

БИОХИМИЯ

УДК 616–006.6–008.9:547.953:616–018

ДИНАМИКА БЫСТРЫХ ИЗМЕНЕНИЙ СОДЕРЖАНИЯ ФОСФАТИДИЛИНОЗИТ-3,4,5-ТРИФОСФАТОВ В ЭРИТРОЦИТАХ КРОВИ ОПУХОЛЕВЫХ И НОРМАЛЬНЫХ КЛЕТОК У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЖЕЛУДКА

Н.Н. Слюсарь¹, И.К. Румянцева², О.В. Кочкуров¹,
Л.А. Дедова², Л.А. Трофимов²

¹Тверская государственная медицинская академия,

²Тверской областной клинический онкологический диспансер

Установлено, что при инкубации с хлоридом кальция эритроцитов, опухолевых и нормальных клеток происходят быстрые обратимые изменения фосфатидилинозит-3,4,5-трифосфатов в этих клетках. Динамика изменения фосфатидилинозит-3,4,5-трифосфатов и их амплитуда в эритроцитах онкобольных и доноров разная. Возможно использование показателей динамики этих компонентов в мембранах эритроцитов и опухолевых клетках для получения информации о молекулярных механизмах развития рака желудка.

Ключевые слова: эритроциты; рак; ткань; фосфатидилинозит-3,4,5-трифосфаты.

Введение. Неудовлетворительные результаты лечения злокачественных новообразований определяют необходимость поиска новых методов ранней диагностики этих заболеваний. В литературе имеются различные данные о содержании фосфолипидов, фосфоинозитидов в крови и ее компонентах у больных с различными видами опухолей [1; 2; 3]. Эти сведения носят противоречивый характер. В связи с тем, что липиды этой группы являются высоколабильными соединениями и уровень их содержания зависит от функционального состояния мембран клеток, которое в большинстве случаев не контролируется при экстракции липидов. Кроме того, однократно определяемый уровень фосфатидилинозит-3,4,5-трифосфатов (ФИТФ) отражает интенсивность процессов, идущих в биологических мембранах в конкретный промежуток времени. Он изменяется в ходе функционирования системы. Вследствие этого возникает необходимость многократного определения уровня этих фосфоинозитидов через короткие временные интервалы. Оно позволит исследовать быстрые изменения ФИТФ и получить сведения о состоянии мембран клеток.

Цель работы — изучение динамики быстрых изменений ФИТФ в

эритроцитах крови, опухолевых и нормальных клетках у больных раком желудка.

Материал и методика. Клинические исследования проведены у 39 онкологических больных (рак желудка, стадии T1N0M0, T2N0M0). Контролем служили 20 доноров. Исследовали динамику быстрых изменений ФИТФ в эритроцитах крови, опухолевой и нормальной ткани. Для этой цели из крови, стабилизированной 0,22% раствором трилона Б выделяли эритроциты. Взвесь эритроцитов четырехкратно отмывали в 155 мМ растворе NaCl. Одновременно выделяли участки опухолевой и нормальной тканей (послеоперационные препараты), которые гомогенизировали в 155 мМ растворе NaCl до получения однородной жидкой массы. Затем на взвеси эритроцитов, опухолевых и нормальных клеток воздействовали 50 мМ CaCl₂, (Ca). Выделение ФИТФ осуществляли с помощью метода проточной горизонтальной хроматографии [4]. На хроматограмме фракция ФИТФ имела Rf-0,61. Идентификацию исследуемой фракции фосфоинозитидов осуществляли с помощью свидетелей фосфоинозитидов, цветных тестов. Окончательная оценка чистоты фракции ФИТФ проводилась с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии. Для этого использовали разделительную колонку «Separon SGX» (Kova, Чехия), размерами 3,5×150 мм с эффективным диаметром 5 мк. Перед работой колонку тщательно промывали и насыщали системой растворителей гексан-изопропанол-вода (6:8:1), подаваемой насосом («LDC, Constrа Metric», модель 3, Creat Britain) с постоянной скоростью 1мл/мин. Регистрацию спектра проводили УФ-детектором с переменной длиной волны («Knaurer», FRG) при 208 нМ. В системе растворителей уровень ФИТФ достигал характерного пика со временем удержания 26 мин, сходного с пиком анализируемого параллельно стандарта ФИТФ («Sigma», USA). Применение этого метода позволило выделить фракцию ФИТФ без предварительной экстракции липидов. Количество ФИТФ определяли на денситометре («БИАН-170», СНГ) и рассчитывали в нМ фосфора ФИТФ на 1 мг белка. Концентрацию белка определяли биуретовым методом. Статистическая достоверность различий определялась с помощью критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Анализ полученных данных позволил установить, что при инкубации эритроцитов крови, опухолевых и нормальных клеток с Ca происходят быстрые обратимые изменения содержания ФИТФ, возникающие в течение 180 секунд в ответ на воздействие. Особенности этих изменений характеризуются следующими параметрами: временем появления максимальных и минимальных уровней ФИТФ в ответ на воздействие, временем, необходимым для стабилизации уровня ФИТФ и амплитудой колебаний их количества.

