

Katarina Živec¹, Kristina Ziherl²

Fluidnost eritrocitnih membran pri rakavih bolnikih – študija z elektronsko paramagnetno resonanco³

Fluidity of Red Blood Cells' Membranes in Cancer Patients – an Electronic Paramagnetic Resonance Study

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: rakavi bolniki, serumski lipidi, elektronska paramagnetna resonanca, fluidnost plazemskih membran, membranske domene, eritrociti

Izhodišče: Porabnostna hipoholesterolemija je na račun hitro delečih se rakavih celic pri bolnikih z rakom pogost in pričakovan pojav. Rakave celice imajo povečano fluidnost plazemskih membran zaradi znižane koncentracije holesterola. Eritrociti so celice brez možnosti lastne sinteze lipidov. Spremembe koncentracije serumskih lipidov se lahko kažejo v lipidni sestavi membrane eritrocita in posledično v fluidnosti membrane.

Namen: Primerjava fluidnosti membran eritrocitov pri rakavih bolnikih in pri zdravih kontrolah v odvisnosti od koncentracije serumskih lipidov, vrste, stadija raka in starosti.

Hipoteza: Membrane eritrocitov rakavih bolnikov imajo zaradi pričakovane hipoholesterolemije povečano fluidnost.

Metode: Vključenih je bilo 49 rakavih bolnikov in 25 zdravih kontrol. Fluidnost membran izoliranih eritrocitov smo proučevali z elektronsko paramagnetno resonanco. V membrano smo vgradili spinski označevalec, ki posreduje informacije o fluidnosti membrane v neposredni okolici, kar smo kasneje razbrali iz spektrov. Da bi dodatno dokazali povezavo med vgradnjo holesterola v membrano in fluidnostjo, smo vzorcem eritrocitov zdravih kontrol dodali holesterol in merili posledično spremembo fluidnosti.

Rezultati: Bolniki z rakom v primerjavi z zdravimi kontrolami nimajo povečane fluidnosti membran eritrocitov, v serumu pa imajo pomembno manjše vrednosti serumskih lipidov. Fluidnost membran eritrocitov se premo sorazmerno povečuje z večanjem vrednosti holesterola v serumu. Dodatek holesterola (0,5 M) eritrocitom v poskusu *in vitro* pomembno zviša koncentracijo holesterola v eritrocitnih membranah in pa tudi fluidnost teh membran.

Zaključek: Presenetljiv rezultat, da hipoholesterolemija ne povzroči večje fluidnosti membran eritrocitov, smo razložili z obstojem membranskih domen in pa spremenjenih metabolnih mehanizmov pri rakavih bolnikih. Metoda ni klinično uporabna, primerna pa je za nadaljnje bazične raziskave eritrocitnih membran zaradi dobre korelacije le-teh s spremembami serumskimi lipidi. Poleg lipidov v plazmi bi bilo treba z biokemičnimi postopki meriti tudi dejansko koncentracijo holesterola v eritrocitni membrani.

3

¹ Katarina Živec, štud. med., Klinični oddelek za torakalno kirurgijo, Klinični center, Zaloška 7, 1525 Ljubljana in Inštitut Jožef Štefan, Jamova 39, 1000 Ljubljana.

² Kristina Ziherl, štud. med., Klinični oddelek za torakalno kirurgijo, Klinični center, Zaloška 7, 1525 Ljubljana in Inštitut Jožef Štefan, Jamova 39, 1000 Ljubljana.

³ Delo je bilo nagrajeno s Prešernovim priznanjem študentom za leto 2004.

ABSTRACT

KEY WORDS: cancer patients, serum lipids, electronic paramagnetic resonance, plasma membrane fluidity, membrane domains, erythrocytes

Background: Hypocholesterolemia in cancer patients is a frequent and expected phenomenon. Higher fluidity of plasma membranes (as a result of lower concentration of cholesterol) is a characteristic of most cancer cells. Erythrocytes lack organelles and inner membranes and with that any possibility of endogenous synthesis of lipids. Changes in serum lipid concentration could be shown in the fluidity of erythrocyte cell membranes.

