

ФОСФОЛИПИДНЫЙ СОСТАВ РАЗЛИЧНЫХ УЧАСТКОВ ПОРАЖЕННОГО ОРГАНА ПРИ РАКЕ ЛЕГКОГО

Б.С.ХЫШИКТУЕВ, Ю.Р.АГАПОВА, И.В.ЖИЛИН, В.Н.ИВАНОВ

Читинская государственная медицинская академия 672090, г. Чита, ул. Горького, 39а, ЧГМА, тел. (3022)323071, Эл. почта: bairk@hotmail.com

Изучен фосфолипидный спектр фрагментов легочной ткани в зависимости от наличия злокачественных клеток, расположенных на разном удалении от очага поражения у больных раком легкого. Во всех анализируемых образцах легочной ткани отмечено повышение уровня сфингомиелина и снижение содержания фосфатидилхолина. Для участков опухоли, где преобладало чередование полей злокачественного роста с обширными зонами некроза, было характерно накопление фракции фосфатидилинозитола при дефиците фосфатидилглицерола. На границе экстенсивного роста данная тенденция дополнялась максимальными величинами лизофосфатидилхолина и минимальными - лизофосфатидилэтаноламина, что, возможно, является следствием проявления инвазивных свойств злокачественными клетками.

Ключевые слова: легочная ткань, рак легкого, фосфолипиды

ВВЕДЕНИЕ. Фосфолипиды (ФЛ), являясь основными и важнейшими компонентами клеточных мембран, играют роль структурных элементов, участвуют в процессах биотрансформации гуморальных сигналов в роли вторичных посредников [1]; некоторые продукты их метаболизации способны обладать цитотоксичным эффектом, а так же служить предшественниками для высоко активных молекул - регуляторов [2], что отвечает свойствам нормальной ткани.

Многочисленные исследования в области онкологии выявили существенные отличия в обмене ФЛ при раковом перерождении [3,4]. Таковыми являются: накопление плазмалогенов, алкиацильных ФЛ, пониженная активность лизофосфолипазы Д, особенности в работе фосфолипазы А₂, отсутствие ферментов метилирования фосфатидилэтаноламина (ФЭ), значительные скорости биосинтетических реакций [1]. Наконец, значительно обостряет актуальность проблемы «ФЛ и рак» обнаружение селективной противоопухолевой активности некоторых ФЛ, их галоген- и тиопроизводных [5,6]. Следовательно, изучение ФЛ состава при опухолях носит перспективный характер, как в фундаментальном, так и в прикладном аспекте.

Цель работы заключалась в изучении фосфолипидного спектра фрагментов легочной ткани в зависимости от наличия злокачественных клеток, расположенных на разном удалении от очага поражения, у больных раком легкого (РЛ).

МЕТОДИКА. Изучался фосфолипидный профиль образцов легкого, взятых при оперативном лечении 22 больных РЛ. Возрастная амплитуда составляла от 29 до 68 лет, средний возраст - 56 лет. Среди пациентов у 16 (72,7%) лиц был диагностирован плоскоклеточный рак, у 4 (18,2%) больных - мелкоклеточный рак, и у 2 (9,1%) человек обнаружена аденокарцинома. Все образцы ткани были разделены на 3 группы:

1-ая группа - «опухолевый локус». В поле зрения чередование полей злокачественного роста с обширными зонами некроза.

2-ая группа - «на границе рак - неизменная ткань» - отличалась картиной множественной пенетрации раковых клеток в легочную паренхиму в присутствии легочных макрофагов. Данный срез соответствовал границе экстенсивного роста и максимального взаимодействия рак - неповрежденная ткань.

3-ья группа - ткань без признаков злокачественного роста, взятая по периферии удаленной части органа.

В качестве контрольных использовались образцы эмфиземы, ателектаза, пневмосклероза различной неопухолевой этиологии (ХНЗЛ, кисты, абсцессы, гипоплазии; $n=30$, возраст больных от 17 до 56 лет).

Соответствие фрагментов ткани определенной группе верифицировано гистологически.

Исследование проводилось в первые сутки после забора операционного материала. Кусочки легких быстро отмывали от крови охлажденным физиологическим раствором, фрагменты весом 1,5 - 2,0 г гомогенизировали в 0,05% трис-HCl-буфере ($pH=7,8$), затем гомогенат центрифугировали 10 мин при 1000g и полученную надосадочную жидкость использовали для дальнейших манипуляций.

Экстракцию липидов из супернатанта для исследования фосфолипидного спектра осуществляли методом J. Folch et al. (1957) [7].

