



Биол. журн. Армении, 2 (64), 2012

ЖИРНОКИСЛОТНАЯ МОДИФИКАЦИЯ ЛИПИДОВ В МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТКАХ КРОВИ ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И ЯИЧНИКОВ

Т.Р. ТОРГОМЯН, М.П. ЛАЗЯН, А.Г. ДАВТЯН, Т.Б. БАТИКЯН,
Р.А. КАЗАРЯН, К.А. АЛЕКСАНИАН*, Г.М. ГАЛСТЯН*,
Ю.В. ТАДЕВОСЯН

*Институт молекулярной биологии НАН РА

**Национальный центр онкологии им. В.Фанарджяна, МЗ РА
tigran.torgomyan@gmail.com

Исследованы закономерности кратковременного (5 с) включения и относительно длительного (60 мин) межфракционного перераспределения экзогенной [^{14}C]олеиновой кислоты (ОК) в различные фракции фосфолипидов (ФЛ) и нейтральных липидов (НЛ) мононуклеарных клеток (МНК), выделенных из периферической крови практически здоровых доноров и больных раком молочной железы (РМЖ) и яичников (РЯ).

Полученные данные свидетельствуют о достоверных и идентичных нарушениях в механизмах как быстрого, так и пролонгированного ОК-модификаций липидов МНК периферической крови при РМЖ и РЯ.

Делается заключение о вовлечении процессов ОК-модификации жирнокислотного состава ФЛ и НЛ клеточных мембран МНК крови в патогенез различных форм онкологических заболеваний. Полученные данные свидетельствуют также о специфичности сдвигов в отмеченных процессах для отдельных форм неоплазий в зависимости от типа исследованной ЖК.

*Мононуклеарные клетки – липиды – олеиновая кислота –
рак молочной железы – рак яичников*

Նորմայում և կրճազեղծի (ԿԶ) ու ձվարանների (ՁԶ) քաղցկեղների ժամանակ ծայրամասային արյան մոնոնուկլեարային բջիջներում (ՄՆԲ) ուսումնասիրվել են ֆոսֆոլիպիդների (ՖԼ) և չեզոք լիպիդների (ՉԼ) տարբեր բաղադրամասեր էկզոգեն [^{14}C]օլեինաթթվի (ՕԹ) արագ (5 վ) ներմուծման և տևական (60 րոպե) միջբաղադրամասային վերաբաշխման օրինաչափությունները:

Ստացված տվյալները վկայում են ԿԶ և ՁԶ ժամանակ ՄՆԲ լիպիդների ՕԹ-ով մոդիֆիկացման ինչպես արագ, այնպես տևական գործընթացներում հավաստի և նույնատիպ խանգարումների առկայության մասին:

Եզրակացություն է արվում տարբեր չարորակ նորագոյացությունների ախտածնության մեջ ծայրամասային արյան ՄՆԲ բջջաթաղանթների ՖԼ և ՉԼ բաղադրամասերի ՕԹ-ով մոդիֆիկացման գործընթացների ներգրավման մասին: Ստացված տվյալները վկայում են նաև տարատեսակ քաղցկեղների ժամանակ նշված գործընթացներում առկա խանգարումների յուրահատկությունների մասին՝ կախված ուսումնասիրված ճարպաթթվի տեսակից:

*Մոնոնուկլեարային բջիջներ – լիպիդներ – օլեինաթթու –
կրճազեղծի քաղցկեղ – ձվարանների քաղցկեղ*

Quick (5 sec) incorporation of exogenous [^{14}C]oleic acid (OA) into the phospholipid (PL) and neutral lipid (NL) diverse fractions and its long-term (60 min) interfractional conversions in crude mononuclear cells (MNC) isolated from the peripheral blood of patients with breast (BC) and ovarian (OC) cancers in comparison with the healthy people were investigated.

The data obtained provide evidence for reliable and identical disturbances in the MNC membrane lipids in the quick and long-term OA-modification mechanisms in BC and OC.