Aim: To compare the fluidity of erythrocyte membranes in cancer patients and in healthy controls in relation to serum lipid concentration, type, stage of cancer and age.

Hypothesis: Hypocholesterolemia in cancer patients is the cause, that erythrocyte membranes have higher fluidity.

Methods: In prospective study we included 49 cancer patients and 25 healthy controls. We studied the membrane fluidity of isolated erythrocytes by the electronic paramagnetic resonance method. In membranes incorporated spin label gives us information (spectrum) about fluidity in the neighborhood. We also added 0.5 M cholesterol to erythrocytes samples from healthy individuals and measured the change in membrane fluidity.

Results: Cancer patients in comparison to healthy controls do not have higher erythrocytes membrane fluidity but they do have significantly lower serum lipid concentrations. Fluidity of erythrocyte membranes is higher in patients with higher total serum cholesterol, HDL and LDL. Addition of cholesterol (*in vitro*) to erythrocytes of healthy individuals significantly increases the concentration of cholesterol in cell membranes and their fluidity as well.

Conclusions: The surprising result that hypocholesterolemia does not cause higher fluidity of erythrocyte membranes we explained with the existence of membrane domains and changes in metabolism in cancer patients. The EPR method is not clinically important; however it could be used for further basic science research for there is very good correlation between fluidity of erythrocytes membranes and serum lipid concentration. It would also be necessary to biochemically measure the real cholesterol concentration in erythrocytes membranes.

UVOD

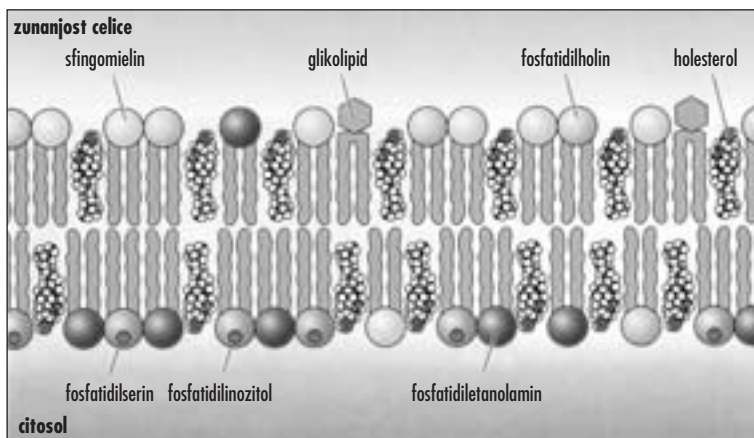
Struktura eritrocitne plazemske membrane: holesterol, izmenjava le-tega s serumskimi lipoproteini, razmerje holesterol/fosfolipidi in fluidnost

Zreli humani eritrociti nimajo jedra, organelov (notranjih membran), zato predstavljajo enega najboljših modelov za študij membran. 50 % teže membrane eritrocita predstavljajo lipidi (fosfolipidi, holesterol, glikolipidi), drugo polovico pa proteini (spektrin, aktin, ankirin, band 4.1, band 3). Glavni fosfolipidi (slika 1), asimetrično razporejeni med polovicama membrane, so fosfatidilholin (lecitin, 29,3 %), sfingomielin (25,5 %), fosfatidilserin (14,9 %) in fosfatidiletanolamin (27,6 %). V zunanji polovici sta predvsem fosfatidilholin in sfingomielin, notranjo polovico pa tvorita večinoma

fosfatidiletanolamin in fosfatidilserin. Glikolipidi so prisotni izključno v zunanjem delu. Nekaj je tudi prostih maščobnih kislin, ni pa trigliceridov niti holesterolnih estrov. Membranske proteine delimo v periferne in integralne (1, 2).

Dve glavni značilnosti fosfolipidnega dvosloja sta neprepustnost za v vodi topne molekule in pa fleksibilnost, dinamičnost membrane ter z njo povezana prosta difuzija lipidov in proteinov v membrani. Še danes splošno priznan izraz za membrano, po modelu Singer-Nicolson, je zato fluidni mozaik (1, 3).

