

Визначення концентрації фосфоліпідів в сироватці крові хворих на рак шлунка за допомогою ^{31}P ЯМР спектроскопії

Л.М. Бубновська, В.М. Михайленко,
А.В. Ковельська, С.П. Меренцев,
Д.С. Осинський

Інститут експериментальної патології,
онкології і радіобіології
ім. Р.Є. Кавецького НАН України
Київський міський клінічний
онкологічний центр, м. Київ,

Зміни метаболізму мембран пухлинної клітини, взаємодія пухлини з організмом та мембрано-асоційовані функції ліпідів є важливими аспектами метаболізму пухлини, її росту та прогресії. Фосфоліпіди, як важливі компоненти клітинних мембран, залучені в процеси, тісно пов'язані з клітинною проліферацією, злоякісною трансформацією, агресивністю, метастазуванням, загибеллю клітин та їх чутливістю до терапії.

Відомо, що у пухлинах порівняно з нормальними тканинами спостерігаються більш високі концентрації фосфоліпідів, які зростають на протязі росту пухлини та її прогресії. Збільшення внутрішньопухлинного пулу фосфоліпідів асоціюється з посиленням синтезу мембран, ростом клітин і станом клітинного живлення. В останні роки доведено, що як зміни в сигнальних шляхах, так і знижений рівень оксигенації в пухлинній тканині також роблять свій внесок в підвищення рівня фосфоліпідів [10]. Пухлина, в свою чергу, впливає на системний метаболізм ліпідів та фосфоліпідів, що знаходить своє відображення в рівнях фосфоліпідів в крові і кістковому мозку.

В ряді досліджень були виявлені системні зміни ліпідів (фосфоліпідів) в плазмі, сироватці периферичної крові у хворих на рак щитовидної залози [14], нирки [15], прямої та товстої кишки, рак підшлункової залози [3], а також у хворих на злоякісні захворювання системи крові (гостра лейкемія, множинна мієлома, злоякісна лімфома [17]). На підставі отриманих даних була показана можливість проведення моніторингу ефективності лікування та оцінки захворювання.

Такі нові підходи до біохімічних та клінічних досліджень могли бути зроблені тільки завдяки впровадженню магнітно-резонансної спектроскопії. Вона відкрила нові шляхи для дослідження змін, які відбуваються в пухлині, а саме, в визначенні рівня фосфоліпідного та ліпідного метаболізму.

Прогноз ефективності лікування хворих на злоякісні пухлини і оцінка можливості прогресії пухлинного процесу залишаються незадовільними. Тому питання пошуку прогностичних факторів є дуже актуальним. Загально визнано, що концентрація холін-вмісних сполук є маркером зміненого фосфоліпідного метаболізму мембран клітин, характерного для всіх типів злоякісних пухлин. Загальноприйняті кількісні аналізи фосфоліпідів виконуються з використанням багату-ступеневих методів TLC (тонкошарова хроматографія) або HPLC (рідинна хроматографія високого тиску). Слід зазначити, що вони забирають багато часу, вимагають відповідних стандартів та чутливих детекторів.

Кількісне визначення фосфоліпідів за допомогою ЯМР аналізу дає можливість отримати значення концентрації фосфоліпідів без складної попередньої обробки проб, великої кількості стандартних сполук та детекторів. Дані, отримані за допомогою ЯМР спектроскопії, узгоджуються з такими, які отримані за допомогою TLC, HPLC або ферментативного методу. Метод ЯМР спектроскопії характеризується високою точністю та відтворюваням. ^{31}P ЯМР спектроскопія, як було показано, є важливим методом дослідження патологічних змін концентрацій фосфоліпідів, зокрема таких основних класів фосфоліпідів, як PC (фосфохолін), LPC лізофосфатиділхолін), SM+PE (сфінгомелін+фосфатиділетаноламін).

В низці оглядів щодо використання ЯМР вперше були наведені значні зміни рівня фосфоліпідних метаболітів в низці експериментальних пухлин та новоутворень людини [9,10,13]. Аналіз великої кількості клінічних результатів, отриманих за допомогою ^{31}P ЯМР, дозволив прийти до висновку, що найбільш частими рисами спектрів пухлин людини (остеосаркома, саркома м'яких тканин, лімфома, пухлини голови та шиї, рак грудної залози, первинний і метастатичний рак печінки, лімфоми печінки і селезінки, аденокар-

цинома передміхурової залози, за виключенням пухлин мозку) є високі сигнали фосфоліпідів, які відображають обмін фосфоліпідів клітинних мембран, а саме: PC, PE, гліцерофосфохоліну (GPC), гліцерофосфоетаноламіну (GPE).