It is concluded that some of the mechanisms responsible for PL and NL fatty acid-content modification by OA peripheral blood MNC are involved in the pathogenesis of BC and OC. Notably, alterations revealed are specific for different forms of cancer in dependence to the fatty acid type used.

Mononuclear cells – lipids – oleic acid – breast cancer – ovarian cancer

Злокачественное новообразование в настоящее время рассматривается как многостадийное системное заболевание, при возникновении которого некоторые из патологически трансформированных клеток по не до конца выясненным причинам не обнаруживаются и не уничтожаются иммунной системой, давая начало опухолевому зачатку с последующим его развитием и распространением.

Известно, что при возникновении онкологического процесса под воздействием на клетку экзогенных или эндогенных канцерогенных факторов затрагиваются такие жизненно важные функции клетки, как генетический контроль над ее пролиферацией [11] или дифференциацией, межклеточные контакты [22], трансмембранные процессы [12] и др., в осуществлении которых ключевую роль играет плазматическая мембрана (ПМ) клетки.

Согласно современным представлениям, ПМ клетки представляет собой целостную, кооперативно функционирующую систему, состоящую из различных относительно автономных липопротеиновых доменов (сигнальные, транспортные и др.) [5, 22]. В состоянии покоя клеток как ПМ в целом, так и отдельные ее домены характеризуются строго специфичным и динамичным равновесием всех качественно-количественных, физико-химических, обменных, структурных и других параметров, совокупность которых, по нашим представлениям, определяет относительно стабильный “метаболический статус покоя” липопротеинового бислоя.

При воздействии на клетку любого внешнего сигнала в зависимости от его длительности и интенсивности происходит обратимое, либо необратимое, кратковременное или хроническое смещение исходного и установление нового, измененного метаболического статуса покоя ПМ. При этом в быстропотекающих процессах изменения липопротеинового бислоя ПМ участвует в основном внутримембранный потенциал модификационных механизмов. При относительно длительном воздействии внешних факторов в отмеченные процессы вовлекаются также и внутриклеточные кооперативные механизмы изменения метаболического статуса покоя ПМ.

Липидное составляющее липопротеинового бислоя ПМ, наиболее чутко реагирующее на внешние физиологические или патогенные сигналы, вовлекается в процессы реорганизации ПМ быстрыми и обратимыми сдвигами в активности реакций липидной модификации. Вследствие этого в липидном микроокружении различных мембраносвязанных белков изменяются исходные и устанавливаются новые, оптимальные условия для их нормального функционирования. Исходя из результатов ранее проведенных нами исследований [5-8], а также данных литературы [19], подобные сдвиги в модификации мембранных липидов выявляются уже с первых секунд действия на клетку внешних сигналов.

В настоящее время внимание ученых привлекают главным образом изменения структурно-функциональных особенностей белкового компонента ПМ клеток при возникновении и развитии онкологических заболеваний. Однако все еще недостаточно изучены [2-4, 8] специфические или неспецифические сдвиги в механизмах модификации липидного составляющего (естественного микроокружения мембранных белков) липопротеинового бислоя ПМ клеток при неоплазиях. В этом отношении особого внимания заслуживают сдвиги в процессах быстрой или пролонгированной модификации жирнокислотного состава различных мембранных липидов при раковых заболеваниях.

Литературные данные последних лет свидетельствуют [18] о важной роли иммуносупрессорных CD4+, CD25++ и FOXP3 экспрессирующих регуляторных Т-лимфоцитов (Трег) в процессах возникновения и развития разнообразных злокачественных опухолей. Превалирование Трег в периферической крови больных с различными формами новообразования, по всей вероятности, приводит к нарушению в организме больных нормального баланса про- и антиракового потенциалов иммунной системы [17]. На основании этого нами было предположено, что изучение нарушений в механизмах модификации липидов ПМ в общей массе моноклеарных клеток (МНК) периферической крови больных при различных злокачественных новообразованиях может быть весьма информативным как для выявления, так и оценки глубины патологического состояния.