Razmerje holesterol/fosfolipidi (H/F-razmerje) je razmerje med nevtralnimi lipidi (holesterol) in polarnimi lipidi (fosfolipidi in glikolipidi); v eritrocitni membrani je v normalnih razmerah 0,9–1,0. Dejavniki, ki vplivajo na te razlike, so različna koncentracija glikolipidov v membrani, ki tudi raztapljajo



Slika 1. Lipidni dvosloj, prikazani so fosfolipidi, holesterol, glikolipidi.

holesterol (razmerje holesterol proti fosfolipidom in glikolipidom ostane nespremenjeno), preferenca holesterola do ene vrste fosfolipidov in pa tudi medsebojni vplivi med proteini in fosfolipidi, ki tako zmanjšujejo raztapljanje holesterola (4, 5). Preferenca do določenih fosfolipidov je vprašljiva, kajti nekateri so dokazali večjo preferenco do sfgomielina in lecitina in manjšo do fosfatidiletanolamina, nekateri pa so to zanikali (6).

Holesterol se izmenjuje med membrano in plazemskimi lipoproteini, končni ravnotežni delež holesterola pa je odvisen od H/F-razmerja v obeh predelkih. Holesterol in razmerje H/F v lipoproteinih se odraža na razmerju v eritrocitni membrani in je v ravnotežju (4–8). Zanimivo je, da prenos holesterola iz lipoproteinov v membrano ni odvisen od plazemske koncentracije holesterola niti od koncentracije lipoproteinov, ampak od razmerja H/F v LDL oz. v drugih lipoproteinih. Tako eritrociti dobijo holesterol iz lipoproteinov, ki imajo zvišano H/F-razmerje. Upoštevati moramo tudi, da lipoproteini vsebujejo tri- do štirikrat več holesterolnih estrov kot neesterificiranega holesterola, le-ti pa so slabo topni v fosfolipidih in tako nepomembni za membrano eritrocita (6). Izmenjava je izrednega pomena za eritrocite, kajti le-ti nimajo encimov za sintezo holesterola, fosfolipidov oz. za esterifikacijo. Tako imajo dejavniki, ki vplivajo na izmenjavo med lipoproteini in eritrocitnimi membranami, velik pomen pri spremembi fluidnosti membran (4).

Holesterol ima kondenzirajoči, »utrditveni« učinek na membrano, ohranja pa fluidnost (4–12). Zvišana koncentracija holesterola v membrani utrdi acilne verige, hkrati pa zmanjša interakcijo med lipidnimi glavami; obratno je pri znižanju koncentracije (12). Pri višji temperaturi holesterol interreagira z gibajočimi verigami maščobnih kislin ter tako povzroči, da postane zunanji del manj fluiden; obratno je pri znižani temperaturi (1, 8). Zniževanje temperature zmanjšuje fluidnost, večje kot pa je razmerje holesterol/fosfolipidi, večje bo tudi zmanjšanje fluidnosti (9). Holesterol lahko membrano tudi fluidizira, kajti njegova zgradba se bolje prilagodi nenasičenim maščobnim verigam, čeprav pa ima večjo afiniteto do nasičenih (11). Holesterol vpliva tudi na propustnost, osmotsko fragilnost, obliko eritrocita, encimsko aktivnost, površinske receptorje (4, 5, 9).

Fluidnost membrane je proces gibanja molekul v membrani in odraža urejenost lipidnega dvosloja. Je obratnosorazmerna mikrovizkoznosti. Gibanje je zaradi interakcij med steroli in fosfolipidi izrazitejše v sredini lipidnega dvosloja, manjše pa ob stiku z vodno fazo (4, 5, 7). Obstajajo tudi razlike v fluidnosti med zunanji in notranji slojem membrane, in sicer, da je zunanji del manj fluiden; razlaga za to pa naj bi bila, da se holesterol bolj zadržuje v zunanjem delu in pa da obstaja razlika v nenasičenosti fosfatidilholina v primerjavi s fosfatidiletanolaminom in fosfatidilserinom (13, 14). Na fluidnost vpliva še število nenasičenih, nasičenih in dolžina