Значне зниження рівня PC та PE в пухлинах спостерігали у відповідь на протипухлинну терапію як в експерименті, так і в клініці [9]. Ці спостереження визначили інтерес до дослідження наявності та модуляції сигналів фосфоліпідів на ^{31}P ЯМР-спектрах різних пухлин людини та оцінки значення їх як можливих індикаторів злоякісності і відповіді пухлини на терапевтичний вплив [10]. Було встановлено, що рівень фосфохоліну може слугувати метаболічним маркером прогресії раку грудної залози [11]. Важливо, що зниження інтенсивності PME-сигналу (фосфомоноестери) або співвідношення PME/PDE (фосфомоноестери/фосфодіестери), яке спостерігається вже на ранніх термінах лікування, є надійним показником відповіді пухлини на променево- або хіміотерапію. Співвідношення PME/PDE відтворює репараційні процеси у мембрані, що мають місце в пухлинних клітинах у період їх відновлення після цитостатичного впливу [5]. Крім того, були отримані дані, які вказали на прямий зв'язок між величиною співвідношення PME/PDE і метастазуванням у хворих на саркоми м'яких тканин та рак грудної залози. Важливим при цьому виявилась прогностична значущість цього співвідношення [12].

Наші попередні дослідження показали, що метаболічні співвідношення PME/PDE і PE/PC в первинному раку шлунка людини можуть слугувати як фактори прогнозу перебігу захворювання та надавати додаткову інформацію, яка може бути корисною при первинному діагнозі з використанням ^{31}P ЯМР *in vivo* [1]. Останнім часом показано, що ^{31}P ЯМР спектроскопія може бути застосована і для спостереження за змінами концентрації фосфоліпідів в плазмі і сироватці периферичної крові, екстрактах мононуклеарів як периферичної крові, так і кісткового мозку [4].

Мета роботи – оптимізувати методику визначення концентрації фосфоліпідів в сироватці крові хворих на рак шлунка за допомогою ^{31}P ЯМР спектроскопії для виявлення наявності кількісних системних змін рівня фосфоліпідів у хворих у порівнянні з практично здоровими людьми (донорами), та встановити значущість таких змін у якості факторів прогнозу ефективності лікування та можливого рецидивування.

Матеріал та методи

Досліджували периферичну кров від 35 хворих на рак шлунка на різних стадіях захворювання, 7 донорів та одного хворого на виразку шлунка. В групу «ремісії» увійшли хворі, які дали свою згоду на повторне обстеження. Матеріал отримували в Київському міському клінічному онкологічному центрі. Всі пацієнти та донори були проінформовані про обстеження та дали свою згоду.

^{31}P ЯМР спектри були виміряні на спектрометрі Mercury-300 BB (Varian, USA), що обладнаний Sparscs station 4, при 121,5 MHz, ширині імпульсу – 45° , зі спектральною шириною 12000 Hz; лінійне розширення – 10 Hz; та спектрометрі Bruker 400MHz (Widebore Ultrashield, AV-400 electronics, Germany) при 161,976 MHz зі спектральною шириною 64724,9 Hz; ширина імпульсу – 90° , лінійне розширення – 10 Hz, з використанням 5 мм пробірок.

Відомо, що весь спектр фосфоліпідів розміщується на ^{31}P ЯМР-шкалі в області сигналу ортофосфорної кислоти H_3PO_4 [0,00 ppm] у дуже вузькому діапазоні, тому необхідно мати такий зовнішній стандарт, який би не втручався в спектр фосфоліпідів і мав своє постійне місце на ^{31}P ЯМР-шкалі.

Таким стандартом слугувала метилендіфосфонієва кислота (MDPA) (Sigma, USA), яка знаходилася в запаяному капілярі в пробірці зі зразком і мала своє постійне місце на шкалі, а саме – 16,73 ppm по відношенню до 85%-го розчину ортофосфорної кислоти, і, таким чином, фосфорний резонанс MDPA не інтерферує з сигналами фосфоліпідів. Інтенсивність сигналів підраховували відповідно до сигналу MDPA: для отримання абсолютної концентрації фосфоліпідів сигнали фосфоліпідів інтегрувалися відносно 11,14 μM розчину MDPA в капілярі, як референтного сигналу, що дає змогу отримати молярну концентрацію кожного фосфоліпиду на ^{31}P ЯМР спектрі.

Сироватку крові отримували після центрифугування (3600 об/хв, 20 хв) загальноприйнятим методом і зберігали при 4°C . Вимірювання проводилося на протязі 24 годин після отримання матеріалу. Для більш чіткого розділення сигналів фосфоліпідів сироватки на ^{31}P ЯМР спектрах у якості найбільш ефективної була вибрана система розділення, а саме натрієва сіль холінової кислоти (50 w/v in D_2O) в кінце-

вій концентрації 0,12 М, яку додавали до 0,9 мл сироватки перед ^{31}P ЯМР аналізом [2].

Це явище має під собою фізико-хімічне підґрунтя. Фосфоліпіди диспергуються відповідним детергентом в суміш міцел, і таким чином отримується більш чітке розділення сигналів на ^{31}P ЯМР спектрах, а саме – в цих міцелах фосфоліпідна організація змінюється з анізотропної в ізотропну.

