

КЛИНИКО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ:

УДК 001.5:616.153:612.112.94+612.111:616-006.6

© Коллектив авторов

ИЗМЕНЕНИЕ МИКРОВАЗКОСТИ МЕМБРАН ЛИМФОЦИТОВ И ЭРИТРОЦИТОВ КРОВИ У ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ

**И.А. ГОРОШИНСКАЯ, Л.Ю. ГОЛОТИНА, Е.И. ГОРЛО,
Т.А. РОВДА, Ю.Н. БОРДЮШКОВ**

Ростовский научно-исследовательский онкологический институт 344037
Ростов-на-Дону, 14 линия 63, РНИОИ. Тел. (863-2) 53-97-36.

Изучена относительная микровязкость мембран лимфоцитов и эритроцитов в зоне белок-липидных контактов и липидном бислое методом латеральной диффузии зонда пирена у больных раком желудка, мочевого пузыря и яичников в сравнении с показателями у практически здоровых людей. Обнаружено снижение текучести (т.е. увеличение микровязкости) мембран клеток крови у больных распространенным раком изученных локализаций. При раке яичников значительное снижение текучести наблюдалось только при асцитной форме заболевания. В наибольшей степени увеличивалась микровязкость лимфоцитов и, особенно, эритроцитов у практически инкурабельных больных. Обсуждается взаимосвязь изменения микровязкости с изменением других показателей, влияющих на структурные свойства мембран при злокачественном росте, и их функциональная роль.

Ключевые слова: текучесть мембран, пирен, рак яичников, желудка, мочевого пузыря.

ВВЕДЕНИЕ. Механизм возникновения и развития многих патологических состояний, в том числе и злокачественного роста, связан с нарушением структуры и свойств биологических мембран. Ключевая роль в регуляции всех процессов, происходящих в мембранах, принадлежит их текучести. Этот комплексный показатель отражает как структуру, так и диффузионные аспекты липидной составляющей мембран и легко реагирует на метаболические изменения и внешние воздействия [1]. Изменения текучести мембранных липидов описаны для многих типов опухолевых клеток, но физиологическая значимость этих изменений требует дальнейших исследований. Показано, что опухолевые клетки из плотных тканей (например, клетки гепатомы) отличаются от гомологичных нормальных клеток пониженной текучестью мембран, в то время как малигнизированные клетки крови могут обладать большей текучестью по сравнению со своими нормальными аналогами, например, при лейкемии [1,2,3]. Клетки лимфомы, в отличие от лейкемических, имеют сходную или слегка пониженную текучесть мембран по сравнению с нормальными лимфоцитами [1]. Все приведенные данные характеризуют микровязкость опухолевых клеток, исследования же немалигнизированных клеток крови при развитии в организме злокачественного

процесса крайне малочисленны. В то же время оценка структуры и свойств мембран лимфоцитов и эритроцитов крови крайне важна как для определения состояния пациентов, так и для выбора тактики и контроля эффективности лечения злокачественных новообразований.

В настоящей работе нами исследована относительная микровязкость липидного бислоя и зон белок-липидных контактов лимфоцитов и эритроцитов у больных раком яичников, желудка и мочевого пузыря в сравнении с данными показателями у группы лиц без онкологической патологии.

МЕТОДИКА. Исследование относительной микровязкости мембран клеток крови было проведено у 49 больных раком различных локализаций и 17 человек без онкопатологии (контрольная группа). Обследовано 14 больных раком желудка III стадии (9 мужчин и 5 женщин) в возрасте 44-69 лет, 13 больных раком мочевого пузыря, из которых у 5 была I стадия, многофокусное поражение и у 8 - III стадия (12 мужчин и 1 женщина), в возрасте 48-72 лет и 22 больные распространенным раком яичников в возрасте 39-65 лет. По клинической картине заболевания больные раком яичников были разделены на 3 группы: 7 - с безасцитной формой (I группа), 9 - с асцитной формой (II группа) и 6 женщин выделены в отдельную группу практически инкурабельных больных, получавших ранее многокурсовую системную химиотерапию без выраженного положительного эффекта (III группа). В эту группу вошли 2 больные с асцитной формой и 4 - с безасцитной формой рака яичников. Контрольная группа состояла из 12 женщин и 5 мужчин в возрасте от 30 до 67 лет (средний возраст 48 лет).

Лимфоциты и эритроциты выделяли из цельной гепаринизированной венозной крови на градиенте фиколл-верографин. Суспензию лимфоцитов разводили до концентрации 1×10^6 кл/мл, а суспензию эритроцитов - до оптической плотности 0,700 ед. в 0,5 см кювете при длине волны поглощения 650 нм.

