



УДК 616.006.6:577.115

© 2010

С. В. Хижняк, Л. І. Степанова, А. Г. Кудрявцева, В. І. Демешок

Стан ліпідної компоненти клітинних мембран колоректальної карциноми

(Представлено академіком НАН України Д. М. Гродзинським)

Отримані результати, що характеризують стан ліпідної компоненти мембран мікросом колоректальної аденокарциноми людини, свідчать про зміни у кількісному вмісті мембранних фосфоліпідів та холестеролу внаслідок пухлинного росту, які можуть обумовлювати особливості структурно-функціональних характеристик мембран клітин пухлин.

Відомо, що рак є наслідком стійкого порушення механізмів контролю клітинної проліферації і апоптозу [1, 2]. Нагромадження множинних мутацій генів, які контролюють клітинне відтворення, призводить до трансформації проліферувальних стовбурових клітин. Спостерігається зляксісне переродження в тканинах, в яких відбувається постійна заміна диференційованих клітин, що не діляться, шляхом диференціації стовбурових клітин. Найчастіше зустрічаються карциноми — це зляксісні новоутворення епітеліальних клітин; зокрема, ті, що походять із залозистого епітелію або набувають залозоподібної клітинної морфології — аденокарциноми (АК) [3].

Розвиток зляксісного процесу характеризується зміною складу та структури глікозаміногліканів і протеогліканів позаклітинного матриксу [3], активацією протеаз [4], порушенням міжклітинної адгезії та взаємодії клітин з компонентами позаклітинного матриксу [5]. Це призводить до тканинної дезінтеграції, зростання клітинної рухливості та забезпечення інвазивності. Плазматична мембрана клітин пухлин здійснює взаємозв'язок між позаклітинними й внутрішньоклітинними процесами, що супроводжується реорганізацією цитоскелета та функціональною модифікацією множинних сигнальних шляхів у трансформованих клітинах.

Зміни фізико-хімічних властивостей клітин пухлин є, головним чином, результатом біохімічних перебудов пухлинної тканини. Ступінь фізико-хімічної анаплазії відповідає ступеню дедиференціювання та швидкості росту. Пухлини розглядаються як утворення, що

безперервно прогресують через якісно відмінні стадії, останні характеризуються набором певних ознак, а терміни проходження цих стадій можуть значно варіювати. При цьому, важливого значення може набувати фізико-хімічний стан клітинних мембран, який забезпечує реалізацію їх функціональної активності. Метою роботи авторів даного повідомлення було дослідження ліпідного та фосфоліпідного стану клітинних мембран колоректальної карциноми товстої кишки людини при різних клінічних стадіях.

Матеріали та методи досліджень. У дослідях використано хірургічно видалені зразки пухлин — АК різних відділів товстої кишки (висхідного, поперечно-ободового, низхідного, сигмоподібного та прямої кишки) людини. На сьогодні рак товстої кишки (різних відділів) трактується сумісно як колоректальний рак.

Зразки хірургічного матеріалу, згідно з TNM та гістопатологічною класифікацією ВООЗ [6], належали до I–IV клінічних стадій захворювання, а з урахуванням ступеня диференціювання — до переважно помірно- й низькодиференційованих (G2–G3) пухлин. Хірургічний матеріал було надано співробітниками Інституту раку МОЗ України (Київ) в рамках взаємного договору про співробітництво. В процесі виконання роботи передбачалися заходи з дотримання морально-етичних норм відповідно до конвенції Ради Європи про права людини і біомедицини.

Для біохімічних досліджень використовували зразки первинних пухлин. Контролем слугували прилеглі до цієї пухлини зразки макроскопічно незміненої слизової умовно нормальної тканини (УНТ). Мембранні препарати (мікросомальну фракцію) отримували методом диференційного центрифугування гомогенних фракцій клітин пухлин та слизової УНТ. Чистоту препаратів контролювали за активністю маркерних ферментів плазматичної мембрани — 5'-нуклеотидази та Na^+, K^+ -АТФ-ази.

