

УДК 576.8+615.849616-006.04

## **ИЗМЕНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ 3-ФОСФОИНОЗИТИДОВ И МАРКЕРОВ АПОПТОЗА У БОЛЬНЫХ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ НОВООБРАЗОВАНИЯМИ ЯЗЫКА**

**Н.Н. Слюсарь<sup>1</sup>, С.Н. Лебедев<sup>1</sup>, А.И. Шматко<sup>1</sup>, А.Н. Панкрушина<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Тверская ГМА Минздрава России, Тверь

<sup>2</sup>Тверской государственной университет, Тверь

Статья посвящена исследованию 3-фосфоинозитидов и маркеров апоптоза в сыворотке крови у больных раком языка. Установлена тесная взаимосвязь количественного содержания 3-фосфоинозитидов и маркеров апоптоза в зависимости от стадии опухолевого процесса. Полученные данные могут служить дополнительными критериями в мониторинге злокачественных новообразований языка.

**Ключевые слова:** сыворотка крови, маркеры апоптоза, рак языка, 3-фосфоинозитиды.

**Введение.** Актуальным вопросом экспериментальной и клинической онкологии является механизм передачи сигналов от наружной плазматической мембраны к генетическому аппарату клеток. Известно, что фосфоинозитиды (ФИН) играют ключевую роль в сигнальной трансдукции и их уровень меняется при злокачественных новообразованиях (ЗН) (Слюсарь, 1992; Слюсарь и др., 2010). Не вызывает сомнений существование двух фосфоинозитидных путей (Ткачук, 1988; Красильников, 2000; Красильников, Шатская, 2001). Первый, канонический путь превращения ФИН, активация фосфатидилинозит-специфической фосфолипазой С, которая гидролизует фосфатидилинозит-4,5-дифосфаты с образованием двух вторичных мессенджеров: инозитол-1,4,5-трифосфаты и диацилглицерол. Второй, 3-фосфоинозитидный путь вовлекает протеин-тирозинкиназу, которая посредничает в привлечении к активации фосфатидилинозит-3-киназы с дальнейшим образованием 3-фосфоинозитидов: фосфатидилинозит-3-фосфаты (ФИФ), фосфатидилинозит-3,4-дифосфаты (ФИДФ) и фосфатидилинозит-3,4,5-трифосфаты (ФИТФ). 3-фосфоинозитиды не являются субстратами известной фосфолипазы С, а также компонентами пути превращения ФИН и могут сами действовать как внутриклеточные посредники. В свою очередь, фосфатидилинозит-3-киназа является одним из ключевых регуляторных белков, ответственных не только за уровень 3-фосфоинозитидов, но и за передачу апоптотического сигнала при раке и контролирующего выживаемость клеток (Красильников, Шатская, 2001). Это подтверждается данными об изменениях маркеров апоптоза

при различных ЗН (Spierings et al., 2003; Zhang, Zhang, 2008; Holoch, Griffin, 2009). Вместе с тем, отсутствуют данные о взаимосвязи количественных изменений 3-фосфоинозитидов и маркеров апоптоза у больных ЗН в зависимости от стадии опухолевого процесса.

Все вышеизложенное и определило цель настоящей работы – исследование 3-фосфоинозитидов и маркеров апоптоза в сыворотке крови больных ЗН языка при различной стадии заболевания.

**Методика.** Обследовано 32 пациента с первично выявленной карциномой языка до начала противоопухолевого лечения, госпитализированных в специализированные отделения Тверского областного клинического онкологического диспансера. В их число входили 20 мужчины и 12 женщин в возрасте 47-62 лет со ЗН языка (код по МКБ-10 С 02), с I, II, III и IV стадиями опухоли. Диагноз и стадия карциномы языка у всех больных были подтверждены данными инструментальных и морфологических исследований. Обследованные пациенты не имели признаков ИБС, сахарного диабета, носительства маркеров гепатита В, С, ВИЧ, аллергических, аутоиммунных, инфекционных заболеваний. Контрольную группу составили 15 практически здоровых лиц (без признаков аллергических, аутоиммунных, инфекционных и паразитарных заболеваний), проходивших диспансеризацию, в возрасте 25-37 лет.