Спектр фосфолипидов оценивали с помощью двумерной микротонкослойной хроматографии. Для определения количества каждой фракции применяли метод V.E. Vaskovsky et al. (1975) [8].

Статистическая обработка результатов производилась методом вариационной статистики с определением различий по критериям Стьюдента. Статистический обсчет выполнялся на компьютере IBM Pentium - 166 пакетом «Microsoft Excell professional for Windows 95».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Полученные результаты представлены в таблице. Анализ выявил следующие особенности во всех трех группах по сравнению с контролем: достоверно повышались уровни сфингомиелина в среднем в 1,5 раза ($p<0,05$), а цифры фосфатидилхолина (ФХ), напротив, уменьшались на 48,5% ($p<0,01$), 32,0% ($p<0,01$) и 25,4% ($p<0,01$) в 1, 2 и 3 группах соответственно. Статистически значимые отличия по обем формам лизофосфолипидов регистрировались в образцах легочной ткани, где преобладали явления распада; содержание лизофосфатидилхолина (ЛФХ) возрастало на 58,5% ($p<0,001$), а лизофосфатидилэтаноламина (ЛФЭА) на 166,7% ($p<0,001$), тогда как в других участках органа достоверно изменялись лишь величины ЛФХ (см. таблицу). Со стороны фосфоинозитола (ФИ) наблюдался рост данной фракции относительно контроля только у пациентов 1 группы в 1,8 раза ($p<0,05$). Уровень же фосфатидилглицерола (ФГ), который наряду с ФХ играет ведущую роль в образовании поверхностно активной выстилки альвеол, снижался как в центре, так и на границе злокачественного локуса, составляя 40,3% ($p<0,001$) и 60,3% ($p<0,001$) от контрольных цифр соответственно.

Наибольший интерес, на наш взгляд, представляют изменения фосфолипидного статуса, характерные для легкого, пораженного злокачественным ростом. Так, содержание ФИ в опухолевом локусе и на «границе» значительно превышало таковое в периферическом фрагменте и составило 278,8% ($p<0,01$) и 228,6% ($p<0,01$) соответственно. Аналогичные результаты получены Н.Н. Слосарем (1993), что позволило сформировать гипотезу усиленного включения ФИ в мембрану опухолевых клеток [9]. Так же существует мнение об ускоренном эндоцитозе и использовании ФИ (пул «подвижных» ФИ) для синтеза соответствующих производных, выступающих в роли запускающего звена пролиферации, вторичного мессенджера в кальций-зависимой внутриклеточной

сигнализации, опосредующей действие митогенов и факторов роста, а так же для активации фосфатидилсерин-зависимой протеинкиназы С [2,10-12]. Shoji-Kawaguchi et al. (1995) [13] считают, что ФИ может функционировать как супрессор ДНК-полимеразы эпсилон, что указывает на опосредованное влияние ФИ на формирование ракового генотипа. На взаимосвязь «ФИ - хроматин» указывает обнаружение Kohno T. et al. (1995) дефекта в хромосоме 2q33, ответственной за синтез фосфолипазы С, предположительно активного участника внутриклеточного каскада передачи сигналов в системе фосфоинозитов [14].

Достаточно значимыми были изменения со стороны ФХ, ЛФХ, ЛФЭА - системы взаимосвязанных метаболитов, каждый из которых - специфическое звено в гомеостазе клеток. Содержание ЛФХ на границе неповрежденной и малигнизированной ткани превысило на 27,9% ($p < 0.05$) показатели злокачественного локуса, что логично отвечает свойствам данного фосфолипида: сильный иммуностимулятор, ингибитор пролиферации раковых клеток, стимулятор дифференцировки, активатор макрофагов, индуктор секреции интерлейкина-1 [1].

Таблица. Фосфолипидный состав (%) различных участков легочной ткани при злокачественном поражении органов дыхания ($\bar{x} \pm m$).