acilnih verig, H/F-razmerje, tudi delež določenih fosfolipidov (večanje razmerja sfingomielin/lecitin v membrani zmanjšuje fluidnost) (4, 7). Več nenasičenih maščobnih kislin poveča fluidnost (15). Nenasičene maščobne verige močno znižajo utrditveni učinek holesterola, nenasičenost kot taka pa nima pomembnejšega vpliva na zmanjšanje fluidnosti, govori druga študija (16). Znano pa je, da je nižanje fluidnosti vseeno končno, kajti ob H/F več kot 2, se le-ta ne znižuje več. To razlagajo z domenami s takimi oblikami holesterola, ki ne vpliva na fluidnost membrane (6). Ob staranju eritrocitov *in vivo* se razmerje (holesterol + fosfolipidi)/proteini zmanjša, spremenijo se interakcije proteini-lipidi; zmanjša se fluidnost membrane, razmerje H/F pa se ne spremeni (17). S staranjem organizma pa se koncentracija holesterola in fosfolipidov zvišuje, medtem ko ostane razmerje H/F nespremenjeno. Poveča se tudi delež stearinske (18:0) in palmitinske (16:0) kisline v membrani, zmanjša pa delež linolenske (18:2). Saturacijski indeks (glej spodaj) in fluidnost sta znižana (18). Fluidizirajoči učinek imajo tudi amfipatične molekule (mila, alkoholi, detergenti), psihotropna zdravila, lokalni anestetiki, statini (posredno preko znižanja LDL-partiklov kot tudi neposredno učinkovanje na membrano) (4, 19, 20).

Veliko študij je dokazalo, da je fluidnost membran rakavih celic večja kot pri normalnih kontrolah (21–26). Vzrok za povečano fluidnost tumorskih celic bi lahko bila zmanjšana vsebnost holesterola v membrani (21, 22), in sicer zaradi velike porabe hitro se delečih rakavih celic in stalnega izplavljanja membranskih vezikul, ki so bogate z antigeni in holesterolom.

Bolniki z večjo fluidnostjo membran rakavih celic imajo slabšo napoved kot tisti z manjšo fluidnostjo (25); take celice imajo tudi večjo moč metastaziranja.

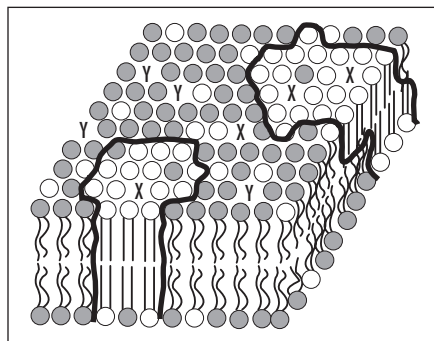
Heterogenost membrane - lipidni rafti

Lipidni rafti (slika 2) ali domene so sestavljeni iz holesterola in sfingolipidov (sfingomielin in glikosfingolipidi), le-ti pa vključujejo tudi različne membranske proteine; odporni so na delovanje z detergenti. Velikost raftov je odvisna od količine holesterola in sfingolipidov v membrani. Med seboj se lahko

združujejo, na to pa vplivajo koncentracije lipidov v okolju. (10). Rafti so pomembni za prevažanje celičnih signalov in pa za ureditev in prenos lipidov in proteinov v membrani (3, 27).