Исследование содержания 3-фосфоинозитидов проводили с помощью усовершенствованного метода проточной горизонтальной хроматографии (Слюсарь, 1992), а также высокоэффективной жидкостной хроматографии (Withman et al., 1988; Слюсарь и др., 2010). Сочетание этих методов позволило выделить из сыворотки крови следующие 3-фосфоинозитиды – ФИФ, ФИДФ и ФИТФ. Результаты выражали в нмолях фосфора соответствующего фосфоинозита (ФИ) на 1 мг белка.

Исследование в сыворотке крови растворимых маркеров апоптоза – TNF-зависимого лиганда TRAIL, sCD30 и sCD40 – маркеров активации апоптоза, осуществляли посредством иммуноферментного анализа по общепринятым методикам (Koga et al., 2004; Macher-Goeppinger et al., 2009) с использованием коммерческих наборов (BCM Diagnostis, Великобритания, «Human sAPO-1/FAS ELISA», «Human TRAIL ELISA», «Human Caspase-1/ICE ELISA», «Human sCD30 ELISA», «Human sCD40 ELISA», Австрия) на автоматическом иммуноферментном анализаторе «Униплан» (Россия). Единицы измерений для лиганда TRAIL и sCD40 – pg/ml, для sCD30 – U/ml.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием критерия Стьюдента, различия считали достоверными при  $p < 0,05$ .

**Результаты и обсуждение.** Анализ полученных данных позволил установить, что содержание ФИФ, ФИДФ и ФИТФ в

сыворотке крови больных со ЗН языка статистически достоверно отличались от их уровня у здоровых лиц (табл. 1).

Т а б л и ц а 1

Содержание 3-фосфоинозитидов в сыворотке крови у больных карциномой языка и у здоровых лиц, в нмоль фосфора ФИ на 1 мг белка ( $M \pm m$ )

Группы обследованных	ФИФ	ФИДФ	ФИТФ
Здоровые лица, n=15	1,4±0,1	1,0±0,2	0,9±0,01
ЗН языка I стадия, n=8	0,9±0,01	0,7±0,02	1,2±0,2
ЗН языка II стадия, n=8	0,83±0,02	0,68±0,01	1,25±0,1
ЗН языка III стадия, n=8	0,65±0,01*	0,45±0,02*	1,45±0,2*
ЗН языка IV стадия, n=8	0,43±0,03*	0,37±0,01*	1,63±0,2*

Примечание. \* – достоверность различий ( $p < 0,05$ ) в сравнении с больными I стадией опухоли и со здоровыми лицами.

Вместе с тем, количество ФИФ, ФИДФ и ФИТФ в сыворотке крови больных со ЗН языка I стадии не отличалось от показателей больных при II стадии опухолевого процесса. Однако, уровни содержания ФИФ, ФИДФ при ЗН языка III и IV стадий были, соответственно, в 1,3 и 1,5 раза ниже их количества при I и II стадиях заболевания. Обращает на себя внимание факт, что показатели ФИТФ в сыворотке крови больных со ЗН языка III и IV стадий, в отличие от других значений ФИФ и ФИДФ, были, в среднем, в 1,3 раза выше их уровня, чем у больных с ЗН I и II стадий.

Обнаружена разная направленность изменений 3-фосфоинозитидов в зависимости от стадии заболевания. Так, ФИФ, ФИДФ в сыворотке крови больных ЗН языка имеют четкую тенденцию к снижению уровня от I к IV стадии, тогда как при исследовании ФИТФ обнаружен обратный эффект. Возможно, это связано с различной активностью фосфатидилинозит-3-киназы, учитывая тот факт, что активация фосфатидилинозит-3-киназы может быть критична для стимуляции клеточного роста.