Оценку относительной микровязкости мембран клеток крови осуществляли методом латеральной диффузии гидрофобного зонда пирена ($C_{16}H_{10}$). Определение микровязкости основано на образовании эксимеров (возбужденных димеров) пирена. Коэффициент эксимеризации пирена F_s/F_m , равный отношению интенсивности флюоресценции эксимеров (λ испускания 470 нм) и мономеров (λ испускания 395 нм), находится в обратной зависимости от относительной микровязкости. Микровязкость липидного бислоя лимфоцитарных и эритроцитарных мембран оценивали при длине волны возбуждения 334 нм, а микровязкость зон белок-липидных контактов при 286 нм [4]. Инкубацию суспензии клеток с пиреном (3 мкМ на 1 мл суспензии) проводили при 25°C в течение 1 мин при постоянном встряхивании на мешалке. Интенсивность флюоресценции димеров и мономеров пирена определяли в отдельных лимфоцитах и эритроцитах на люминесцентном микроскопе "ЛЮМАМ И-3". В каждом препарате измеряли флюоресценцию не менее чем в 10 клетках и находили среднее значение и дисперсию среднего.

Статистическую достоверность различий определяли по критерию t Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. В таблице представлены коэффициенты эксимеризации пирена, отражающие текучесть мембран лимфоцитов и эритроцитов в группе контроля и у онкологических больных с опухолями различной локализации и тяжестью процесса. Следует отметить, что как в контрольной группе, так и у онкологических больных не было выявлено зависимости изученных показателей от пола и возраста.

Как видно из таблицы, у больных раком желудка и мочевого пузыря имеет место снижение текучести (т. е. увеличение микровязкости) мембран лимфоцитов и эритроцитов по сравнению с контрольной группой. При раке желудка текучесть мембран лимфоцитов в зоне белок-липидных контактов снижена на 30 %, в липидном бислое - на 26 %, а при раке мочевого пузыря на 15 и 22 %, соответственно. Снижение текучести мембран эритроцитов как при раке желудка,

так и при раке мочевого пузыря составляет в зоне белок-липидных контактов 25 %, и в липидном бислое 30 %.

При обследовании больных раком яичников выявлены различия в изменении микровязкости у больных с асцитной и безасцитной формами заболевания. У больных с асцитной формой наблюдалось значительное снижение текучести мембран как лимфоцитов, так и эритроцитов. В лимфоцитах текучесть в зоне белок-липидных контактов была на 23 % и в липидном бислое на 22 % ниже, чем в контрольной группе, в эритроцитах снижение составляло 30 % и 26 %, соответственно. У больных с безасцитной формой снижение текучести мембран наблюдали лишь в зоне белок-липидных контактов лимфоцитов (на 19 %), в то время как в липидном бислое лимфоцитов и в эритроцитах достоверных изменений не выявлено. Наиболее значительное изменение микровязкости имело место у практически инкурабельных больных, выделенных нами в III группу. В лимфоцитах снижение текучести мембран составляло в зоне белок-липидных контактов 30 %, в липидном бислое 39 %, а в эритроцитах достигало 40 % и 43 %, соответственно.

Таблица Показатели микровязкости мембран лимфоцитов и эритроцитов у практически здоровых людей и онкологических больных

Группа	ЛИМФОЦИТЫ, F _э /F _м		ЭРИТРОЦИТЫ, F _э /F _м	
	белок-липидные контакты	липидный бислой	белок-липидные контакты	липидный бислой
Контроль (n=17)	2,921 ± 0,151	2,938 ± 0,147	2,755 ± 0,176	2,774 ± 0,207
Рак желудка (n=14)	2,059 ± 0,125 p < 0,001	2,181 ± 0,188 p < 0,01	2,062 ± 0,223 p < 0,05	1,920 ± 0,168 p < 0,01
Рак мочевого пузыря (n=13)	2,472 ± 0,114 p < 0,05	2,287 ± 0,141 p < 0,01	2,061 ± 0,116 p < 0,01	1,95 ± 0,123 p < 0,01
Рак яичников				
I группа (n=7)	2,379 ± 0,112 p < 0,05	2,606 ± 0,163 p > 0,05	3,242 ± 0,211 p > 0,05	2,768 ± 0,324 p > 0,05
II группа (n=9)	2,252 ± 0,073 p < 0,01	2,282 ± 0,136 p < 0,01	1,893 ± 0,217 p < 0,01	2,051 ± 0,261 p < 0,05
III группа (n=6)	2,050 ± 0,135 p < 0,01	1,80 ± 0,081 p < 0,001	1,641 ± 0,114 p < 0,01	1,578 ± 0,155 p < 0,01

Примечание: F_э/F_м - коэффициент эксимеризации пирена, n - число обследованных, p - достоверность различий по отношению к контролю.

