

УДК 618.146-006.6:543.635.3

ИЗМЕНЕНИЕ СОСТАВА КОРОТКОЦЕПОЧЕЧНЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В КЛЕТКАХ ШЕЙКИ МАТКИ ПРИ ТЯЖЕЛОЙ ДИСПЛАЗИИ И ЗЛОКАЧЕСТВЕННОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ

Каюкова Е.В., Терешков П.П.

ГБОУ ВПО «Читинская государственная медицинская академия» (672090 г. Чита, ул.Горького, 39А), e-mail: elena_pochta22@mail.ru

С помощью метода газожидкостной хроматографии изучен спектр короткоцепочечных жирных кислот (КЖК) в клетках шейки матки при диспластической и неопластической трансформациях. Степень выраженности дефицита КЖК зависит от глубины инвазии опухоли для микроинвазивного процесса. В клетках, пораженных опухолевым и диспластическим процессом, независимо от их локализации, отмечалось уменьшение пула КЖК. В биоптатах цервикального рака, паранеопластических фрагментах тканей и в локусе предрака преобладали короткоцепочечные аналоги с нечетным числом атомов углерода. По сравнению с очагом предрака в клетках рака шейки матки стадии *in situ* концентрация изобутирата, валериата возросла в 2 раза. Концентрация капроновой кислоты в локусе предрака уменьшалась, по сравнению с контрольной величиной и возрастала до исходной величины в очаге рака *in situ*.

Ключевые слова: рак шейки матки, цервикальная интраэпителиальная неоплазия III степени, короткоцепочечные жирные кислоты

THE SHORT CHAIN FATTY ACID SPECTRUM OF CERVICAL DYSPLASIA AND CANCER CELLS

Kayukova E.V., Tereshkov P.P.

Chita State Medical academy (39a, Gorkogo Street, 672090-Chita, Russia), e-mail: elena_pochta22@mail.ru

The short chain fatty acid (SFA) spectrum of cervical dysplasia and cancer cells was studied using the method of gas-liquid chromatography. Irrespective of cells localization, the deficiency of SFA have been detected. Its grade depended on the depth of tumor invasion in microinvasive cancer. The high level of SFA with an odd number of carbon atoms have been detected in the cells of cancer, paraneoplastic site and cervical intraepithelial neoplasia III. The 2-fold increased level of isoC4, C5 was observed in tumor tissue as compared to the precancer. The decreased level of C6 was observed in the precancer locus, which was normalized in the cancer *in situ* focus.

Keywords: cervical cancer, cervical intraepithelial neoplasia grade III, short chain fatty acid

Рак шейки матки (РШМ) является одним из самых распространенных онкологических заболеваний среди женщин во всем мире [6]. Несмотря на известный этиологический фактор этой онкопатологии, многие аспекты патогенеза данного заболевания остаются неизвестными, в том числе изменение липидного метаболизма [4, 5]. В последнее время в литературе появились данные об участии короткоцепочечных жирных кислот в опухолевом процессе, при этом последние рассматриваются как продукт жизнедеятельности микроорганизмов [4]. В литературе встречаются лишь отдельные сведения об особенностях метаболизма КЖК у больных злокачественными новообразованиями [4].

Цель исследования: изучить состав короткоцепочечных жирных кислот в клетках шейки матки в локусе малигнизации, предопухолевого поражения, а также в условно здоровых фрагментах тканей.

Материалы и методы. В исследование были включены 108 женщин, проходивших обследование и лечение в Забайкальском краевом онкологическом диспансере. Средний возраст пациенток составил 36 ± 2 лет. В качестве образцов исследования служили фрагменты ткани шейки матки, полученные путем прицельной биопсии или интраоперационно в ходе проведения оперативного пособия. Одновременно проводился их морфологический контроль. В соответствии с данными гистологического исследования каждый фрагмент ткани был разделен на 2 локуса: А — опухолевый очаг, Б — ткань без признаков злокачественного роста. Было выделено 3 изучаемых группы больных: I — пациентки с диагнозом РШМ (60 — гистологически плоскоклеточный рак o-Ib стадии), II — с предраковыми заболеваниями шейки матки (30), III — здоровые женщины (18) — контрольная группа.