Ранее нами были выявлены идентичные нарушения в процессах модификации жирнокислотного состава липидов экзогенной полиненасыщенной арахидоновой кислотой (АК) в МНК периферической крови больных с различными формами злокачественных новообразований [5, 6, 20]. Согласно имеющимся данным, в норме мононенасыщенная олеиновая кислота (ОК) также вовлекается в процессы сигнальной трансдукции [12] или стабилизации мембранных структур [16] в качестве регулятора текучести липидного бислоя. Однако в научной литературе отсутствуют данные о возможных нарушениях в механизмах ОК-модификации липидов мембран МНК при отдельных формах неоплазий.

В настоящей работе представлены результаты сравнительных исследований процессов кратковременного (5 с) включения экзогенной [^{14}C]ОК в различные фракции фосфолипидов (ФЛ) и нейтральных липидов (НЛ) и ее относительно более длительного (60 мин) межфракционного перераспределения в ПМ МНК, выделенных из периферической крови практически здоровых доноров и больных раком молочной железы (РМЖ) или яичников (РЯ).

Материал и методика. В работе использованы пробы периферической крови 10-и практически здоровых доноров, 7-и первичных больных с РМЖ (стадии T1N0M0 и T2N1M0) и 5-и больных с РЯ (стадия T3NxM1) по классификации TNM. Пробы крови были предоставлены Национальным центром онкологии имени В.Фанарджяна МЗ РА. МНК из цельной крови выделяли методом Иннеса и др. [14] в градиенте фикола-верографина (1 часть 32,8% верографина и 2,4 части 8%-ного водного раствора фикола 400 000, $d=1,076-1,077$). Интактность клеток, определяемая окрашиванием трипановым синим, составляла более 90%. При чрезмерном загрязнении МНК эритроцитами последние лизировали гипотоническим шоком. МНК осаждали при 650g в течение 15 мин и ресуспендировали (106 кл./мл) в минимальной основной среде Игла (pH-7,4).

Включение экзогенной 1-[^{14}C]ОК в липиды ПМ интактных клеток осуществляли ранее описанным методом [5]. Для этого при 37 °C к 0,2 мл клеточной суспензии добавляли 0,3 мл среды Игла (фирмы "Sigma", pH 7,4), содержащей 0,1 мкКи 1-[^{14}C]олеоил-KoA (сп. акт. 56 мКи/ммоль, "Amersham International", Великобритания) и 50 мкмоль MgCl_2 , в конечном объеме 0,5 мл. На 5 с и 60 мин инкубации реакции останавливали подливанием 2 мл холодной смеси хлороформ-метанола (1:2, об/об).

Экстракцию липидов осуществляли по методу Блай и Дайер [9]. Фракционирование ФЛ проводили одномерной ТСХ на приготовленных нами на основе силикагеля "Н" ("Sigma", США) пластинках в системе растворителей хлороформ-ацетон-метанол-уксусная кислота-вода

(6:8:2:2:1, об/об). НЛ фракционировали в смеси растворителей петролейный эфир – диэтиловый эфир – муравьиная кислота (30:10:1, об/об) на фирменных (“Merck”, Германия) ТСХ пластинках.

Распределение радиоактивности в идентифицированных соответствующими химически чистыми стандартами (“Sigma”, США) и проявленных в парах йода липидных фракциях определяли сканированием ТСХ пластинок на радиосканере фирмы “Berthold” (Германия). Степень радиоактивности проб определяли в жидкости Брея на сцинтиляционном спектрометре “Roche-Bioelectronique Kontron”, модель SL-4221 (Франция). Достоверность разности средних показателей оценивали по критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Результаты исследования процессов быстрого (5 с) включения ОК в мембранные ФЛ МНК практически здоровых доноров обнаружили (рис.1.А) почти равномерное (в пределах 9-15% от суммы включенной радиоактивности) распределение жирной кислоты (ЖК) между всеми ФЛ фракциями. В МНК больных с РМЖ и РЯ в идентичных условиях эксперимента были выявлены (рис.1.А) в основном схожие нарушения в процессах быстрого включения экзогенной ОК в исследованные ФЛ фракции.