При воздействии Ca на эритроциты крови доноров и онкологических больных динамика быстрых изменений ФИТФ приобрела следующие особенности (табл. 1). Так, исходный уровень ФИТФ в эритроцитах крови онкологических больных не зависит от стадии заболевания и в среднем в

2,7 раза выше их значений у доноров. Максимальные значения ФИТФ в эритроцитах крови больных обнаружены на 90 секунде от начала воздействия, минимальные — на 30 секунде. К 180 секунде изменения ФИТФ в эритроцитах прекращаются и их уровень, возвращаясь к исходному, стабилизируется.

Таблица 1
Динамика быстрых изменений ФИТФ в эритроцитах крови при инкубации с Са ($M \pm m$)

Группа	Время, с						Амплитуда
	0	30	60	90	120	180	
Доноры	0,37± 0,01	0,4± 0,01*	0,24± 0,02**	0,35± 0,01	0,39± 0,01	0,38± 0,01	0,16± 0,01
Больные	1,1± 0,1	0,8± 0,02**	1,2± 0,2	1,8± 0,2*	1,4± 0,1	1,17± 0,12	1,0± 0,1

Примечание. Различия в содержании ФИТФ и амплитуды их колебаний в эритроцитах крови онкологических больных и доноров достоверны ($p < 0,05$). Здесь и в табл. 2 * — максимальное содержание ФИТФ, ** — минимальное содержание ФИТФ.

В эритроцитах крови доноров максимальные значения ФИТФ установлены на 30 секунде, минимальные — на 60 секунде. Амплитуда колебаний ФИТФ в эритроцитах крови больных раком желудка в среднем в 6,2 раза выше, чем у доноров.

Таблица 2
Динамика быстрых изменений ФИТФ в опухолевой и нормальной тканях при инкубации с Са ($M \pm m$)

Ткань	Время, с						Амплитуда
	0	30	60	90	120	180	
Нормальная	1,8± 0,2	2,7± 0,1*	2,2± 0,2	1,3± 0,2**	2,4± 0,1	2,0± 0,1	1,4± 0,1
Опухолевая	3,8± 0,1	4,2± 0,3	6,2± 0,2*	4,7± 0,1	3,4± 0,1**	4,0± 0,2	2,8± 0,2

Примечание. Различия в содержании ФИТФ и амплитуды их колебаний в опухолевой и нормальной тканях достоверны ($p < 0,05$).

При анализе данных о количестве ФИТФ в опухолевых и нормальных клетках при их инкубации с Са было также установлены быстрые изменения ФИТФ (табл. 2). Так, уровень содержания ФИТФ в опухолевых клетках на 60 секунде после воздействия дестабилизирующим фактором был максимальным, тогда как в нормальных клетках на 30 секунде. Минимальные значения ФИТФ в опухолевых клетках отмечены на 120

секунде, в нормальных — на 90 секунде.

Амплитуда колебаний ФИТФ в опухолевых клетках в среднем в 2 раза превышала их уровень в нормальных клетках. Вместе с тем, количество ФИТФ в опухолевых клетках во все исследуемые интервалы значительно превышало их уровень в нормальных клетках.