Для получения клеточной суспензии кусочки биоптата измельчали и гомогенизировали в гомогенизаторе GentleMACSDissociator (Miltenyi BiotecGmbH, Германия) с пробирками С типа с использованием набора реагентов TumorDissociationKit (Miltenyi BiotecGmbH, Германия), согласно инструкции. Полученную суспензию клеток фильтровали через капроновый фильтр размером ячеек 30 мкм (Miltenyi BiotecGmbH, Германия). Полученные клетки отмывали промывающим буфером autoMACS Rinsing Solution (Miltenyi BiotecGmbH, Германия). Количество клеток определяли с помощью проточной цитофлюориметра FC500 (BeckmanCoulter, США) с использованием счетных флуоросфер FLOW-COUNT (BeckmanCoulter, США).

В отмытой суспензии клеток определяли количество жирных кислот с короткой цепью (КЖК) по методике М.Д. Ардатской (2004) в нашей модификации, которая складывается из двух этапов: процесса пробоподготовки и непосредственно газожидкостной хроматографии [2].

Экстракцию КЖК проводили, смешивая диэтиловый эфир и суспензию клеток в равных объемах, добавляли 0,50 мл 50,0%-ного раствора серной кислоты и внутренний стандарт (α, α -диметилмасляную кислоту). Интенсивно встряхивали в течение 10 мин и центрифугировали при 3000 об/мин в течение того же времени. Образованный супернатант подвергали выпариванию до сухого остатка, растворяли его гексаном и далее анализировали на хроматографе «Кристалл-2000М» (Россия). Определяли: C_3 — пропионовую, C_4 — масляную, $isoC_4$ — изомаляную, C_5 — валериановую, C_6 — капроновую кислоты.

Статистическая обработка данных проводилась с помощью компьютерной программы «BIOSTAT». Использовались методы непараметрической статистики с применением U-критерия Манна–Уитни. Полученные результаты представлены как медиана с указанием 25-го и 75-го перцентилей. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

В опухолевых биоптатах независимо от их локализации (очаг цервикального поражения или условно здоровый участок ткани) отмечалась снижение пула КЖК (табл. 1). Вероятно, это обусловлено использованием этого класса соединений в биосинтезе высших жирных кислот, интенсификация которого наблюдается при неоплазиях. При этом крайне выраженный дефицит КЖК был обнаружен в локусе предрака (в 5,4 раза по сравнению с контрольными величинами $p < 0,001$). По мере удаления от очага предопухолевого поражения к периферическим участкам наблюдалась тенденция к увеличению их доли от 0,050 до 0,074 нг/кл соответственно. В зоне злокачественной трансформации уровень КЖК составил 0,076 нг/кл, что достоверно не отличалось от соответствующего показателя в парадиспластических биоптатах ($p > 0,05$). По направлению от опухолевого очага к периферическим участкам тканей, так же как и в группе II, визуализировалась положительная динамика по суммарному количеству КЖК в 1,6 раза ($p < 0,001$).

При анализе качественного состава КЖК выявлено, что в биоптатах цервикального рака, паранеопластических фрагментах тканей и в локусе предрака был изменен баланс четных и нечетных аналогов, а именно повышена доля КЖК с нечетным числом атомов углерода на 7%, 13% и 11% соответственно по сравнению с контрольным показателем ($p < 0,001$). Вместе с тем вклад короткоцепочечных аналогов с четным числом атомов углерода в тканях указанных локализации снижен на 6,7%, 13,25% и 10,77% соответственно.