Для ідентифікації розташування фосфоліпідів на ^{31}P ЯМР-шкалі використовували наступні стандарти фосфоліпідів (Sigma, USA):

L- α -phosphatidylcholine from egg yolk, lyophilized powder (PC),

β -acetyl- γ -O-alkyl-L- α -phosphatidylcholine from bovine heart lecithin, lyophilized powder (CPLAS),

L- α -Lysophosphatidylcholine from egg yolk, powder (LPC),

Sphingomyelin from bovine brain, powder (SM),

L- α -phosphatidylethanolamine *Escherichia coli*, lyophilized powder (PE),

L- α -phosphatidylinositol sodium salt from Glycine max (soybean) (PI).

Ідентифікація сигналів фосфоліпідів на ^{31}P ЯМР спектрах відбувається наступним чином: спочатку отримують ^{31}P ЯМР спектри всіх окремих індивідуальних стандартних фосфоліпідів для того, щоб встановити хімічні зсуви [δ ppm] цих сполук на ^{31}P шкалі. Коли хімічні зсуви кожного стандартного фосфоліпіду встановлені, знімають спектр суміші всіх стандартних сполук. У табл. 1 надані хімічні зсуви ^{31}P сигналів фосфоліпідів і MDPA по відношенню до ортофосфорної кислоти (0.00 ppm).

Після цього отримують низку ^{31}P ЯМР спектрів біологічного зразку (екстрактів сироватки крові), далі до зразків додають кожен зі стандартних фосфоліпідів окремо або по декілька і знову знімають спектр. Посилення будь-якого сигналу інтегральної інтенсивності на ^{31}P спектрі біологічного зразку вказує на те, що в цьому місці знаходиться ^{31}P хімічний зсув того фосфоліпіду, який був доданий. Таким чином, було встановлено місцезнаходження всіх фосфоліпідів на ^{31}P ЯМР-шкалі.

Таблиця 1.

Хімічні зсуви ^{31}P сигналів фосфоліпідів и MDPA по відношенню до ортофосфорної кислоти (0.00 ppm).

Фосфоліпід	PC	CPLAS	LPC	SM	PE	PI	MDPA
δ [ppm]	0,08	0,12	0,76	1,02	1,18	1,19	16,74

Підрахування концентрації фосфоліпідів (C), базуючись на інтегральній інтенсивності сигналу (I), проводилося наступним чином [16]: використовували співвідношення:

$$C_{\phi} / C_{\text{MDPA}} = f \cdot I_{\phi} / \frac{1}{2} I_{\text{MDPA}},$$

де: C_{ϕ} и C_{MDPA} – концентрація даного фосфоліпіда і MDPA,

I и $\frac{1}{2} I_{\text{MDPA}}$ – інтегральна інтенсивність фосфоліпіда і MDPA,

f – постійний коефіцієнт поправки.

Коефіцієнт поправки обчислюється, виходячи з експериментальних даних, а саме: капіляр з MDPA ($1,114 \cdot 10^{-2}$ М) занурюється в ЯМР пробірку з ортофосфорною кислотою ($1,114 \cdot 10^{-2}$ М), знімаються ^{31}P спектри, з яких визначаються місцезнаходження сигналу зовнішнього стандарту MDPA і його інтеграл по відношенню до ортофосфорної кислоти (0.00 ppm) (рис. 1).

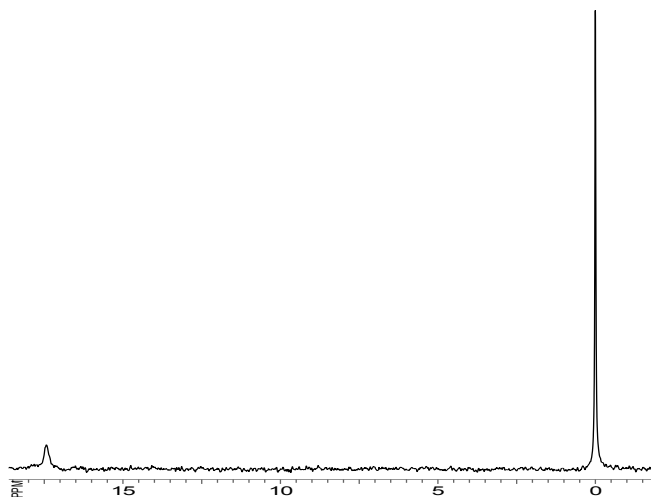


Рис. 1. ^{31}P ЯМР спектр зовнішнього стандарту MDPA ($1,114 \cdot 10^{-2}$ М) по відношенню до ортофосфорної кислоти (0.00 ppm).

На рис. 2 і 3 представлені ^{31}P ЯМР спектри як індивідуальних стандартних фосфоліпідів: PC та LPC так і суміш: PC, LPC, SM, PE, PI по відношенню до MDPA, де чітко видно, що вони розташовуються на ЯМР шкалі один за одним, відповідно.