Že omenjeni tekoči mozaik vključuje gel fazo (bolj trdna, lipidi so urejeni in se malo gibljejo, pretežno nasičene maščobne verige) in tekočo fazo (velika gibljivost lipidov, pretežno nenasičene maščobne kisline). Obstaja tudi t. i. vmesno stanje (tekoče urejeno stanje, »liquid-ordered«, opazna je lateralna difuzija), katere nastanek inducira holesterol in s tem lahko prepreči fazne prehode (11). Za prehod iz trdne v tekočo fazo je odločilna tranzicijska temperatura, najvišjo imajo glikosfingolipidi, najnižjo pa fosfatidilholin s pretežno nenasičenimi vezmi (3, 28). Tudi rafti se med seboj lahko ločijo po lastnostih, značilnih za membrane, na prehode med fazami pa vpliva koncentracija holesterola, ki hkrati vpliva tudi na samo tvorbo le-teh (3, 29, 30). Dokazano je, da holesterol povečuje delež gel oz. urejene faze (29), hkrati pa ima preferenco za nasičene lipide (10, 28). Vendar v večini naj bi bili rafti sestavljeni iz urejene faze, ki jo obdajajo bolj fluidne domene z večjim deležem nenasičenih maščobnih kislin (28–30). Če je približno 47 % membrane v gel stanju, se ob dodatku okoli 20–30 % holesterola urejene domene med seboj povežejo, neurejene pa ločijo, tako lahko minimalne spremembe v homeostazi holesterola močno vplivajo na zgradbo membrane (29).

Stabilnost raftov je vprašljiva, kajti zelo hitro pride do izmenjav med deli membrane. To bi lahko tudi imelo vlogo pri celičnem signaliziranju (3, 31). Poudariti je treba, da je večina študij narejena na modelnih membranah.



Slika 2. Prikaz rafta v lipidnem dvosloju.

Elektronska paramagnetna resonanca

Elektronska paramagnetna resonanca (EPR) je spektroskopska metoda, s katero lahko zaznavamo paramagnetne centre v snovi. To so prosti radikali, ioni prehodnih elementov (Cu^{2+} , Fe^{3+} , Co^{2+} ..., običajno kofaktorji encimov) in umetno pripravljene spinski označevalci (angl. *spin labels*). Paramagnetni centri nam omogočajo, da z EPR-metodo opazujemo biokemične procese, degenerativne spremembe v živih tkivih. Mi smo opazovali fluidnost membran eritrocitov.

Osnova EPR-metode je spin elektrona, ki opredeljuje vrtenje elektrona okoli svoje osi in s tem ustvarja okoli sebe magnetno polje. Elektron je tako kot majhen magnet z magnetnim momentom vzporednim osi vrtenja. V biokemičnih snoveh so elektroni večinoma združeni v pare in so tako brez magnetnih momentov. Pri lihem številu elektronov magnetni moment ostane in take molekule imenujemo paramagnetne, mesto v molekuli, kjer je nesparjen elektron pa paramagnetni center.

Ko damo snov s paramagnetnimi centri v magnetno polje, interagirajo magnetni momenti prej poljubno usmerjenih elektronov z magnetnim poljem. Elektroni se sedaj obrnejo paralelno in antiparalelno glede na magnetno polje, le-ti pa imajo nekoliko drugačno energijo. To energijsko razliko merimo z metodo EPR.

Če pa delujemo na to magnetno polje še z energijo elektromagnetnega valovanja (EMV), ki je enaka energijski razliki med nivojema, preidejo elektroni iz enega energijskega nivoja na drugega, posledica tega pa je absorpcija EMV, ki jo zaznavamo z metodo EPR.

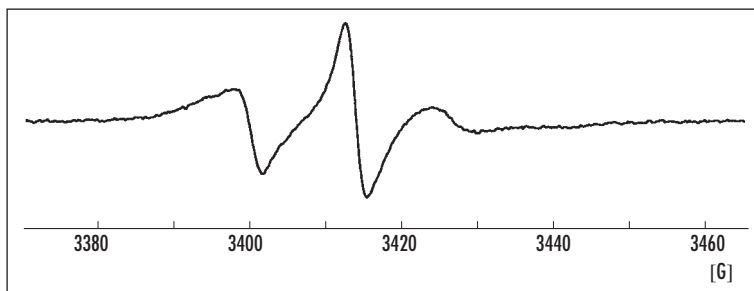
Spinski označevalec za proučevanje bioloških membran se vgradi v membrano in izbiramo jih tako, da je po zgradbi in kemičnih lastnostih čim bolj podoben maščobnim kislinam, saj bo le-tak najbolje pokazal spremembe v lipidnem dvosloju. Je »sredstvo« za oceno viskoznosti lipidov v membrani. Pri naši raziskavi smo uporabili MeFASL (5-doksil metilester palmitinske kisline 10,3).

