в эритроцитах крови, опухолевых и нормальных клетках мышечной линии C57BL и онкологических больных с использованием этих показателей для оценки функционального состояния мембран клеток // *Экспериментальная онкология.* 1992. Т. 14. № 6. С. 56-62.
6. Дамиров М.М., Кулаков В.И., Слюсарь Н.Н., Бакулева Л.П. Содержание фосфоинозитидов в крови как критерий диагностики и контроля за эффективностью терапии гиперпластических заболеваний эндометрия // *Акушерство и гинекология.* 1994. № 5. С. 31-35.
7. Слюсарь Н.Н. Изменение содержания прочносвязанных фосфоинозитидов в клетках крови, опухолевой ткани у мышечной линии

C57BL с карциномой Льюис и больных раком легкого // Экспериментальная онкология. 1993. Т. 15. № 2. С. 51-59.

8. Павлова Г.К. Набор химических реагентов для определения содержания белков в сыворотке крови по биуретовой реакции // Лабораторное дело. 1979. № 12. С. 750.

Об авторах:

СЛЮСАРЬ Николай Николаевич – доктор медицинских наук, профессор кафедры биохимии с курсом клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО «Тверской государственный медицинский университет» (170100, г. Тверь, ул. Советская, 4); e-mail: slusar2011@rambler.ru

ДАМИРОВ Михаил Михайлович – профессор, д.м.н., руководитель отделения острых гинекологических заболеваний ГБУЗ НИИ СП им. Н.В. Склифосовского ДЗМ (129090, г. Москва, Большая Сухаревская площадь, 3); e-mail: damirov@inbox.ru

БЕЛЯКОВА Майя Борисовна – к.б.н., доцент кафедры биохимии с курсом клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО «Тверской государственный медицинский университет» (170100, г. Тверь, ул. Советская, 4); e-mail: mayabe@yandex.ru

ЖИГУЛИНА Вероника Валентиновна – к.б.н., доцент кафедры биохимии с курсом клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО «Тверской государственный медицинский университет» (170100, г. Тверь, ул. Советская, 4); e-mail: jerlan-1991-2006@list.ru

CHANGES IN THE CONTENT OF TIGHTLY BOUND PHOSPHOINOSITIDES IN WHOLE BLOOD AND ENDOMETRIAL TISSUE IN PATIENTS WITH ENDOMETRIAL HYPERPLASTIC DISEASES

N.N. Sliusar¹, M.M. Damirov², M.B. Belyakova¹, V.V. Zhigulina¹

¹*Tver State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Tver*

²*State budgetary health care institution of Moscow "Scientific Research Institute of
Emergency Medicine named after. N.V. Sklifosovsky Department of Health
of Moscow ", Moscow*

Data on changes in the content of phosphoinositides in whole blood and endometrial tissue during incubation in media with different ionic composition and tonicity are presented. It was noted that the amount of protein-bound phosphoinositides in the whole blood of patients with endometrial hyperplastic processes significantly differs from their level in healthy people. A similar effect is observed when comparing the level of phosphoinositides, depending on isotonic and hypertonic environments, in the study of normal and

hyperplastic endometrial tissue. The use of extraction with acidified solvent mixtures allows for a more precise determination of protein-bound phosphoinositides, in contrast to classical thin layer chromatography methods. The purpose of the study: changes in the content of tightly bound phosphoinositides in whole blood and endometrial tissue in patients with endometrial hyperplastic diseases.

Keywords: *phosphoinositides, protein-bound phosphoinositides, endometrial hyperplasia, thin layer chromatography.*