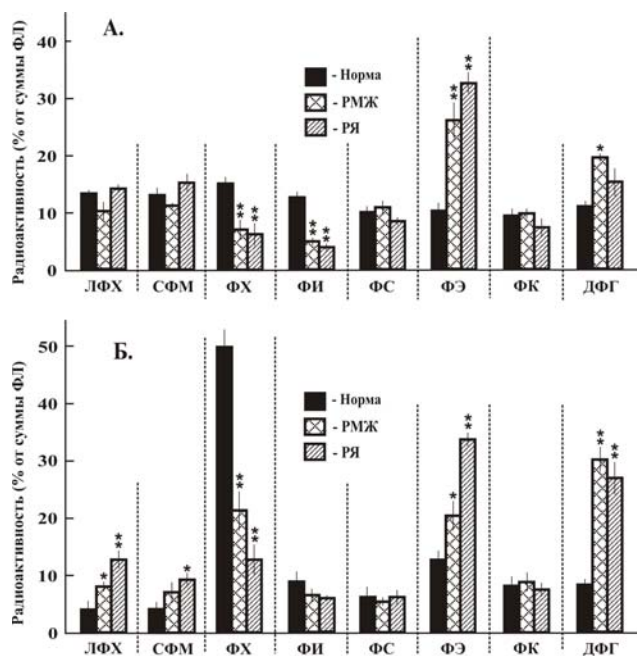


Рис. 1. Быстрое (5 с) (А.) включение экзогенной [^{14}C]олеиновой кислоты в фосфолипиды мононуклеарных клеток крови и ее пролонгированное (60 мин) (Б.) межфракционное перераспределение в норме, при раке молочной железы и раке яичников. * - $p < 0,5$; ** - $p < 0,001$

Наиболее значимым было многократное или значительное усиление процессов накопления ОК во фракции фосфатидилэтаноламинов (ФЭ) и дифосфатидилглицеринов (ДФГ) соответственно. При этом исследованные 2 формы неоплазий характеризовались также идентичным многократным подавлением процессов включения ОК во фракции фосфатидилхолинов (ФХ) и фосфатидилинозитов (ФИ). Уровни остальных [^{14}C]ОК-содержащих ФЛ фракций (лизофосфатидилхолинов - ЛФХ, сфингомиелинов - СФМ, фосфатидилсеринов - ФС и фосфатидных кислот - ФК) оставались в пределах нормы.

На основании представленных экспериментальных данных можно заключить, что при РМЖ и РЯ по сравнению со здоровыми волонтерами обнаруживаются закономерные и существенные нарушения в исходных, равномерно-сбалансированных в норме процессах быстрого (5 с) включения экзогенной ОК в различные фракции мембранных ФЛ МНК.

В условиях относительно пролонгированной (60 мин) инкубации [^{14}C]ОК с МНК здоровых доноров было выявлено (рис.1.Б) межфракционное перераспределение метки с наибольшим (50%) ее накоплением во фракции ФХ, количественно преобладающей во внешнем монослое ПМ клеток. Подобная закономерность, ранее выявленная [1, 6, 7] и в других клеточных популяциях при эстерификации ФЛ различными экзогенными ЖК, указывает на наличие в ПМ клеток специфических механизмов, обеспечивающих избирательное накопление различных ЖК во фракции ФХ при относительно длительных процессах ацилирования мембранных ФЛ.