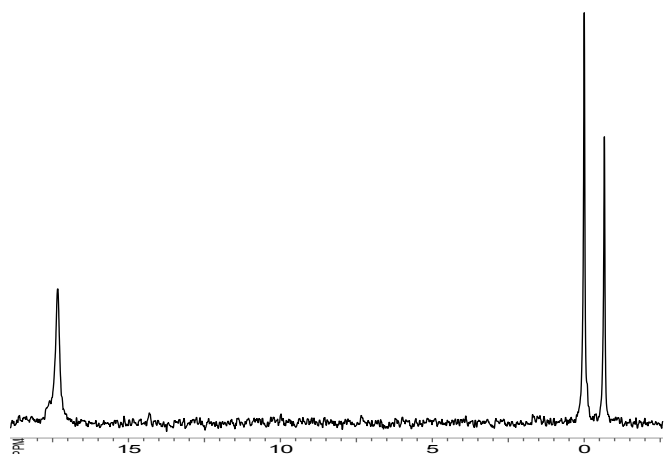


Рис. 2. ³¹P ЯМР спектр індивідуальних стандартних фосфоліпідів: PC та LPC (представлена копія спектру з оригінального запису).

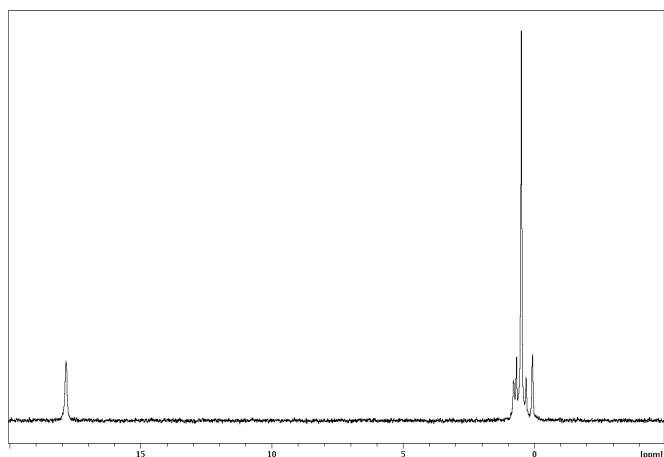


Рис. 3. ³¹P ЯМР спектр індивідуальних стандартних фосфоліпідів: PC, LPC, SM, PE, PI по відношенню до MDPA (представлена копія спектру з оригінального запису).

Результати та їх обговорення

Використовуючи формулу обчислення, були підраховані концентрації всіх фосфоліпідів, які реєструються на ³¹P ЯМР спектрах сироватки крові хворих на рак шлунка. В табл. 2 представлені середні концентрації фосфоліпідів в сироватці крові хворих на рак шлунка. Чітко видно, що концентрація як PC+CPLAS, LPC, так і SM+PE знижується у хворих на рак шлунка порівняно з такою, яка реєструється у донорській сироватці. З даних видно, що найбільше значне зниження відбувається з концентрацією LPC у хворих на рак шлунка у порівнянні з сироваткою донорів (на 69%; $p < 0,05$). Зниження ж концентрацій PC + CPLAS відбувалося на 37,6% і SM+PE – на 26,7%, відповідно.

В стані ремісії спостерігається збільшення концентрації порівняно з такою, що була у хворих до оперативного втручання. Концентрація окремих фосфоліпідів може досягати навіть рівня, який спостерігається в нормальній сироватці, але, якщо концентрація LPC почала знижуватись, є реальна загроза виникнення рецидиву. Крім того, прогностичне навантаження має також і сума концентрацій всіх фосфоліпідів, як показник стану хворого.

Таким чином, було встановлено, що концентрації як PC, LPC, так і SM+PE знижуються в сироватці крові у хворих на рак шлунка порівняно з такими, які реєструються в донорській сироватці. Найбільш чутливим до змін виявився лізофосфатиділхолін (LPC) на відміну від даних, отриманих для хворих на злоякісні захворювання крові, де спостерігалось драматичне зниження всіх досліджених фосфоліпідів [16,17]. Приймаючи до уваги досить значні коливання концентрації фосфоліпідів в сироватці крові у кожній практично

Таблиця 2.

Середня концентрація фосфоліпідів у сироватці кров хворих на рак шлунка і донорів ($M \pm m$).

Групи хворих	Фосфоліпід (mmol/l)			
	PC + CPLAS	LPC	SM + PE	Сумма
Хворі на рак шлунка (до операції)	1,173±0,234	0,110±0,080*	0,329±0,065	1,612
Хворі на рак шлунка (безрецидивний період)	1,773±0,153	0,254±0,135	0,455±0,084	2,482
Донори	2,260±0,378	0,354±0,066	0,495±0,169	3,109
Хворий на виразку шлунка	2,255	0,269	0,654	3,178

Примітка: * – $p < 0,05$ у порівнянні з показниками сироватки крові донорів.

здоровій людині, треба зауважити, що цей метод є більш інформативним за умов індивідуального обстеження хворого. Приймаючи рівень фосфоліпідів донорської сироватки як базовий, при аналізі змін концентрації фосфоліпідів хворих в стані ремісії треба звертати увагу на те, яка концентрація того чи іншого фосфоліпіда була у хворого до операції чи проведеної терапії. Крім того, і суму концентрацій всіх фосфоліпідів, як показник стану хворого, треба брати до уваги [6].