Фосфолипид	Контроль (n=30)	I группа (n=22)	II группа (n=22)	III группа (n=22)
Лизофосфатидилхолин	$7,33 \pm 0,62$	$11,62 \pm 0,88^*$ $p_1 < 0,05$	$15,36 \pm 1,43^*$	$13,12 \pm 1,05^*$
Сфингомиелин	$16,49 \pm 0,84$	$27,98 \pm 4,45^*$	$23,33 \pm 3,23^*$	$24,76 \pm 3,24^*$
Фосфатидилхолин	$30,28 \pm 1,76$	$15,44 \pm 0,61^*$ $p_1 < 0,02$	$17,73 \pm 0,59^*$	$19,45 \pm 1,10^*$ $p_3 < 0,01$
Фосфатидилэтаноламин	$20,52 \pm 0,93$	$20,40 \pm 3,06$	$20,87 \pm 2,57$	$18,73 \pm 1,88$
Фосфатидилсерин	$8,54 \pm 0,87$	$6,38 \pm 1,50$	$7,54 \pm 2,29$	$7,39 \pm 1,04$
Фосфатидилинозитол	$4,77 \pm 0,90$	$8,56 \pm 1,27^*$	$7,02 \pm 1,30$ $p_2 < 0,01$	$3,07 \pm 0,55$ $p_3 < 0,001$
Фосфатидилглицерол	$9,97 \pm 1,04$	$4,02 \pm 0,64^*$	$6,01 \pm 0,52^*$ $p_2 < 0,01$	$10,03 \pm 1,20$ $p_3 < 0,001$
Лизофосфатидилэтаноламин	$2,10 \pm 0,36$	$5,60 \pm 0,71^*$ $p_1 < 0,001$	$2,14 \pm 0,47$	$3,45 \pm 1,14$

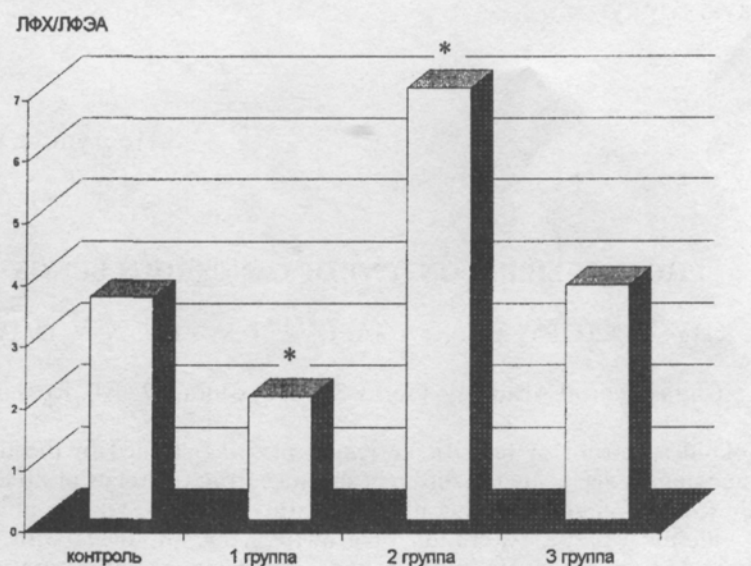
Примечание: * - достоверные отличия с контрольной группой; p_1 - достоверные отличия между I и II группами; p_2 - достоверные отличия между II и III группами; p_3 - достоверные отличия между I и III группами.

Минимальные значения ФХ обнаружены в центре опухоли и постепенно нарастали от границ экстенсивного роста (на 14,8%; $p < 0,02$) к периферическим участкам органа (на 26,0%; $p < 0,01$). Вероятной причиной низкого содержания ФХ в малигнизированной ткани может быть его усиленный гидролиз под действием фосфолипазы A_2 с целью высвобождения полиненасыщенных жирных кислот (арахидоновой и др.) - предшественников в синтезе простагландина (ЛГ) E_2 и ПГ F_2 раковыми клетками. Данные эйкозаноиды необходимы растущей опухоли, так как обладают свойством ингибирования цитотоксичности макрофагов, повышают концентрацию орнитиндекарбоксилазы, что значительно ускоряет пролиферацию [9]. Это предположение дает альтернативное объяснение накоплению фракций ЛФХ и ЛФЭА в пораженном раком легком, где названные метаболиты выступают в роли продуктов деградации ФЛ в малигнизированной ткани. Представляет интерес соотношение величин лизоформ ФЛ в различных участках органа (см. рис.). Если значение коэффициента ЛФХ/ЛФЭА в контроле и 3 группе достоверно между собой не отличались, то в центре и на границе опухолевой и неповрежденной ткани они имели разную направленность: в первом случае - уменьшались в 1,7 раза ($p < 0,05$), а во втором - увеличивались в 2,1 раза ($p < 0,001$) относительно контроля.

В периферической части легкого, где гистологически раковые клетки не верифицировались, содержание ФГ находилось в пределах контрольных цифр, а по мере приближения очага поражения (2 группа) его значения снижались на 40,1% ($p < 0,01$).