Изучение процессов включения и перераспределения [^{14}C]ОК в ФЛ мембран МНК в течение 60 мин при РМЖ и РЯ показало (рис.1.Б.) достоверное повышение относительного содержания фракций ЛФХ, СФМ, ФЭ и ДФГ на фоне многократного подавления (по сравнению с нормой) процессов накопления ОК во фракции ФХ. Характерно, что схожие сдвиги в процессах пролонгированного включения различных ЖК в ФЛ фракции (кроме ФЭ) ранее были выявлены и при гемобластозах [1, 3, 5]. Обнаруженное понижение уровня [^{14}C]ОК-ФХ при всех исследованных нами формах раковых заболеваний, по всей вероятности, является следствием подавления реакции реацилирования ЛФХ, о чем свидетельствуют полученные нами данные [15]. С другой стороны, известен также механизм быстрого пополнения пула ФХ в наружном монослое ПМ, осуществляемый по схеме $\text{ФС} \rightarrow \text{ФЭ} \rightarrow \text{ФХ}$ [21]. Обнаруженное нами повышение ФЭ при РМЖ и РЯ на фоне низкого содержания ФХ, как в условиях 5 с (рис.1А), так и 60 мин (рис.1Б) инкубаций, указывает на возможное подавление ферментативных реакций двухэтапного трансметилирования ФЭ в цепи межфракционных перестроек близких по структуре 3-х отмеченных ФЛ фракций.

Таким образом, результаты этой серии исследований свидетельствуют о подавлении при РМЖ и РЯ процессов как быстрого (5 с) включения, так и относительно пролонгированного (60 мин) накопления экзогенной ОК во фракции ФХ в ПМ МНК, как результат возможного ингибирования реакций, катализируемых ЛФХ-ацилтрансферазой и/или ФЭ-трансметилазами.

Исследование закономерностей быстрого (5 с) включения [^{14}C]ОК в НЛ мембран МНК здоровых доноров выявило преимущественное (более чем 50%) накопление метки во фракции 1,2-диацилглицеринов (1,2-ДАГ) (рис.2.А). Содержание фракций моноацилглицеринов (МГ) и триацилглицеринов (ТГ) не превышало 25% от суммы радиоактивности, включенной в НЛ. Результаты аналогичных экспериментов с клетками больных с РМЖ и РЯ не обнаружили (рис. 2.А) значительных сдвигов (по сравнению с нормой) в процессах быстрого включения ОК в исследуемые фракции НЛ, за исключением достоверного повышения и понижения при РЯ содержания ОК во фракциях МГ и 1,2-ДАГ соответственно.

При относительно пролонгированном (60 мин) ацилировании НЛ МНК в норме обнаруживалось (рис.2.Б) накопление [^{14}C]ОК во фракциях МГ, 1,2-ДАГ и ТГ в соотношении 22, 35 и 43% соответственно. Известно, что в клетках молекула глицерина является одним из предпочитаемых субстратов для эстерификации различных свободных ЖК с образованием МГ [13]. В результате последующих ферментативных реакций ацилирования по схеме $\text{МГ} \rightarrow 1,2\text{-ДАГ} \rightarrow \text{ТГ}$ в клетках из МГ поэтапно синтезируются фракции 1,2-ДАГ и ТГ, последний из которых выполняет функцию временного “депо” для накопления избытка свободных ЖК [10, 13].

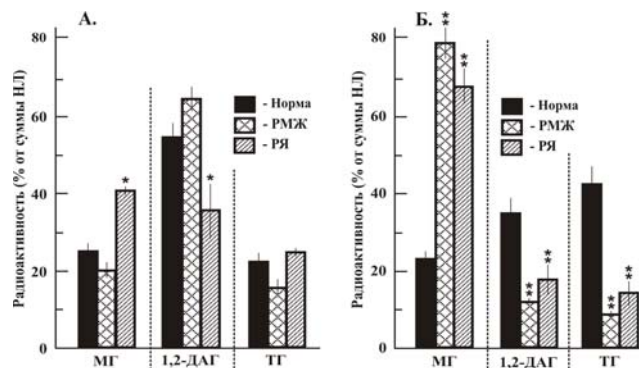


Рис. 2. Быстрое (5 с) (А.) включение экзогенной [^{14}C]олеиновой кислоты в нейтральные липиды мононуклеарных клеток крови и ее пролонгированное (60 мин) (Б.) межфракционное перераспределение в норме, при раке молочной железы и раке яичников.