Екстракцію ліпідів проводили методом Фолча з невеликими модифікаціями. Фосфоліпиди (ФЛ) розділяли методом тонкошарової хроматографії. Кількісний вміст окремих фракцій ФЛ визначали методом Брокгауза [7], кількість загального холестеролу (ХС) — методом Ілька [8]. Мікров'язкості ліпідної компоненти мембранних препаратів досліджували з використанням методу незалежної оцінки в'язкості анулярних ліпідів та загальної ліпідної фази, згідно з публікацією [9]. Метод передбачає існування залежності ступеня ексимеризації вбудованого в ліпідну фазу мембрани флуоресцентного зонду ($N = F_{\text{ек}}/F_{\text{м}}$, де $F_{\text{ек}}$ й $F_{\text{м}}$ — інтенсивність флуоресценції ексімерів й мономерів) від в'язкості його оточення. Експериментальні дані обробляли за загальноприйнятими методами статистики.

Результати та їх обговорення. Ліпідний склад плазматичних мембран обумовлює життєздатність клітини, транспорт метаболітів та іонів, сприйняття сигналів та їх передачу до клітини, а також взаємодію з міжклітинним матриксом та іншими клітинами [10]. Один з головних факторів, який визначає структурну організацію та функціональний стан клітинних мембран, — їх фосфоліпідний склад та вміст ХС. Встановлено, що рівень ХС у мембранних препаратах АК знижується в середньому на 25%, у порівнянні зі слизовою УНТ, на всіх клінічних стадіях (табл. 1). Зменшення вмісту ХС у мембрані може призводити до зміни фізико-хімічних властивостей бішару: порушення кооперативних взаємодій жирних кислот ФЛ, дестабілізації бішару, що впливає на в'язкість мембран та збільшення її проникнення тощо [11].

Результати проведених досліджень свідчать, що вміст загальних ліпідів у мембранних препаратах пухлин достовірно зменшується на II й III стадіях у середньому на 30 й 16% відповідно, в порівнянні зі слизовою УНТ (див. табл. 1). Виявлене зниження вмісту загальних ліпідів важко пояснити однозначно, оскільки рівень ХС в умовах досліду є зниженим

відносно слизової УНТ, а вміст загальних ФЛ незначно зростає на I й II стадіях на 13 й 15% відповідно (див. табл. 1). Можливо, зменшення вмісту загальних ліпідів пов'язано зі зміною співвідношення гангліозидів і керамідів у пухлинних мембранах. Як відомо, гангліозиди є імуносупресорами та сприяють росту пухлини, а кераміди, навпаки, є супресорами пухлинного росту, ініціюють апоптоз і нагромаджуються внаслідок розщеплення сфінгом'єліну (СФМ) [12].

Відзначимо, що ФЛ властиві важливі біорегуляторні функції: контроль проліферації і апоптозу, регуляція трансмембранного сигналу тощо [13]. При онкотрансформації виявлено значні відмінності в обміні ФЛ, а саме: нагромадження плазмалогенів, алкіацильних ФЛ, зниження активності лізофосфоліпази Д тощо [14].

Аналіз вмісту окремих фосфоліпідних фракцій у досліджуваних мембранних препаратах слизової УНТ та колоректальної АК свідчить, що вони містять основні фракції ФЛ: фосфатидилхолін (ФХ), фосфатидилетаноламін (ФЕА), СФМ, фосфатидилсерин (ФС), фосфатидилінозитол (ФІ). Найбільший вміст спостерігається в мембранних препаратах ФХ й ФЕА (табл. 2). За умов розвитку захворювання (ріст пухлини, поява метастазів) вміст основних ФЛ (ФХ й ФЕА) дещо знижується і в мембранних препаратах IV стадії становить у середньому 84% відносно слизової УНТ. Ймовірно, причиною зниження вмісту ФХ може бути його гідроліз під дією фосфоліпази А₂ та вивільнення поліненасичених жирних кислот (арахідонової тощо) — попередників у синтезі простагландин А₂ й F₂ раковими клітинами. Ці речовини необхідні при рості пухлини, оскільки володіють властивістю інгібування цитотоксичності макрофагів, збільшують концентрацію орнитин-декарбоксілази, що значно підвищує проліферацію [14]. Крім того, зростає вміст лізоформ (ЛФ) ФХ й ФЕА в середньому в 2,6 раза (див. табл. 2), які є продуктами деградації цих ФЛ.