Со стороны фракций сфингомиелина (СМ), ФЭА и ФС достоверных отличий между тремя исследуемыми группами не наблюдалось.

Таким образом, можно сформулировать следующие особенности фосфолипидного состава ткани легкого, пораженного злокачественным процессом: на уровне целого органа происходит усиление продукции СМ при дефиците ФХ, что вероятно, обусловлено более интенсивным использованием пальмитата в синтезе первого фосфолипида, тогда как образование дипальмитоилфосфатидилхолина - одного из преобладающих фосфолипидов легочной ткани, замедляется, что показано в работе [15]; для центральных участков опухоли характерным является накопление ФИ и снижение уровня ФГ, подобные тенденции регистрируются и на границе «рак - неповрежденная ткань», однако, в этих образцах ткани наблюдается совершенно иной баланс в содержании лизофосфолипидов - максимальные величины характерны для ЛФХ, а минимальные - для ЛФЭА. На наш взгляд, именно это соотношение может служить биохимическим критерием местной инвазии злокачественных клеток.



* - достоверные различия по сравнению с контролем

Рисунок

Величины коэффициента лизофосфатидилхолин (ЛФХ)/лизофосфатидилэтаноламин (ЛФЭА) в различных участках легочной ткани при раке легкого.

Полученные результаты являются важными с точки зрения установления интимных механизмов развития сдвигов в обмене этого класса соединений, возникающих в процессе генеза рака легкого.

ЛИТЕРАТУРА

1. Саблина М.А., Ушакова И.П., Серебренникова Г.А. (1993) Хим. - фарм. - журн. 6, 3-13.
2. Слюсарь Н.Н. (1993) Эксперим. онкол. 2, 51-59.

3. Дятловицкая Э.В., Бергельсон Л. Д. (1982) Вестник АМН СССР 3, 42-47
4. Дятловицкая Э.В. (1998) Биоорг. хим. 24, 723-730
5. Ahmad I., Filep J.J., Frankim J.C. et al. (1997) Cancer Res. 57, 1915-1921.
6. Winkelmann M., Ebeling K., Strohmeyer G. Et al. (1992) J. Cancer. Res. Clin. Oncol. 118, 6, 405-407.
7. Folch J., Less M., Sloane-Stanley A.G.H. (1957) J. Biol. Chem. 226, 497-509.
8. Vaskovsky V.E., Kostetsky E.Y., Vasendin I.M. (1975) J. Chromatog. 114, 121-141.
9. Слюсарь Н.Н. (1993) Роль фосфоинозитидов и их метаболитов в онкогенезе: Авто-реф. дис....док. мед. наук.- С-Пб, 30 С.
10. Хышиктыев В.С., Хышиктыева Н.А., Иванов В.Н., Даренская С.Д. (1993) Вопр. онкол. 39, 7-12, 288-291.
11. Auger K.R., Cantley L.C. (1991) Cancer Cells. 3, 7, 263-270.
12. Seeward M.J., Olsen R.A., Seghal I. et al. (1990) Cancer Res. 50, 15, 4458-4463.
13. Shoji-Kawaguchi M., Izuta S., Tamiya-Koizumi K. et al. (1995) J. Biochem (Tokyo) 117(5), 1095-1099.
14. Kohno T., Otsuka T., Takano H. et al. (1995) Hum. Mol. Genet. 4, 667-674.
15. Хышиктыев Б. С. (1995) Роль нарушений метаболизма липидов в патогенезе и диагностике заболеваний системы органов дыхания: Автореф. дис....док. мед. наук.- Иркутск.

Поступила 9.12.98.

PHOSPHOLIPID CONTENT OF CANCEROUS LUNGS

B. S. KHYSHIKTUEV, YU. R. AGAPOVA, I. V. ZHILIN, V. N. IVANOV

Chita Medical Academy, Gorky St., 39a, Chita, 672090, Russia.

Phospholipid spectrum of lung tissue fragments was studied in the dependence on the presence of malignant cells located at different distance from the focus of affection. Elevation of sphingomyelin (SM) level and lowering of phosphatidylcholine (PC) was noted in all analyzed patterns in pulmonary tissue. Alteration of growth malignant fields with extensive necrosis zones predominated in the same samples. The accumulation of phosphatidylinositol (PI) fraction and phosphatidylglycerol (PGL) deficiency was found. A similar tendency was supplemented with lysophosphatidylcholine (LPC) maximum on line of the extensive growth. It might be the result of invasive characteristic manifestation by tumor cells.

Key words: lung tissue, lung cancer, phospholipids.