В отличие от нормы, как при РМЖ, так и РЯ наблюдалось (рис.2.Б) преимущественное (70-80%) накопление метки во фракции МГ ПМ МНК на фоне многократного понижения уровней ОК-содержащих 1,2-ДАГ и ТГ. Эти данные указывают на возможное блокирование механизмов межфракционного перераспределения ОК при исследованных двух формах неоплазий, вследствие подавления активности МГ-ацилтрансферазы, инициирующей последующие реакции поэтапного ацилирования НЛ в МНК. Характерно, что отмеченная закономерность нарушений в процессах пролонгированной ОК-модификации НЛ при РМЖ и РЯ не была обнаружена [1,3] при различных гемобластозах, исследованных ранее в идентичных условиях эксперимента. С другой стороны, нарушения, выявленные при использовании экзогенной [^{14}C]АК для ЖК-модификации НЛ в МНК периферической крови больных с 3-мя различными формами лейкемии [3, 5, 6], были абсолютно идентичны с таковыми, обнаруженными при РМЖ и РЯ (неопубликованные данные).

Обобщая представленные выше и полученные ранее экспериментальные данные, можно заключить о достоверном вовлечении в патогенез различных форм онкологических заболеваний как быстрых, так и относительно пролонгированных процессов ОК-модификации жирнокислотного состава ФЛ и НЛ клеточных мембран МНК. Полученные данные свидетельствуют также о специфичности сдвигов в отмеченных процессах для отдельных форм неоплазий в зависимости от типа исследованной ЖК.

ЛИТЕРАТУРА

1. Մելքոնյան Մ., Լիմֆոցիտների թաղանթային լիպիդներում օլեինաթթվի ներմուծման օրինաչափությունները նորմայում և սուր միելոբլաստային լեյկոզի ժամանակ: Գիտություն և տեխնիկա, հ.6, էջ 12-19, 2006:
2. Акопян Г.В. Закономерности включения пальмитиновой кислоты в липиды мембран лимфоцитов в норме и при острой лимфобластной лейкемии. Наука и техника, 5, 513, стр. 12-18, 2006.
3. Гарибян А.Л., Батикян Т.Б., Асатрян Л.Ю., Тадевосян А.Ю., Амирханян Е.С., Тадевосян Ю.В. Исследование процессов липидной модификации лимфоцитарных мембран в норме и при хроническом лимфолейкозе. Мед. наука Армении, 39, 3, с. 41-50, 1999.