За умов росту пухлини та наявності метастазів зростає вміст СФМ на 12% на II стадії, на 17% на III стадії та на 10% на IV стадії (див. табл. 2). Відомо, що злоякісний ріст характеризується зростанням продукції СФМ при дефіциті ФХ. Це зумовлено більш інтенсивним використанням пальмітинової кислоти в синтезі СФМ [14]. Слід зауважити, що зростання рівня СФМ та його перерозподіл у різних клітинних мембранах залежить від ступеня злоякісності пухлини: у низькодиференційованих клітинах цей перерозподіл спостерігається більшою мірою, ніж у високодиференційованих клітинах з низьким ступенем злоякісної пухлини [12].

У досліджуваних мембранних препаратах збільшується і вміст ФС: на I стадії на 14%, II й III на 26%, на IV стадії на 28%, у порівнянні зі слизовою УНТ. Рівень ФІ за умов злоякісного росту зростає в середньому на 19% відносно слизової УНТ (див. табл. 2), що є характерним, згідно з гіпотезою підсиленого включення ФІ у мембрану пухлинних клітин [14]. Про опосередкований вплив ФІ при формуванні ракового генотипу свідчить виявлений дефект

Таблиця 1. Вміст загальних ліпідів, холестеролу та фосфоліпідів (мкг/мг білка) в мембранних препаратах слизової умовно нормальної тканини та аденокарциноми товстої кишки людини ($M \pm m$)

| Клінічна стадія | Загальні ліпіди | | ХС | | Загальні ФЛ | |
|-----------------|-----------------|---------------|------------|-------------|--------------|--------------|
| | УНТ | АК | УНТ | АК | УНТ | АК |
| I ($n = 4$) | Не визн. | Не визн. | 40,1 ± 2,0 | 29,6* ± 1,8 | 319,9 ± 10,0 | 366,6* ± 9,1 |
| II ($n = 10$) | 591,4 ± 13,0 | 455,0* ± 12,0 | 38,1 ± 2,2 | 28,4* ± 2,3 | 303,1 ± 11,0 | 341,3* ± 9,5 |
| III ($n = 9$) | 532,0 ± 11,8 | 459,2* ± 10,9 | 42,0 ± 1,8 | 32,8* ± 1,9 | 320,4 ± 9,0 | 342,0 ± 10,0 |
| IV ($n = 5$) | 583,1 ± 11,5 | 608,0 ± 14,3 | 42,8 ± 2,1 | 33,4* ± 1,7 | 382,2 ± 8,5 | 366,4 ± 9,0 |

*Вірогідність різниць у порівнянні з відповідною УНТ, $p \leq 0,05$.

Таблиця 2. Вміст індивідуальних фосфоліпідів у мембранних препаратах слизової умовно нормальної тканини та аденокарциноми товстої кишки людини ($M \pm m$)