Заключение. Быстрые изменения ФИТФ отмечены как в эритроцитах крови, так и в исследуемых тканях. Характер этих изменений у больных раком желудка существенно отличается от такового у доноров. Следовательно, различия в параметрах быстрых изменений содержания ФИТФ в эритроцитах крови могут быть использованы при комплексной диагностике рака желудка. Можно предположить, что возрастание амплитуды колебаний ФИТФ в исследуемых биологических объектах у онкологических больных в отличие от доноров свидетельствуют о частичной потере способности ферментных систем клеток организма поддерживать постоянный уровень этих соединений, что, вероятно обуславливает их увеличение в эритроцитах крови больных. Это предположение подтверждается данными об увеличении этих липидов в опухоли, а также данными полученными из других источников [3; 4]. Одновременно с нарушениями гомеостаза ФИТФ, как указывают ряд авторов [5; 6; 7], значительная их часть может расходиться на образования вторичных мессенджеров инозитол-1,3,4-трифосфатов и инозитол-1,3,4,5-тетрафосфатов способных влиять на рост клеток и их малигнизацию. Следовательно, выявленные в этих условиях изменения количества ФИТФ и их амплитуды колебаний в эритроцитах онкологических больных могут способствовать нарушению функционирования клеток, в результате возможно ослабление их активации, тем самым снижается возможность влиять на неконтролируемый рост клеток. Изучение динамики быстрых изменений ФИТФ и других фосфолипидов в различных биологических объектах у больных раком может способствовать более эффективной диагностике и раскрытию роли фосфоинозитидов в онкогенезе.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Дамиров М.М.* Аденомиоз. М., 2004.
2. *Котрикадзе Н.Г., Джалишариани О.С., Царцидзе М.А.* Изменение перекисного окисления липидов, структурного состояния и содержания фосфолипидов в крови больного фибромой и раком тела матки // *Экспериментальная онкология.* 1989. Т. 11, № 5. С. 71–73.
3. *Слюсарь Н.Н.* Изменение содержания фосфатидинозитов в крови и ее компонентах у мышей и онкологических больных в процессе лазерного облучения крови // *Экспериментальная онкология.* 1991. Т. 13, № 1. С. 69–72.
4. *Слюсарь Н.Н.* Динамика быстрых изменений содержания фосфоинозитидов в эритроцитах крови, опухолевых и нормальных клеток мышей линии С57ВL и онкологических больных и использование этих показаний для оценки функционального состояния мембран клеток // *Экспериментальная*

онкология. 1992. Т. 14, № 6. С. 56–62.

5. Berridge M.J., Irvine R.F. Inositolphosphates and cell signaling // Nature. 1989. V. 341, № 6239. P. 197–205.

6. Kapeller R., Cantley L.C. Phosphatidylinositol-3-kinase // Bioassays. 1994. V. 16, № 8. P. 565–576.

7. Rebolleau C. Inositol metabolism during neuroblastoma B50 cell differentiation effect of differentiating agents on inositol uptake // Neurochem. 1990. V. 55, № 2. P. 641–650.

DYNAMICS OF QUICK CHANGES IN PHOSPHATIDYLINOSITE-3,4,5-TRYPHOSPHATES CONTENT IN BLOOD ERYTHROCYTES TUMOUR AND NORMAL CELLS OF PATIENTS WITH STOMACH CANCER

**N.N. Slusar¹, I.K. Rumyantseva², O.V. Kochkurov¹,
L.A. Dedova², L.A. Trofimov²**

¹Tver State Medical Academy,

²Tver Regional Clinical Oncologic Dispensary

It was established that addition of calcium chloride to erythrocytes, tumour and normal cells is followed by quick reversible changes in the content of phosphatidylinosite-3,4,5-triphosphates in these cells. The dynamics of change phosphatidylinosite-3,4,5-triphosphates and their amplitude in oncopatients differ from those in healthy persons. The dates prove the capability of rapid phosphatidylinosite-3,4,5-triphosphates alterations in blood erythrocytes and tumour membranes in attempt to obtain the information about the particularities of stomach cancer molecular mechanisms development.

Key words: erythrocytes; cancer; tissue; phosphatidylinosite-3,4,5-triphosphates.