Что касается детальных изменений в структуре КЖК, то в очаге РШМ и в клетках паранеопластической зоны наблюдалась редукция пула изобутирата, валериата, капроноата на 80% для каждого из них ($p < 0,001$) (табл. 1). Следует отметить, что, кроме этого, в клетках РШМ снижалось количество пропионата и бутирата на 54% касательно каждого ($p < 0,001$).

Таблица 1

Содержание короткоцепочечных жирных кислот (нг/клетка) в клетках шейки матки различной локализации при дис- и неопластической трансформации

диагноз	здоровая (n=18)	предрак		рак		Величина критерия p
		очаг поражения (n=30)	здоровый участок (n=30)	очаг поражения (n=60)	здоровый участок (n=60)	
C3:0	0,061 (0,050; 0,087)	0,023* (0,022; 0,024)	0,022* (0,016; 0,028)	0,028* (0,013; 0,029)	0,062 (0,033; 0,089)	p1<0,001 p2=0,588 p3=0,985
C4:0	0,027 (0,021; 0,038)	0,010* (0,010; 0,010)	0,010* (0,007; 0,012)	0,012* (0,006; 0,013)	0,027 (0,014; 0,039)	p1<0,001 p2=0,573 p3=0,984
iC4:0	0,075 (0,059; 0,090)	0,007* (0,005; 0,008)	0,017* (0,016; 0,018)	0,015* (0,007; 0,015)	0,014* (0,008; 0,026)	p1=0,578 p2<0,01 p3=0,014
C5:0	0,067 (0,052; 0,079)	0,006* (0,005; 0,008)	0,015* (0,014; 0,016)	0,013* (0,006; 0,013)	0,013* (0,007; 0,023)	p1=0,494 p2=0,02 p3<0,001
C6:0	0,041 (0,032; 0,049)	0,004* (0,003; 0,005)	0,010* (0,009; 0,010)	0,008* (0,004; 0,008)	0,008* (0,004; 0,014)	p1=0,454 p2=0,038 p3<0,001
Σ КЖК с нечетным числом атомов углерода	0,128 (0,102; 0,166)	0,029* (0,027; 0,031)	0,037* (0,031; 0,044)	0,041* (0,019; 0,043)	0,075* (0,036; 0,133)	p1=0,005 p2=0,533 p3<0,001
Σ КЖК с четным числом атомов углерода	0,143 (0,112; 0,177)	0,021* (0,018; 0,023)	0,036* (0,032; 0,040)	0,035* (0,019; 0,043)	0,058* (0,022; 0,075)	p1=0,036 p2=0,228 p3<0,001
Σ КЖК	0,271 (0,214; 0,344)	0,050* (0,045; 0,055)	0,074* (0,063; 0,084)	0,076* (0,036; 0,079)	0,124 (0,055; 0,224)	p1=0,01 p2=0,006 p3<0,001

*достоверные отличия между соответствующей подгруппой и контролем (p<0,001)

p1 — уровень значимости достоверных различий между параметрами клеток очага цервикального рака и паранеопластическими биоптатами

p2 — уровень значимости достоверных различий между параметрами клеток очага цервикального рака и локуса предрака

p3 — уровень значимости достоверных различий между параметрами очага предрака и парадиспластических биоптатов

Для локуса предрака и клеток парадиспластической локализации характерно тотальное снижение пула всех КЖК, что достоверно значимо в отношении контрольных величин ($p < 0,001$). При этом в клетках предрака регистрировался наиболее выраженный дефицит изобутирата, пропионата и капроноата на 91% для каждого из них ($p < 0,001$). В биоптатах парадиспластической локализации данный дефицит также имел место быть, однако доля isoC4, C3 и C6 уменьшилась на 77% для каждой ($p < 0,001$).

Так как в литературе имеются данные о влиянии стадии опухолевого процесса на метаболизм липидов, нами был проведен анализ спектра КЖК в группе цервикального рака в зависимости от стадии опухолевого процесса (табл. 2).