Т а б л и ц а 2

Содержание сывороточных маркеров апоптоза у больных карциномой языка в зависимости от стадии заболевания и у здоровых лиц ( $M \pm m$ )

Группы обследованных	TRAIL, pg/ml	sCD30, U/ml	sCD40, pg/ml
Здоровые лица, n=15	98±3,7	25,1±3,5	30±2,8
ЗН языка I стадия, n=8	84,7±2,7	36,1±2,0	41,8±1,8
ЗН языка II стадия, n=8	80,8±2,9	36,9±2,1	43,0±3,2
ЗН языка III стадия, n=8	72,8±3,0*	40,4±2,1	47,3±2,5
ЗН языка IV стадия, n=8	69,4±2,3*	43,5±1,4*	49,2±1,9*

Примечание. \* – достоверность различий ( $p < 0,05$ ) в сравнении с больными I стадией опухоли и со здоровыми лицами.

При исследовании содержания маркеров апоптоза (лиганда TRAIL, sCD30, sCD40) в сыворотке крови онкологических больных в

зависимости от стадии карциномы языка, были получены результаты, изложенные в табл. 2.

Показатели содержания TRAIL, sCD30, sCD40 у больных карциномой языка отличались от их уровня у здоровых лиц. Содержание исследуемых маркеров у больных карциномой языка I стадии статистически не отличалось от их уровня при II стадии. Значения TRAIL, лиганда семейства TNF, индуцирующего апоптоз, при III и IV стадиях злокачественного процесса были, в среднем, в 1,2 раза ниже их количества, чем у больных при I и II стадиях заболевания. Содержание sCD30 и sCD40 при IV стадиями ЗН было значительно выше их уровня при I-III стадиях заболевания. Не обнаружено статистически значимых различий в содержании TRAIL у больных с ЗН языка I-II стадий, как и при исследовании sCD30, sCD40 при I-III стадиях. Показатели у больных карциномой языка III стадии незначительно отличались от их уровня у больных с IV стадией.

**Заключение.** Результаты проведенного исследования свидетельствуют о выраженных нарушениях 3-фосфоинозитидов в сыворотке крови больных ЗН языка в зависимости от стадии заболевания. Оценка уровня содержания ФИФ, ФИДФ и ФИТФ может быть использована в качестве дополнительного критерия в мониторинге лечения злокачественной опухоли. Вместе с тем, значения маркеров апоптоза (TRAIL, sCD30, sCD40) имеют более выраженный характер при поздних стадиях рака и не всегда коррелируют с уровнем 3-фосфоинозитидов, что ограничивает диагностические возможности. Полагаем, что определение комбинации 3-фосфоинозитидов и отдельных маркеров апоптоза позволит разработать новые дополнительные критерии в диагностике и лечении злокачественных новообразований языка на разных стадиях.

### **Список литературы**

- Красильников М.А.* 2000. Сигнальные пути, регулируемые фосфатидилинозит-3-киназой и их значение для роста, выживаемости и злокачественной трансформации клеток // Биохимия. № 1. С. 68-78.
- Красильников М.А., Шатская В.А.* 2001. Роль фосфатидилинозитального сигнального пути в развитии гормональной резистентности опухолевых клеток // Вопросы онкологии. № 2. С. 218-223.
- Слюсарь Н.Н.* 1992. Динамика быстрых изменений содержания фосфоинозитидов в эритроцитах крови, опухолевых и нормальных клетках мышей линии C57BL и онкологических больных и использование этих показателей для оценки функционального состояния мембран клеток // Экспериментальная онкология. № 6. С. 56-62.
- Слюсарь Н.Н., Румянцева И.К., Дедова Л.А., Трофимов Л.А.* 2010. Динамика быстрых изменений содержания фосфатидилинозит-3,4,5-трифосфатов в эритроцитах крови, опухолевых и нормальных клетках у больных раком желудка // Вестник ТвГУ. № 27. С. 24-28.