Лізофосфатиділхолін (LPC) – це сполука, яка приймає участь в дуже багатьох як фізіологічних, так і патофізіологічних процесах в організмі. Але одним із самих важливих проявів його функціонування є те, що, як було встановлено зовсім недавно, з LPC утворюється лізофосфатидна кислота (LPA) – найбільш простий природний фосфоліпід, який є надзвичайно біоактивним, зокрема він робить свій вагомий внесок в процес ініціації розвитку пухлини, її прогресії та метастазування [7].

Процес утворення LPA з LPC проходить за участю так званого екто-ферменту, “загадкового ферменту”, який локалізований на зовнішній мембрані клітини (в основному він залучений в метаболізм молекул в інтерстиціальній рідині та в кров’яному руслі). “Загадковий фермент” виявився аутоаксином (ATX) і функціонує, продукуючи LPA в клітинне мікрооточення з подальшим її функціонуванням в метастатичному каскаді, а саме: це стимуляція клітинної проліферації, загоєння рани, продукція ендотеліну і про-ангіогенних факторів (VEGF), інтерлейкінів (IL-6, IL-8), які можуть діяти як паракринні фактори росту для злоякісних клітин і змінювати *in vivo* їх мікрооточення, посилювати неоваскуляризацію і продукцію або активацію протеаз, таких як урокіназа активатору плазміногену (uPA), металопротеїназ, зокрема ММП-2, та металопротеїназа-дезінтегринного фактора некрозу пухлини- α (TACE) [8].

Таблиця 3.

Концентрація фосфоліпідів в сироватці крові хворих на рак шлунка у різних стадіях захворювання (mmol/L; M \pm m).

Стадія захворювання	PC	LPC	PE+SM	Сума PL
I	1,532 \pm 0,278	0,178 \pm 0,070	0,328 \pm 0,024	2,038 \pm 0,109
II	1,282 \pm 0,116	0,115 \pm 0,095	0,312 \pm 0,055	1,709 \pm 0,054
III	1,200 \pm 0,095	0,119 \pm 0,047	0,320 \pm 0,041	1,639 \pm 0,80
IV	0,953 \pm 0,116	0,090 \pm 0,067	0,262 \pm 0,064	1,305 \pm 0,097

Було також встановлено, що не спостерігається будь-якої залежності концентрації фосфоліпідів в сироватці крові хворих на рак шлунка від їх клініко-патологічних характеристик. При цьому треба відмітити, що деяка тенденція визначалась тільки для хворих з різними стадіями захворювання. У хворих у IV-й стадії захворювання спостерігається досить значне падіння концентрації як окремих фосфоліпідів, так і їх загальної суми (табл. 3).

Відомо, що ^{31}P ЯМР спектри екстрактів біологічного матеріалу представляють хімічний аналіз всіх фосфоромісних сполук цього матеріалу (рис. 4). На спектрі чітко видно розділення сигналів PC, LPC, SM+PE та навіть невеличкий PI. CPLAS є дуже близьким похідним від PC, але його теж видно, як плече на сигналі PC.

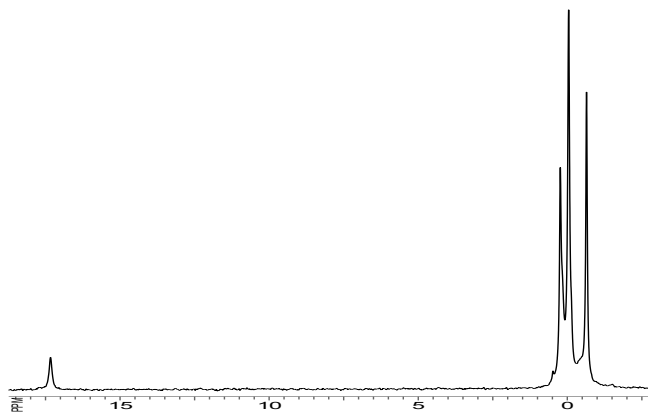


Рис. 4. ^{31}P ЯМР спектр екстракту сироватки крові донора (представлена копія спектру з оригінального запису).

На рис. 5 наданий спектр сироватки крові донора. Слід зазначити, що спектр фосфоліпідів відтворює картину спектру, отриманого на екстрактах сироватки крові з чітким розділенням сигналів фосфоліпідів. Це дає можливість визначати їх інтегральну величину і обчислювати їх

концентрації. Відсутність сигналів PI та CPLAS пояснюється тим, що в нативній сироватці ці метаболіти, знаходячись в дуже незначних концентраціях, не реєструються приладом.

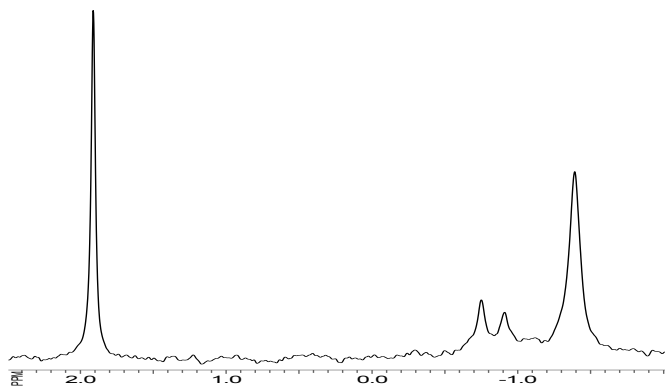


Рис. 5. ^{31}P ЯМР спектр сироватки крови донора (представлена копія спектру з оригінального запису).