Представленные данные свидетельствуют о том, что у большинства онкологических больных с опухолями различной локализации имеет место увеличение микровязкости мембран клеток крови. В зависимости от локализации опухоли и совокупности прогностических факторов, таких как стадия заболевания, гистоструктура, градация и т. д., степень изменения данного показателя может быть различной. В большинстве случаев изменение в эритроцитах были несколько более выраженными, чем в лимфоцитах.

Анализ имеющихся в литературе немногочисленных данных по исследованию микровязкости в эксперименте и в клинике также выявил различия в реакции лимфоцитов и эритроцитов на злокачественный рост. Тенденцию к снижению коэффициента эксимеризации пирена в мембранах эритроцитов наблюдали при раке желудка и раке кишечника [5]. Отсутствие достоверных изменений в данном случае возможно связано с недостаточным количеством обследованных больных (6 - с раком желудка и 5 - с раком кишечника). Повышение микровязкости липидного бислоя эритроцитарных мембран (с помощью зонда 5-доксилстеариновая кислота) установлено также у мышей линии СЗН, для которых характерно развитие спонтанных опухолей молочных желез [6]. В то же время, повышение текучести (снижение микровязкости) липидов лимфоцитов человека и

мышы показано с использованием зонда 1,6-дифенил-1,3,5-гексатриена при лейкозе [7] и с использованием зонда пирена при злокачественных лимфомах [8].

Микровязкость мембран является интегральным показателем, зависящим от нескольких компонентов: ненасыщенности липидов, содержания холестерина в мембране, фосфолипидного состава и количества белка, внедренного в мембрану. Важнейшим регулятором текучести мембран считают холестерин. Увеличением уровня холестерина в мембранах эритроцитов объясняют повышение относительной микровязкости липидного бислоя мембран эритроцитов при ишемической болезни сердца, атеросклерозе и инфаркте миокарда [9]. Увеличение молярного соотношения холестерин/фосфолипиды обнаружено как при экспериментальном канцерогенезе [6], так и у онкологических больных [10].

Одной из причин снижения текучести мембран клеток крови при злокачественном росте может являться и изменение состава сфинголипидов, существенно влияющих на структуру липидного бислоя мембран. Уменьшение молярного соотношения церамиды/ганглиозиды показано при опухолях яичников [11]. Поскольку ганглиозиды ингибируют противоопухолевый иммунитет, а церамиды, напротив, являются супрессорами опухолевого роста, снижение соотношения церамиды/ганглиозиды способствует развитию опухолевого процесса [3,11]. Важное значение в изменении структурно-функциональных свойств мембран при злокачественном росте придают также увеличению содержания сфингомиелина, способствующего наряду с холестерином увеличению микровязкости липидной фазы мембран [3].

Сложнее обстоит дело с сопоставлением полученных нами результатов с данными по изменению насыщенности липидов. Известно, что увеличение ненасыщенности липидов (повышение числа двойных связей) ведет к повышению текучести мембран. При этом особенно значимым является появление первой двойной связи в липидной молекуле, с увеличением степени ненасыщенности эффект прогрессивно снижается [1]. Однако, у больных раком молочной железы и легкого установлено повышение ненасыщенности липидов плазмы и эритроцитов крови и предположена прогностическая значимость степени ненасыщенности для больных распространенным раком [12], что трудно согласовать с увеличением микровязкости. В то же время характер прогноза имел разную зависимость от уровня двойных связей. При раке молочной железы более благоприятный прогноз отмечен при более высоком уровне двойных связей в липидах крови, тогда как у больных раком легкого более благоприятный прогноз был связан со сниженным уровнем двойных связей [13,14]. Не исключено, что при раках других локализаций, в частности, опухолях желудка, мочевого пузыря и яичников изменение ненасыщенности может иметь иную направленность.

Повышение микровязкости мембран клеток крови ухудшает их вязко-эластические и реологические свойства, затрудняет микроциркуляцию, снижает активность мембраносвязанных ферментов, тормозит такие функционально важные мембранные процессы как связывание рецепторов со вторичными мессенджерами и лигандами, выполнение лимфоцитами иммунных функций. Предполагается, что именно повышение ригидности липидного бислоя мембран является одной из причин значительного снижения активности многих ферментов при опухолевом росте [3]. Показано также, что лейкоциты с высоким соотношением холестерин/фосфолипиды и повышенной вследствие этого микровязкостью отличаются существенно сниженной иммунной реактивностью. Считают, что с этим может быть связано и снижение антиопухолевой активности лейкоцитов у онкологических больных [1]. Увеличение микровязкости иммунокомпетентных клеток крыс показано при рентгеновском облучении, вызывающем вторичное иммунодефицитное состояние организма [15].