*Вестник ТвГУ. Серия "Биология и экология". 2015. № 1*

- Ткачук В.А. 1988. Фосфоинозитидный обмен и осцилляции ионов  $Ca^{2+}$  // Биохимия. № 1. С. 47-56.
- Holoch P.A., Griffin T.S. 2009. TNF-related apoptosis-inducing ligand (Trail): A new path to anti-cancer therapies // Eur. J. Pharmacol. V. 625 (1-3). P. 63-72.
- Koga Y., Matsuzaki A., Suminoe A. 2004. Neutrophil-derived TNF-related apoptosis-inducing ligand (Trail): a novel mechanism of antitumor effect by neutrophils // Cancer Research. V. 64. P. 1037-1043.
- Macher-Goeppinger S., Aulmann S., Tagscherer R.E. 2009. Prognostic value of tumor necrosis factor - related apoptosis-inducing ligand (Trail) and Trail receptors in renal cell cancer // Clin. Cancer Res. V.15. P. 650-659.
- Spierings D., Vries E., Timens W. 2003. Expression of Trail and Trail Death Receptors in Stage III non-small cell lung cancer tumors // Clin. Cancer Res. V.9. P. 3397-3405.
- Withman M., Dovones C.P., Reeler M. 1988. Type I phosphatidylinositol kinase mares a novel inositol phospholipid, phosphatidylinositol-3-phosphate // Nature. V. 332. № 6165. P. 644-646.
- Zhang Y., Zhang B. 2008. Trail Resistance of Breast cancer cells is associated with constitutive of death receptoris 4 ana 5 // Mol. Cancer Res. V.6. P. 1861-1871.

## **THE CHANGE IN THE CONTENT OF 3-PHOSPHOINOSITIDES AND OF THE MARKERS OF APOPTOSIS IN PATIENTS WITH MALIGNANT NEOPLASMS OF THE TONGUE**

**N.N. Slusar<sup>1</sup>, S.N. Lebedev<sup>1</sup>, A.I. Shmatko<sup>1</sup>, A.N. Pankrushina<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Tver State Medical Academy, Tver

<sup>2</sup>Tver State University, Tver

The article investigates the 3-phosphoinositides and apoptosis markers in the serum of patients with cancer of the tongue. The close relationships of the quantitative content of 3-phosphoinositides and markers of apoptosis depending on the stage of cancer is revealed. The data obtained can serve as and additional criterium to monitor the malignancies of the tongue.

**Keywords:** *blood serum, markers of apoptosis, cancer of the tongue, 3-phosphoinositides.*

*Об авторах:*

СЛЮСАРЬ Николай Николаевич – доктор медицинских наук, профессор кафедры биохимии с курсом клинической лабораторной диагностики, ГБОУ ВПО «Тверская ГМА Минздрава России», 170100, Тверь, ул. Советская д. 4, e-mail: slusar2011@rambler.ru

ЛЕБЕДЕВ Сергей Николаевич – кандидат медицинских наук, доцент кафедры хирургической стоматологии и реконструктивной

Вестник ТвГУ. Серия "Биология и экология". 2015. № 1

челюстно-лицевой хирургии, ГБОУ ВПО «Тверская ГМА Минздрава России», 170100, Тверь, ул. Советская д. 4, e-mail: lebedev\_s@tvergma.ru

ШМАТКО Андрей Иванович – аспирант кафедры биохимии с курсом клинической лабораторной диагностики, ГБОУ ВПО «Тверская ГМА Минздрава России», 170100, Тверь, ул. Советская д. 4, e-mail: abertolletti@rambler.ru

ПАНКРУШИНА Алла Николаевна – доктор биологических наук, профессор кафедры биологии, ФГБОУ ВПО «Тверской государственный университет», 170100, Тверь, ул. Желябова, д. 33, e-mail: alla.pankrushina@mail.ru

Слюсарь Н.Н. Изменение содержания 3-фосфоинозитидов и маркеров апоптоза у больных злокачественными новообразованиями языка / Н.Н. Слюсарь, С.Н. Лебедев, А.И. Шматко, А.Н. Панкрушина // Вестн. ТвГУ. Сер. Биология и экология. 2015. № 1. С. 57-62.