В группе РШМ в клетках всех биоптатов шейки матки независимо от их локализации (очаг поражения или условно здоровый участок тканей) и стадии опухолевого процесса наблюдался суммарный дефицит КЖК по сравнению с контрольной величиной ($p < 0,001$), наиболее выраженный в локусе рака шейки матки Ia1 стадии и в клетках паранеопластической локализации при стадии опухоли Ib стадии.

При сравнении общего количества КЖК в клетках РШМ в зависимости от стадии опухолевого процесса было обнаружено, что степень выраженности дефицита КЖК зависит от глубины инвазии опухоли для микроинвазивного процесса. Так, установлено, что с увеличением стадии РШМ от нулевой до Ia1 суммарный недостаток короткоцепочечных аналогов в локусе цервикального рака возрос на 6,64% ($p < 0,05$). Достоверных отличий по данному показателю в клетках неоплазии в отношении стадии Ib не выявлено.

В цервикальном эпителии, расположенном паранеопластически, достоверные отличия по пулу КЖК выявлены для стадии *in situ* и Ib. Так, дефицит по КЖК в клетках этой локализации возрос более чем на 40% ($p \leq 0,001$).

Известно, что степень злокачественности опухоли определяется суммарным содержанием жирных кислот с нечетным числом атомов углерода в прямой зависимости. Эти данные обоснованы и для результатов нашего исследования. При нулевой стадии рака шейки матки в составе КЖК преобладали жирные кислоты с четным числом атомом углерода. Установлено, что при инвазивном РШМ в цервикальном эпителии независимо от локализации клеток наблюдается дисбаланс состава КЖК с преобладанием аналогов с нечетным числом атомов углерода в цепи по сравнению с контрольными образцами ($p \leq 0,001$). При этом по мере удаления от очага опухолевого поражения данная диспропорция только усиливалась.

При сравнении суммарного количества КЖК с нечетным числом атомов углерода в группах цервикального рака в зависимости от стадии достоверные различия зафиксированы только для клеток парадиспластической зоны групп рака *in situ* и стадии Ib ($p < 0,001$).

Таблица 2

Содержание жирных кислот (нг/клетка) в клетках шейки матки различной локализации
при цервикальном раке в зависимости от стадии опухолевого процесса

диагноз параметры	здоровая (n=18)	рак 0 стадия		рак Ia1 стадия		рак Ib стадия		Величина критерия p
		очаг поражения (n=20)	здоровый участок (n=20)	очаг поражения (n=20)	здоровый участок (n=20)	очаг поражения (n=20)	здоровый участок (n=20)	
C3:0	0,061 (0,050; 0,087)	0,028* (0,028; 0,029)	0,076 (0,075; 0,076)	0,028* (0,017; 0,033)	0,062 (0,036; 0,099)	0,031* (0,019; 0,044)	0,034* (0,034; 0,035)	p1a=0,654 p1б=0,528 p2a=0,981 p2б<0,001 p3a=0,760 p3б=0,053
C4:0	0,027 (0,021; 0,038)	0,014* (0,013; 0,014)	0,032 (0,031; 0,032)	0,012* (0,007; 0,014)	0,027 (0,015; 0,043)	0,014* (0,009; 0,020)	0,013* (0,012; 0,014)	p1a=0,105 p1б=0,528 p2a=0,0981 p2б<0,001 p3a=0,981 p3б<0,010
iC4:0	0,075 (0,059; 0,090)	0,014* (0,014; 0,015)	0,017* (0,017; 0,017)	0,015* (0,009; 0,017)	0,014* (0,009; 0,029)	0,016* (0,009; 0,022)	0,012* (0,007; 0,016)	p1a=0,981 p1б=0,509 p2a=0,981 p2б=0,980 p3a=0,528 p3б=0,053
C5:0	0,067 (0,052; 0,079)	0,013* (0,012; 0,013)	0,015* (0,014; 0,015)	0,013* (0,008; 0,015)	0,013* (0,008; 0,026)	0,015* (0,009; 0,022)	0,002* (0,002; 0,003)	p1a=0,981 p1б=0,528 p2a=0,981 p2б<0,001 p3a=0,981 p3б<0,001