Iz dobljenega spektra (slika 3) lahko razberemo za fluidnost pomemben ureditveni parameter (S) in rotacijski korelacijski čas (τ_c). Nizka urejenost in hitra dinamika pomenita veliko fluidnost. Parameter S pove povprečni odklon acilnih verig od normalnega dvosloja; ima vrednosti od 0 (nepopolna ureditev, npr. nevizkozna tekočina) do 1 (popolna ureditev). Parameter τ_c pa sporoča čas, v katerem molekule pozabijo svoje prvotno mesto; ima vrednosti od 10^{-11} do 10^{-9} s pri hitri dinamiki (večja fluidnost) in okoli 10^{-7} s pri počasni (manjša fluidnost) (32).

Spremembe eritrocitne membrane pri rakavih bolnikih

Celotni holesterol, LDL, HDL, TGC pri rakavih bolnikih

Rakavi bolniki naj bi imeli zmanjšano serumsko koncentracijo holesterola (23, 33–36). To je bolj izraženo pri mlajših bolnikih in pa moških (35, 37). Vzrok bi lahko bila povečana poraba holesterola zaradi pospešene sinteze membran tumorskih celic zaradi rasti in razmnoževanja (23). Uničenje membran z lipidno peroksidacijo lahko kompenzatorno povzroči večjo uporabo holesterola za sintezo membran (34). Lahko pa gre za povečano aktivnost LDL-receptorjev na tumorskih celicah (35, 36).



Slika 3. Primer tipičnega spektra eritrocitnih membran.

Možno je tudi, da bi bil znižan holesterol dejavnik tveganja za raka (34, 36, 37). Tako se postavlja vprašanje, ali je hipoholesterolemija vzrok ali posledica raka.

Saturacijski indeksi

Saturacijski indeks (SI) je razmerje med koncentracijo stearinske (18:0) in oleinske (18:1 Δ^9) kisline v membrani. Pri tem je pomemben encim Δ^9 -desaturaza, ki pretvori stearinsko kislino v oleinsko (23, 38, 39). Na ta encim in s tem na SI vpliva več dejavnikov: prehrana (delež nasičenih, nenasičenih maščobnih kislin, koncentracija holesterola, ogljikovih hidratov), hormoni (estrogeni, testosteron, insulin), stradanje, virusi, interferon ... (23, 38–41).

Manjši SI pomeni večjo fluidnost membrane (23, 38, 39). V večini gre za relativni porast oleinske kisline in tako zvečanje deleža nenasičenih maščobnih kislin. Nenasičene maščobne kisline so tudi zelo dovzetne za proste radikale, ki imajo pomembno vlogo pri kancerogenezi in spremembi fluidnosti (glej spodaj), tako bi lahko le-te še pospešile siceršnje učinke lipidne peroksidacije (42). SI je manjši pri eritrocitih pri kolorektalnem in pljučnem karcinomu, limfomu, levkemiji, karcinomu žolčnika, jeter, dojke, prostate (23, 38, 39, 41–46). Z lipidno ekstrakcijo eritrocitnih membran so določili SI več kot 1,0 pri zdravih kontrolah in bolnikih po uspešni odstranitvi tumorja in SI manj kot 1,0 pri rakavih bolnikih in bolnikih s ponovitvijo (23). Nižje SI imajo bolj napredovali tumorji in kahektični bolniki, vendar kaheksija ne povzroča desaturacije (23, 47). Vzrok tem spremembam bi lahko bili razni dejavniki (rastni faktor, DPF – *desaturation producing factor*), ki jih izločajo tumorske celice in prav tako vplivajo na zmanjšano fluidnost tumorskih celic samih (23, 47). Tako bi bil lahko SI diagnostični označevalec tumorja in tudi znanilec ponovitve (23, 38–40, 45, 47). Vsekakor spremembe SI kažejo na sistemski učinek rakavega obolenja (46).