| ФЛ, мкг/мг білка | I стадія (n = 4) | | II стадія (n = 6) | | III стадія (n = 7) | | IV стадія (n = 5) | |
|---------------------|------------------|--------------|-------------------|-------------|--------------------|-------------|-------------------|--------------|
| | УНТ | АК | УНТ | АК | УНТ | АК | УНТ | АК |
| ФХ | 127,3 ± 8,4 | 141,9 ± 10,1 | 113,7 ± 3,8 | 119,5 ± 6,8 | 117,6 ± 4,3 | 118,0 ± 3,2 | 130,0 ± 10,0 | 108,8* ± 8,0 |
| ФЕА | 101,7 ± 7,0 | 119,9 ± 8,3 | 97,8 ± 4,1 | 100,0 ± 3,1 | 95,5 ± 5,8 | 89,9 ± 4,2 | 112,2 ± 5,9 | 94,2* ± 4,7 |
| СФМ | 40,6 ± 1,2 | 43,3 ± 3,1 | 40,3 ± 2,5 | 50,9* ± 4,2 | 50,0 ± 6,0 | 62,2* ± 5,0 | 64,5 ± 2,3 | 67,8 ± 2,5 |
| ФС | 28,2 ± 1,3 | 36,7* ± 5,6 | 33,3 ± 3,7 | 47,4* ± 3,6 | 33,0 ± 3,2 | 44,5* ± 6,4 | 47,6 ± 3,1 | 58,3* ± 3,0 |
| ФІ | 21,4 ± 1,6 | 22,0 ± 2,1 | 18,2 ± 2,0 | 23,2* ± 1,2 | 24,0 ± 1,2 | 27,4 ± 2,0 | 25,5 ± 1,8 | 30,0* ± 2,0 |
| ЛФ | 0,3 ± 0,1 | 0,7 ± 0,2 | Не визн. | 0,3 ± 0,1 | 0,3 ± 0,1 | Не визн. | 1,4 ± 0,3 | 3,7* ± 0,2 |

*Вірогідність різниць у порівнянні з відповідною УНТ, $p \leq 0,05$.

у хромосомі 2q33, яка відповідає за синтез фосфоліпази С, ймовірного активного учасника внутрішньоклітинного каскаду передачі сигналів у системі фосфоінозитолів [14].

Отже, отримані результати свідчать, що, незважаючи на незначні зміни у вмісті загальних ліпідів та ФЛ, спостерігається перерозподіл у вмісті окремих фосфоліпідних фракцій мембран мікосом пухлинних клітин. Ці зміни пов'язані зі стадіями пухлинного росту, що може зумовлювати особливості функціонування пухлинних клітин. Свідченням цього є зниження вмісту ФХ й ФЕА водночас зі зростанням ФС й СФМ, що вказує на порушення регуляторного взаємозв'язку між окисними реакціями в мембранних ліпідах, складом ФЛ та функціональним станом мікосомальної мембрани.

Інтегральною величиною структурної впорядкованості ліпідної компоненти мембран пухлин є мікров'язкість, яка залежить від багатьох чинників, у тому числі ФЛ складу або вмісту ХС, який впорядковує структуру мембрани [15]. Мікров'язкість мембранних ліпідів оцінювали виходячи з первинних спектрів флуоресценції вбудованого в ліпідну фазу мембрани флуоресцентного зонду пірену, визначаючи величину ступеня ексімеризації пірену як в області анулярних ліпідів (N₂₈₀), так і в загальній ліпідній фазі (N₃₃₅). Достовірне зростання даних величин спостерігається тільки на III та IV клінічних стадіях, а саме для N₂₈₀ на 26% та N₃₃₅ на 20% у мембранах АК відносно відповідної парної УНТ. Отримані результати вказують на зменшення мікров'язкості ліпідів мембран при рості пухлин.

Структурна впорядкованість ліпідної компоненти пухлинних мембран змінюється з розвитком захворювання (ріст пухлини, поява метастазів), тоді як на початкових стадіях ці зміни незначні. Це свідчить про ймовірність структурної модифікації ліпідних мембран за рахунок змін метаболічних процесів злоякісного росту (ПОЛ в умовах гіпоксії, зміни ліпідного обміну та ліпідного складу мембран тощо). Проте ці зміни суворо скоординовані. Розлад функціонування регуляторних механізмів може спричинити загибель клітин. У той самий час встановлення нової системи взаємозв'язку може забезпечити життєздатність клітин, але змінити її чутливість до регуляції з боку організму, що і спостерігається у мембранах пухлинних клітин.