С6:0	0,041 (0,032; 0,049)	0,039 (0,024; 0,055)	0,040 (0,025; 0,055)	0,08* (0,005; 0,009)	0,008 (0,005; 0,016)	0,010* (0,006; 0,014)	0,001* (0,001; 0,002)	p1a=0,008 p1b=0,020 p2a=0,022 p2b<0,001 p3a=0,981 p3b<0,001
Σ КЖК с нечет числом ат С	0,128 (0,102; 0,166)	0,042* (0,042; 0,042)	0,091* (0,090; 0,091)	0,041* (0,025; 0,048)	0,075* (0,049; 0,135)	0,045* (0,027; 0,062)	0,036* (0,036; 0,037)	p1a=0,325 p1b=0,528 p2a=0,0981 p2b<0,001 p3a=0,529 p3b=0,053
Σ КЖК с чет числом ат С	0,143 (0,112; 0,177)	0,052* (0,052; 0,083)	0,089* (0,074; 0,103)	0,035* (0,021; 0,041)	0,058* (0,036; 0,086)	0,040* (0,024; 0,056)	0,026* (0,023; 0,029)	p1a=0,003 p1b=0,021 p2a=0,022 p2b=0,497 p3a=0,981 p3b=0,529
Σ КЖК	0,271 (0,214; 0,344)	0,094*	0,179*	0,076*	0,124*	0,084*	0,062* (0,059; 0,066)	p1a=0,048 p1b=0,53 p2a=0,98 p2b=0,001 p3a=0,759 p3b=0,052

*достоверные отличия между соответствующей подгруппой и контролем (p<0,001)

p1 – достоверные различия между соответствующими параметрами цервикального рака стадии 0 и Ia1, где p1a – сравнения между величинами локусов рака, p1b – между паранеопластическими биоптатами

p2 – достоверные различия между соответствующими параметрами цервикального рака стадии 0 и Ib, где p2a – сравнения между величинами локусов рака, p2b – между паранеопластическими биоптатами

p3 – достоверные различия между соответствующими параметрами цервикального рака стадии Ia1 и Ib, где p3a – сравнения между величинами локусов рака, p3b – между паранеопластическими биоптатами

Независимо от стадии опухолевого процесса в очаге рака регистрировался дефицит пропионата ($p < 0,001$). При Ib стадии в клетках паранеопластической локализации также зафиксирован недостаток данной кислоты в 1,8 раза по сравнению с величиной контроля ($p < 0,001$) и в 2,2 раза — по сравнению с соответствующей величиной при раке *in situ* ($p < 0,001$). Аналогичная тенденция была характерна и для бутирата.

Недостаток изобутирата регистрировался в клетках цервикального эпителия, на величину которого достоверно не влияли стадия опухолевого процесса и локализация клеток. Интересно отметить, что по сравнению с очагом предрака в клетках РШМ стадии *in situ* концентрация isoC4 возрастала в 2 раза ($p < 0,001$).

При РШМ Ib стадии установлено достоверно снижение концентрации валериата в клетках паранеопластической зоны по сравнению с соответствующими величинами при раке *in situ* и Ia1 стадии ($p < 0,001$). Следует подчеркнуть, что в отличие от локуса предрака при начальном опухолевом процесс концентрация C5 увеличилась почти в 2 раза ($p < 0,001$). Что касается капроновой кислоты, то выявлены динамика по резкому падению ее концентрации ($p < 0,001$) в локусе предрака в 10 раз по сравнению с контрольной величиной и восстановление ее пула к исходной контрольной величине в очаге рака *in situ* ($p < 0,001$). С увеличением стадии опухолевого процесса концентрации C6 повышается в 2 раза до уровня 0,08 нг/клетка в локусе РШМ Ia1.