Mnogi avtorji dvomijo o zanesljivosti znižanega SI eritrocitnih membran pri rakavih obolenjih, kajti poleg zgoraj naštetih dejavnikov vplivajo na SI tudi starost, spol, sladkorna bolezen, druge presnovne bolezni, uporaba

metode za analizo maščobnih kislin, čas od odvzema krvi do analize (48–50). Nekatere raziskave niso dokazale spremenjenega SI pri bolnikih z rakom in zdravih kontrolah.

HIPOTEZI

Predpostavljali smo, da bodo imeli rakavi bolniki nižje koncentracije serumskih holesterolov kot zdrave kontrole. Posledično naj bi imele eritrocitne membrane rakavih bolnikov večjo fluidnost kot membrane eritrocitov zdravih kontrol.

METODE

Bolniki in kontrolna skupina

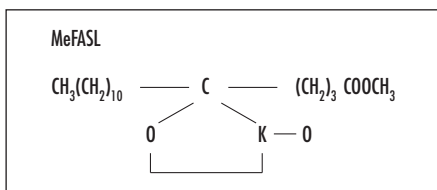
V prospektivno raziskavo smo vključili 49 bolnikov z rakom in 20 zdravih kontrol. Bolniki so bili operirani zaradi tumorja na Kliniki za torakalno kirurgijo Kliničnega centra v Ljubljani v času od 22. 11. 2002 do 14. 4. 2004.

V preiskovalni skupini je bilo 39 moških in 10 žensk, starih od 33 do 85 let. 28 bolnikov je imelo karcinom pljuč: devet stadij I, pet stadij II, devet stadij III, trije stadij IV, v dveh primerih pa stadij ni bil določen (NS). 10 bolnikov je imelo karcinom požiralnika: dva stadij I, eden stadij II, dva stadij III, eden stadij IV in štirje NS. Karcinom želodca je imelo 6 bolnikov: dva stadij III, eden stadij IV in trije NS.

V kontrolni skupini je bilo 8 moških in 12 žensk, starih od 23 do 55 let.

Jemanje vzorca

Bolnikom smo na dan operacije ali dan prej vzeli dva vzorca s 5 ml krvi iz kubitalne vene: en vzorec smo imeli za meritev z EPR-metodo, drugemu pa so v laboratoriju Kliničnega inštituta za klinično kemijo in biokemijo v Kliničnem centru določili koncentracije celotnega serumskega holesterola, HDL, LDL in TGC. V čim krajšem možnem času (najkasneje dve uri) po odvzemu krvi smo z EPR-metodo na Inštitutu Jožef Štefan (IJS) izvajali meritve. Kontrolni skupini nismo merili koncentracij celotnega holesterola, HDL, LDL in TGC, saj smo menili, da so v mejah normale glede na zdravo splošno stanje.