На рис. 6 і 7 представлені спектри фосфоліпідів сироватки крови хворого (Р.Д.І.) на рак шлунка до оперативного втручання і в стану ремісії, відповідно. Привертає до себе увагу майже повна відсутність сигналу LPC у хворого до операції і поява його в стану ремісії.

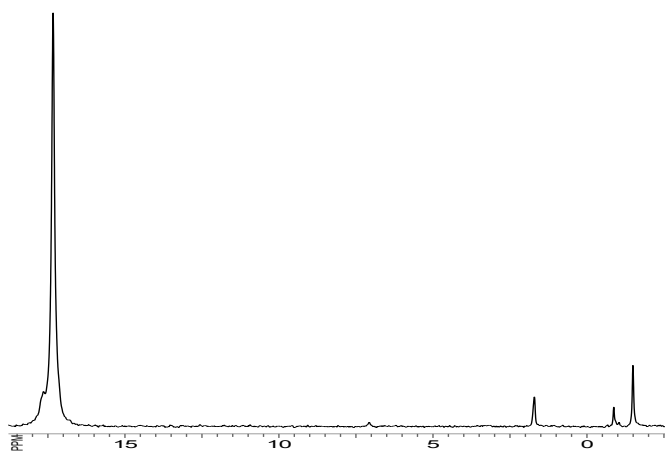


Рис. 6. ^{31}P ЯМР спектр фосфоліпідів сироватки крови хворого (Р.Д.І.) на рак шлунка до оперативного втручання, (представлена копія спектру з оригінального запису).

Отримані дані вказали на те, що метод визначення концентрації фосфоліпідів в сироватці крови хворих є більш інформативним за умов моніторингу кожного окремого хворого. У якості приклада надаються дані щодо складу фосфоліпідів периферичної крови окремого хворого

(Г.Е.В.), який знаходиться під спостереженням з 2008 року. За цей час було проведено 3 обстеження (до лікування і два рази після первинного обстеження) для визначення концентрації фосфоліпідів у сироватці периферійної крови.

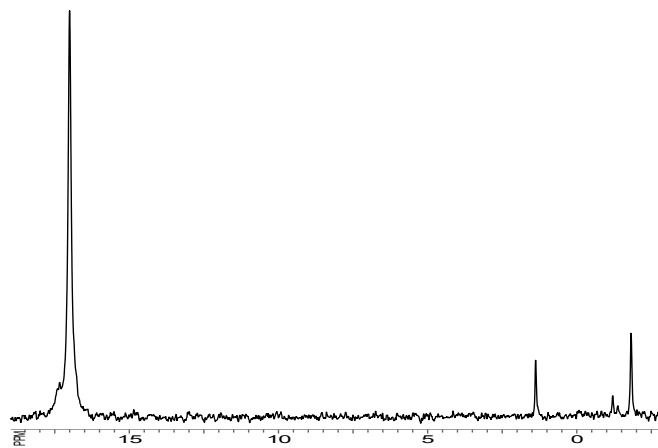


Рис. 7. ^{31}P ЯМР спектр фосфоліпідів сироватки крови хворого (Р.Д.І.) на рак шлунка у стані ремісії (представлена копія спектру з оригінального запису).

Слід зазначити, що у цього хворого у кістковому мозку дисеміновані пухлинні клітини не були виявлені до лікування, але були виявлені (від $1,0$ до $3,0/10^6$ мононуклеарів) при обстеженні кісткового мозку у 2010, 2012 і 2013 роках. Концентрація ж фосфоліпідів при цьому залишалася на рівні, близькому до нормального, і майже на незмінному: PC– 1,492,1580,1,557mmol/l; LPC– 0,170,0,213, 0,197 mmol/l; SM+PE–0,447,0,442, 0,343 mmol/l, відповідно. Вірогідно, і в подальшому стан хворого може бути простежений на підставі визначення концентрації фосфоліпідів у сироватці периферійної крови без дослідження кісткового мозку, і поки концентрація LPC або сума фосфоліпідів будуть залишатися на приблизно постійному рівні, хворий Г.Е.В залишатиметься у задовільному стані, що і спостерігається до цього часу. Можна припустити, що у даному випадку концентрація фосфоліпідів є своєрідним показником «сплячого» стану пухлинних клітин у кістковому мозку.

На рис. 8 представлений спектр фосфоліпідів сироватки крови хворого (Е.Ф.Г) на рак шлунка до оперативного втручання. Хворий був прооперований в 2008 році і знаходився в стані ремісії. Протягом цього часу у хворого не було виявлено жодної пухлинної клітини у кістковому мозку і він почувався задовільно.