4. *Гарибян А.Л., Батикян Т.Б., Амирханян Е.С., Мелконян М.Г., Акопян Г.В., Тадевосян Ю.В.*, Липидные модификации в мембранах лимфоцитов при хроническом лимфолейкозе: Эффекты химиотерапии. Сб. статей научной сессии "Медицинская диагностика", (фундаментальные и прикладные аспекты), Ереван, с. 69-74, 2001.
5. *Мелконян М.Г., Акопян Г.В., Тадевосян А.Ю., Батикян Т.Б., Амирханян Е.С., Альтман А., Тадевосян Ю.В.* Ацилирование липидов арахидиновой кислотой и образование липидных вторичных посредников в анти-CD3/CD28 костимулированных лимфоцитах в норме и при различных формах лейкемии. Мед.наука Армении, 2, стр.56-63, 2007.
6. *Тадевосян А.Ю., Батикян Т.Б., Асатрян Л.Ю., Гарибян А.Л., Мелик-Андреасян М.Г., Геворкян Э.С., Тадевосян Ю.В.* Закономерности включения арахидиновой кислоты в липиды мембран нормальных и лейкемических лимфоцитов. Мед. наука Армении, 39, 3, стр. 33-40, 1999.
7. *Тадевосян Ю.В., Асатрян Л.Ю., Карагезян К.Г.* Процессы деацилирования мембранных фосфолипидов при инициации фосфоинозитидного цикла в синаптических крыс и лимфоцитах человека. Нейрохимия, 11, 2, стр. 194-2015, 1992.
8. *Тадевосян Ю.В., Асатрян Л.Ю., Батикян Т.Б., Карагезян К.Г., Тадевосян А.Ю.* Катаболизм мембранных фосфатидилхолинов в лимфоцитах на ранних стадиях митогенной стимуляции фосфоинозитидного цикла. Биохимия, 61, вып. 8, стр. 1414-1421, 1996.
9. *Bligh E.G., Dyer W.I.* A rapid method for lipid extraction and purification Canad.J. Biochem.Physiol., 37, p. 911-917, 1959.
10. *Coleman, R., Haynes E.* Subcellular location and topography of rat hepatic monoacylglycerol acyltransferase activity. Biochem.Biophys. Acta, 834, pp. 180-187, 1985.
11. *Dowhan W., Mileykovskaya E., Bogdanov M.,* Diversity and versatility of lipid-protein interactions revealed by molecular genetic approaches. Biochim. Biophys. Acta. 1666, 1-2, pp. 19-39, 2004.
12. *Gong Y, Zhang Z.* Alternative signaling pathways: when, where and why? FEBS Lett., 579, 24, pp. 5265-5274, 2005.
13. *Igal R.A., Whang S., Gonzalez-Baro M., and Coleman R.A.* Mitochondrial glycerol phosphate acyltransferase directs the incorporation of exogenous fatty acids into triacylglycerol. J. Biol. Cem., 276, pp. 42205-42212, 2001.
14. *Innes J., Runtz M.M., Kim Y.T. Weksler M.E.* Induction of suppressor activity in the autologous mixed lymphocyte reaction and in cultures with ConA. J. Clin. Invest. 64, pp. 1608-1613, 1979.
15. *Hakobyan G.V., Batikyan T.B., Kazaryan R.A., Amirkhanyan E.S., Tadevosyan Yu.V.* Phospholipid-catabolizing enzyme activities in blood lymphocyte plasma membranes in hematological malignancies Biol. J. Arm., LXII, (suppl. 1), pp. 36-40, 2010.
16. *Leekumjorn S., Cho H.J., Wu Y., Wright N.T., Sum A.K., Chan C.* The role of fatty acid unsaturation in minimizing biophysical changes on the structure and local effects of bilayer membranes. Bioch.Biophys. Acta, 1788, pp. 1508-1516, 2009.
17. *Liyanage U.K., Goedegebuure P.S., et al.,* Increased prevalence of regulatory T cells (Treg) is induced by pancreas adenocarcinoma. J. Immunother. 29, 4, pp. 416-424, 2006.
18. *Skog J., Würdinger T., et al.,* Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. Nat. Cell Biol. 10, 12, pp. 1470-1476, 2008.
19. *Suzuki K.G.N., Fujiwara T.K., et al.,* GPI-anchored receptor clusters transiently recruit Lyn and Gα for temporary cluster immobilization and Lyn activation: single-molecule tracking study. J. Cell Biol., 177, 4, pp. 717-730, 2007.
20. *Torgomyan T.R.,* Acylation of lipids in blood lymphocytes in ovarian cancer. Electronoc Journal of Natural Sciences, NAS RA, Iss.1 (18), pp. 15-19, 2012.
21. *Vance D.E., C.J. Walkey, Z. Cui,* Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase from liver. Biochim. Biophys. Acta, 1348, pp. 142- 150, 1997.
22. *Vigh L., Escibar P.V., et al,* The significance of lipid composition for membrane activity: New concepts and ways of assessing function Progress in Lipid Research, 44, pp. 303-344, 2005.

Поступила 02.04.2012