1. Hanahan D., Weinberg R. A. The hallmarks of cancer // Cell. – 2000. – **100**, No 1. – P. 57–70.
2. Skandalis S. S., Theocharis A. D., Theocharis D. A. et al. Matrix proteoglycans are markedly affected in advanced laryngeal squamous cell carcinoma // Biochim. Biophys. Acta. – 2004. – **1689**, No 2. – P. 152–161.
3. Копни Б. П. Мишени действия онкогенов и опухолевых супрессоров: ключ к пониманию базовых механизмов канцерогенеза // Биохимия. – 2000. – **65**, № 1. – С. 5–33.
4. Christopoulos T. A., Papageorgakopoulou N., Theocharis D. A. et al. Diagnostic and classification value of metalloproteinases in squamous human laryngeal carcinoma // Int. J. Oncol. – 2004. – **25**, No 2. – P. 481–485.
5. Behrens J., Frixen U., Schipper J. et al. Cell adhesion in invasion and metastasis // Semin. Cell Biol. – 1992. – **3**, No 3. – P. 169–178.
6. TNM классификация злокачественных опухолей. – 5-е изд., пер. с англ. под ред. проф. Н. Н. Блинова. – Санкт-Петербург: ЭСКУЛАП, 1998. – 190 с.
7. Brockhuysse R. M. Phospholipids in tissues of the eeje. 1. Isolation characterization and quantitative analysis by dimensional thin-layer chromatography of diacyd and vinyl ether phospholipids // Biochim. Biophys. Acta. – 1968. – **152**, No 2. – P. 307–315.
8. Практикум з біологічної хімії / За ред. О. Я. Склярєва. – Київ: Здоров'я, 2002. – С. 127–129.
9. Добрецов Г. Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеидов. – Москва: Наука, 1989. – 277 с.
10. Гула Н. М., Хмель Т. О., Клімашевський В. М. Вплив N-стеароїлетаноламіну на ліпідний склад метастазів та умовно нормальної тканини легенів у мишей з карциномою Льюїс // Укр. біохім. журн. – 2006. – **78**, № 2. – С. 97–105.

11. Колосийцева И. К. Регуляция обмена холестерина при повреждении организма ионизирующей радиацией и другими агентами // Успехи соврем. биологии. – 1983. – **96**, № 3 (6). – С. 381–393.
12. Дятловицкая Э. В. Сфинголипиды и злокачественный рост // Биохимия. – 1995. – **60**, № 6. – С. 843–850.
13. Zwaal R. F., Comfurius P., Bevers E. M. Surface exposure of phosphatidylserine in pathological cell // Cell Mol. Life Sci. – 2005. – **62**. – P. 971–988.
14. Хышижтуев Б. С., Агапова Ю. Р., Жилин И. В., Иванов В. Н. Фосфолипидный состав различных участков пораженного органа при раке легкого // Вопр. мед. химии. – 1999. – № 4. – С. 124–129.
15. Бурлакова Е. Б., Пальмина Н. П. Регуляторная функция мембран при злокачественном росте // Вестн. АМН СССР. – 1982. – № 3. – С. 74–86.

Київський національний університет
ім. Тараса Шевченка
Національний університет біоресурсів
і природокористування України, Київ

Надійшло до редакції 21.01.2010

S. V. Knyzhnyak, L. I. Stepanova, A. G. Kudryavceva, V. I. Demeshok

A state of the lipid component in cellular membranes of human colon carcinoma

The obtained results characterizing the lipid component of microsomal membranes of human colorectal adenocarcinoma indicate changes in the quantitative content of membrane phospholipides and cholesterol owing to the tumor growth that may determine the structural and functional characteristics of tumor cell membranes.