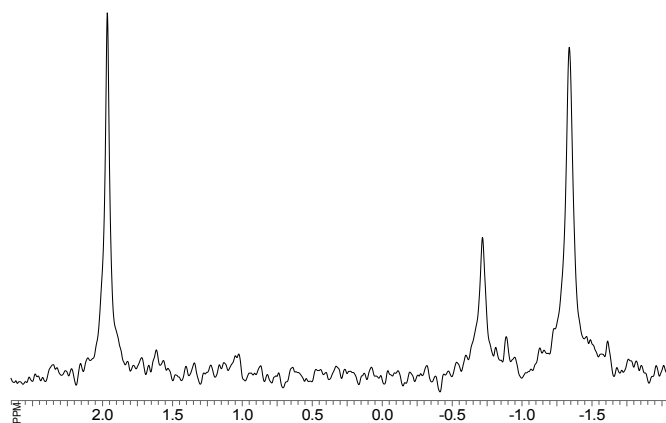


Рис. 8. ^{31}P ЯМР спектр фосфоліпідів сироватки крові хворого (Е.Ф.Г.) на рак шлунка до оперативного втручання (представлена копія спектру з оригінального запису).

На даний час визначення концентрації фосфоліпідів в сироватці крові показало значне зниження концентрації LPC, що свідчить про зміни стану хворого, які є для нього несприятливими. Це припущення підкріплюється тим, що у кістковому мозку хворого були знайдені пухлинні клітини. Таким чином, можна констатувати, що цей хворий вже знаходиться в групі ризику рецидиву захворювання, незважаючи на задовільний стан, і потребує спеціального контролю.

Висновки

^{31}P ЯМР спектроскопія може бути використана як простий та швидкий метод визначення змін концентрації фосфоліпідів у сироватці крові хворих на рак шлунка. На ^{31}P ЯМР спектрах сироватки крові цих хворих виявлено зниження рівня фосфоліпідів у порівнянні з таким у крові донорів. LPC виявився найбільш чутливим індикатором ефективності терапії, що використовувалась, і може слугувати прогностичним фактором перебігу захворювання. Моніторинг змін концентрації фосфоліпідів у крові може бути важливим в уточнюючій діагностиці, в контролі за ефективністю індивідуальної терапії, в передбаченні прогресування пухлинного процесу.

Література

1. Прогностичне значення метаболічних співвідношень у тканині раку шлунка людини, визначених ЯМР-спектроскопією перхлорних екстрактів /

Л. М. Бубновська, А. В. Ковельська, І. С. Болдескул [та ін.] // Променева діагностика, променева терапія. – 2010. – №1. – С. 13-22.

2. An alternative expeditious analysis of phospholipid composition in human blood plasma by ^{31}P NMR spectroscopy / S. Bradamante, E. Barchiesi, L. Barebghi [et al.] // Anal Biochem. – 1990. – V. 185. – P. 299 – 303.

3. Application of ^{31}P NMR spectroscopy in clinical analysis of changes of serum phospholipid in leukemia, lymphoma and some other non-hematological cancers / M. Kuliszkiwicz-Janus, W. Janus, S. Baczyński [et al.] // Anticancer Res. – 1996. – V. 16. – P. 1587-1594.

4. Application of ^{31}P magnetic resonance spectroscopy to observation of phospholipid concentration changes in blood serum, plasma, peripheral blood mononuclear cells and bone marrow mononuclear cells from patients with hematological cancer – a methodological review / M. A. Tuz, M. Kuliszkiwicz-Janus, S. Baczyński [et al.] // Polish J Chem. – 2006. – V. 80. – P. 1009-1019.

5. Choline phospholipid metabolism: a target in cancer cells? / E. Ackerstaff, K. Glunde, Z. M. Bhujwala // Cell Biochem. – 2003. – V. 90. – P. 525-533.

6. Expanding the use of magnetic resonance in the assessment of tumor response to therapy: Workshop Report / J. Evelhoch, M. Garwood, D. Vigneron [et al.] // Cancer Res. – 2005. – V. 65. – P. 7041-7044.

7. Lisophosphatidilcholine (LPC) as a pharmacological molecule for the reduction of tumor cell adhesion and metastasis / J. Alexander, M. Schlesinger, P. Jantscheff [et al.] // Int J Clin Pharmacol Therapeutics. – 2011. - V. 49. – P. 75-77.

8. Mills G. B. The emerging role of lisophosphatidic acid in cancer / G. B. Mills, H. Moolenaar // Nat Rev Cancer. – 2003. – V. 3. – P. 583-591.

9. Negendank W.G. Studies of human tumors by MRS: a review / W. G. Negendank // NMR Biomed. – 1992. – V. 5. – P. 303-324.

10. Podo F. Tumor phospholipid metabolism / F. Podo // NMR Biomed. – 1999. – V. 12. – P. 413-439.

11. Pyruvate utilization, phosphocholine and adenosine triphosphate (ATP) are markers of human breast tumor progression: a ^{31}P and ^{13}C -nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy study / Singer S., Souza K., Thilly W.G. [et al.] // Cancer Res. – 1995. – V. 55. – P. 5140-5145.

12. Relation between pO_2 , ^{31}P magnetic resonance spectroscopy parameters and treatment outcome in patients with high-grade soft tissue sarcomas treated with thermoradiotherapy / M. W. Dewhirst, J. M. Poulson, L. Sanders [et al.] // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. – 2005. – V. 61. – P. 480-491.