В литературе нами не найдено данных по изучению пула КЖК в тканях при РШМ и других неоплазиях. Учитывая биохимическую и физиологическую анаплазию опухолей и гиперпролиферативных состояний, полученные данные можно сопоставить с результатами исследования короткоцепочечных аналогов при гиперпролиферативных процессах, а именно при псориазическом дермопозе. Т.М. Караваева и соавт. [1] сообщают о существенном уменьшении уровня каждого аналога из КЖК в псориазических очагах, что коррелирует с особенностями обмена этих соединений на местном и системном уровнях.

Можно предположить, что дефицит КЖК при предраковых и малигнизированных процессах в экзоцервиксе быть обусловлен активным использованием последних в биосинтезе некоторых аминокислот, таких как серин, глутамат, аспартат, потребность в которых повышена в локусе высокой пролиферации. Кроме того, серин является компонентом фосфолипидов мембраны клетки и необходим в синтезе церамидов, которые также участвуют в процессах апоптоза, пролиферации опухолевых клеток [3].

Выводы. В клетках, пораженных опухолевым и диспластическим процессом, независимо от их локализации отмечалось уменьшение пула КЖК, степень выраженности которого зависит от глубины инвазии опухоли для микроинвазивного процесса. В биоптатах РШМ, паранеопластических фрагментах тканей и в локусе предрака преобладали КЖК с

нечетным числом атомов углерода. Для групп цервикального рака независимо от стадии процесса по мере удаления от опухолевого очага эта тенденция нарастала. По сравнению с очагом предрака в клетках рака шейки матки *in situ* концентрация изобутирата, валериата возросла в 2 раза. Концентрация С6 в локусе предрака уменьшалась в 10 раз по сравнению с контролем и возрастала до исходной величины в очаге рака *in situ*. С увеличением стадии опухолевого процесса концентрация этой кислоты повышалась в 2 раза. Выявленные закономерности свидетельствуют о роли КЖК в опухолевом процесс экзоцервикса, что подлежит подробному изучению и может быть использовано в дальнейшем для ранней диагностики предопухолевых состояний и начальных стадий рака шейки матки.

Список литературы

1. Караваева Т.М. Содержание жирных кислот с короткой цепью в сыворотке крои и эпидермисе при псориазе // Т.М. Караваева, Б.С. Хышиктуев, Е.В. Фалько // Бюллетень Восточно-сибирского научного центра СО РАМН. – 2008. – №2. – С. 18-19.
2. Минушкин О.Н. Возможности и перспективы изучения короткоцепочечных жирных кислот при патологии желудочно-кишечного тракта на примере заболеваний кишечника и органов гепатобилиарной системы / О.Н. Минушкин, М.Д. Ардатская // Клиническая лабораторная диагностика. – 2004. – № 2. – С. 19–36.
3. Роль сфингомиелина и церамида в регуляции процессов пролиферации и апоптоза клеток гепатоцеллюлярной карциномы / Заварзин В.А. [и др.] // Сибирский онкологический журнал. – 2006. – №4. – С.41-45
4. Хышиктуев Б.С. Патогенетические аспекты участия жирных кислот в опухолевом процессе // Б.С. Хышиктуев, Е.В. Каюкова Забайкальский медицинский вестник. –2013. – N 2. – С. 166-181. - Режим доступа: <http://medacadem.chita.ru/zmv>
5. Уразова Л.Н. Рак шейки матки и вирусы папилломы: этиопатогенетические аспекты (обзор литературы) / Л.Н. Уразова, И.Г. Видяева // Сибирский онкологический журнал. – 2009. – №1 №31). – С. 64-71.
6. New molecular targets against cervical cancer / A. Duenas-Gonzalez [et al.] // Int J Womens Health. – 2014. – № 6. – P. 1023-1031.

Рецензенты:

Хышиктуев Б.С., д.м.н., профессор, зам. генерального директора по инновациям ООО «Медиком», г. Москва;

Патеюк А.В. д.м.н., профессор кафедры социальной работы ФГБОУ ВПО «Забайкальский государственный университет», г. Чита.