Таким образом, обнаруженное увеличение микровязкости мембран лимфоцитов и эритроцитов крови больных распространенным раком разных локализаций в совокупности со взаимосвязанным с этим изменением структурных и

функциональных свойств мембран, по-видимому, является важным в механизме злокачественного роста. Зависимость степени изменения микровязкости от тяжести процесса позволяет предположить возможность использования данного показателя в качестве одного из прогностических критериев.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Shinitzky M.* (1984) *Biochim. Biophysica Acta.* 738, 251-261.
2. *Дятловицкая Э.В., Эйнисман Л.И., Голоцанов А.Н., Бурлакова Е.Б.* (1978) *Биофизика.* 23, 1103-1106.
3. *Дятловицкая Э.В.* (1995) *Биохимия.* 60, 843-850.
4. *Владимиров Ю.А., Добрецов Г.Е.* (1980) *Флюоресцентные зонды в исследовании биологических мембран.* М. Наука.
5. *Козлова Н.М., Слобожанина Е.И., Черницкий Е.А.* (1987) *Экспериментальная онкология.* 9, (1), 50-52.
6. *Терещенко И.П., Кашулина А.П., Александрова Л.М. и др.* (1985) *Экспериментальная онкология.* 7, (1), 27-30.
7. *Jiang Gui-Sen, Lin Ke-chun* (1984) *Acta Biochem. biophys. Sin.* 16, 521-527.
8. *Черницкий Е.А., Слобожанина Е.И.* (1989) *Спектральный люминесцентный анализ в медицине.*-Минск-Наука и техника.
9. *Милюткина Н.П., Ананян А.А., Лушпаева О.А. и др.* (1995) *Перекисное окисление липидов и активность антиоксидантных ферментов крови, структурно-функциональные свойства эритроцитов при атеросклерозе, ИБС и инфаркте миокарда.*-Ростов н/Д- Логос.
10. *Кальнова Н.Ю., Пальмина Н.П.* (1982). *Вопр. мед. химии.* 28, 71-75.
11. *Сомова О.Г., Андреасян Г.О., Дятловицкая Э.В.* (1997) *Вопр. мед. химии.* 43, 82-85.
12. *Корман Д.Б., Потапов С.Л., Шамаев В.И., Зеликович С.А.* (1995) *Известия АН. Серия биологическая.* 1, 19-24.
13. *Корман Д.Б., Потапов С.Л., Шамаев В.И. и др.* (1992) *Известия АН. Серия биологическая.* 2, 206-214.
14. *Корман Д.Б., Потапов С.Л., Пальмина Н.П., Бурлакова Е.Б.* (1992) *Известия АН. Серия биологическая.* 6, 931-936.
15. *Остроумова И.А., Рузыбакиев Р.М., Усманова А.С., Журбенко И.М.* Труды I Национальной конференции Российской ассоциации аллергологов и клинических иммунологов "Современные проблемы аллергологии, клинической иммунологии и иммунофармакологии". 28-31 января 1997 года. Москва, Россия.-М.-1997.- С.301.

Поступила 25. 03. 1998 г.

ALTERATION OF LYMPHOCYTE AND ERYTHROCYTE MEMBRANE MICROVISCOSITY IN THE BLOOD OF TUMOR PATIENTS

I.A.GOROSHINSKAYA, L.YU. GOLOTINA, E.I. GORLO,
T.A.ROVDA, YU.N.BORDUSHKOV

Rostov Research Oncology Institute 14 th line 63, Rostov-on-Don, 344037 Fax: (863 2) 53-83-94

Lymphocyte and erythrocyte membrane microviscosities of lipid-protein contact zones and lipid bilayer in blood of patients with gastric, urinary bladder and ovary cancers were investigated in comparison with healthy volunteers by means of coefficients of eximerization of fluorescent probe pyrene. The decrease of membrane fluidity (i.e. the increase of microviscosity) was revealed in blood cell membranes of patients with diffuse cancers of studied localizations. In the case of ovary cancer membrane fluidity decreased significantly only in patients with ascite form of the disease. The most pronounced increase of microviscosity was observed in lymphocytes and especially in erythrocytes of practically incurable patients. Interrelationship between microviscosity and other processes that influence on structural properties of membranes under malignancy and their functional role are discussed.

Key words: membrane fluidity, pyrene, ovary cancer, gastric cancer, urinary bladder cancer.