13. Ruiz-Cabello J. Phospholipid metabolites as indicators of cancer cell function / J. Ruiz-Cabello, J. S. Cohen // NMR Biomed. – 1992. – V. 5. – P. 226-233.

14. Systemic alterations in phospholipid concentrations of blood plasma in patients with thyroid carcinoma: an in vitro ^{31}P high-resolution NMR study / K. Rafflet, D. Moka, F. Süllentrop [et al.] // NMR Biomed. – 2000. – V. 13. – P. 8-13.

15. ^{31}P NMR spectroscopy of blood plasma: determination and quantification of phospholipid classes in patients with renal cell carcinoma / F. Süllentrop, D. Moka, S. Neubauer, G. Haupt [et al.] // NMR Biomed. – 2002. – V. 15. – P. 60-68.

16. ^{31}P MRS analysis of the phospholipid composition of normal human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) / M. Kuliszkiwicz-Janus, M. A. Tuz, S. Baczyński [et al.] // Cell Mol. Biol. Lett. – 2005. – V. 10. – P. 373-382.

17. ^{31}P MRS analysis of the phospholipid composition of the peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and bone marrow mononuclear cells (BMMC) of patients with acute leukemia (ASL) / M. Kuliszkiwicz-Janus, M. A. Tuz, M. Kielbiński [et al.] // Cell Mol. Biol. Lett. – 2009. – V.14. – P. 35-45.

ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ ФОСФОЛІПІДІВ У СИРОВАТЦІ КРОВІ ХВОРИХ НА РАК ШЛУНКА ЗА ДОПОМОГОЮ ^{31}P ЯМР СПЕКТРОСКОПІЇ

*Л.М. Бубновська, В.М. Михайленко,
А.В. Ковельська, С.П. Меренцев,
Д.С. Осинський*

Мета роботи – оптимізувати метод визначення концентрації фосфоліпідів у сироватці крові хворих на рак шлунка за допомогою ^{31}P ЯМР спектроскопії та визначити його клінічне значення.

Матеріал і методи. Досліджена сироватка крові 35 хворих на рак шлунка, 7 донорів і одного хворого на виразку шлунка. Концентрацію фосфоліпідів у крові визначали за допомогою ^{31}P ЯМР спектроскопії.

Результати. Встановлено, що у сироватці крові хворих на рак шлунка найбільш помітні зміни демонструє лізофосфатиділхолін (ЛФХ), концентрація якого значно падає у порівнянні з сироваткою донорської крові. Показано, що концентрація ЛФХ може бути важливим фактором контролю перебігу захворювання, зокрема появи рецидиву захворювання.

Ключові слова: рак шлунка, сироватка крові, фосфоліпідів, ^{31}P ЯМР спектроскопія.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ФОСФОЛИПИДОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ БОЛЬНЫХ РАКОМ ЖЕЛУДКА С ПОМОЩЬЮ ^{31}P ЯМР СПЕКТРОСКОПИИ

*Л.Н. Бубновская, В.М. Михайленко,
А.В. Ковельская, С.П. Меренцев, Д.С. Осинский*

Цель работы – оптимизировать метод определения концентрации фосфолипидов в сыворотке крови больных раком желудка с помощью ^{31}P ЯМР спектроскопии и определить его клиническое значение.

Материал и методы. Исследована сыворотка крови 35 больных раком желудка, 7 доноров и одного больного язвой желудка. Концентрацию фосфолипидов в крови определяли с помощью ^{31}P ЯМР спектроскопии.

Результаты. Установлено, что в сыворотке крови больных раком желудка наиболее заметные изменения претерпевает лизофосфатидилхолин (ЛФХ), концентрация которого значительно падает по сравнению с сывороткой донорской крови. Показано, что концентрация ЛФХ может быть важным фактором контроля течения заболевания, в частности появления рецидива заболевания.

Ключевые слова: рак желудка, сыворотка крови, фосфолипиды, ^{31}P ЯМР спектроскопия.

DETERMINATION OF PHOSPHOLIPIDS CONCENTRATION IN BLOOD SERUM OF GASTRIC CANCER PATIENTS BY ^{31}P NMR SPECTROSCOPY

*L.N. Bubnovskaya, V.M. Mikhailenko,
A.V. Kovelskaya, S.P. Merentsev, D.S. Osinsky*

The aim of study – to optimize the method of determination of phospholipids concentration in serum of patients with gastric cancer and evaluate its clinical relevance.

Material and methods. The serum of 35 gastric cancer patients, 7 donors and 1 patient with gastric ulcer was investigated. Concentration of phospholipids was determined by ^{31}P NMR spectroscopy.

Results. It was determined that the level of phospholipids in the serum of gastric cancer patients was changed. The concentration of lysophosphatidylcholine (LPC) was significantly decreased in comparison to that in serum of donor's blood. It was shown that LPC concentration may be as a relevant factor for control of disease course, in particular recurrence of tumor process.

Key words: gastric cancer, blood serum, phospholipids, ^{31}P NMR spectroscopy.