Slika 4. *Struktura MeFASL-a.*

Priprava vzorcev in EPR-spektroskopija

Postopek priprave osnovnega vzorca eritrocitov za merjenje v EPR-spektrometru

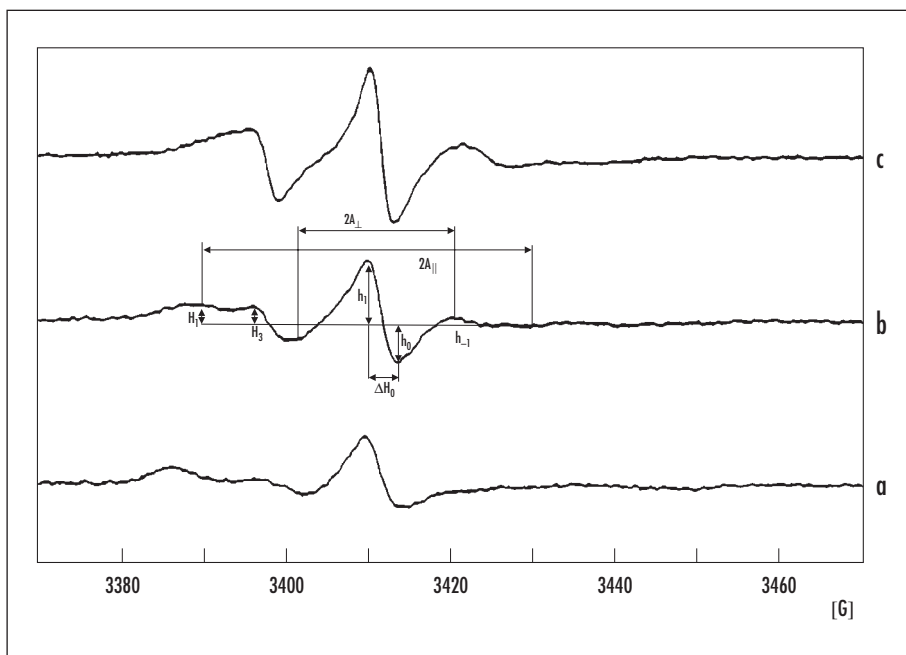
Za vsak vzorec smo pripravili dve paraleli. Z večkratnim centrifugiranjem in pufranjem smo se trudili dobiti čimbolj koncentrirane in očiščene eritrocite. Nato smo dodali spinski označevalec MeFASL 10.3 (slika 4) in težili k temu, da bi se čimbolj vgradil v eritrocitno membrano. Na koncu smo eritrocite iz epruvete posesali v kapilaro, jo zamašili z umetno maso in s tem je bil vzorec pripravljen za merjenje v EPR-spektrometru.

Postopek priprave vzorca eritrocitov z dodanim holesterolom

Holesterol smo dodajali z namenom, da bi prikazali razliko v spektru na račun zvečane oz. zmanjšane fluidnosti membrane. Seveda se je moral holesterol čimbolj vgraditi v membrano eritrocitov. Za ta poskus smo vzeli eritocite petih zdravih ljudi, le-tim pa smo kasneje tudi ekstrahirali holesterol in skušali določiti količino vgrajenega holesterola (glej spodaj). Vzorec smo najprej pripravili po zgoraj opisanem načinu. Pravtako smo imeli dve kontroli. Eni smo dodali le 10 μ l kloroforma, drugi 10 μ l 0,5 M holesterola, raztopljenega v kloroformu. Vsako smo nato ročno mešali, centrifugirali, odstranili supernatant in posedek z eritrociti posrkali v kapilaro, da je bil pripravljen za EPR-spektroskopijo.

Izolacija holesterola iz eritrocitnih membran

Poskus smo opravili na Inštitutu za biokemijo Medicinske fakultete. Delali smo po protokolu Bligh-Dyer (51). Izolacijo smo naredili na



Slika 5. Primeri spektrov pri različnih temperaturah ($a=4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $b=21\text{ }^{\circ}\text{C}$, $c=37\text{ }^{\circ}\text{C}$); na spektru »b« so označeni parametri, ki smo jih merili, in sicer: $H1$, $H3$, $h1$, $h0$, $h-1$, $\Delta H0$, $2A_{11}$, $2A_{1-}$. Za razlago parametrov glej sledeče besedilo.

vzorcih 5 zdravih kontrol, kjer smo po zgoraj opisanem načinu dodali kloroform oziroma holesterol, raztopljen v kloroformu (0,5 M). S pomočjo spektrofotometrije smo ločeno določevali koncentracijo holesterola in proteinov v eritrocitnih membranah. Proteine smo v vseh vzorcih določili z namenom, da je bilo sploh umestno računati koncentracijo holesterola v membrani, kajti dejanskega števila eritrocitov v vzorcu nismo mogli poznati. Tako smo na podlagi razmerja holesterol/proteini sklepali na koncentracijo holesterola v membrani.

Merjenje in analiza EPR-spektrov

Uporabili smo Bruker ESP 300 spektrometer. Pogoji meritev so bili naslednji: modulacijska amplituda 1 G, modulacijska frekvenca 100 kHz, mikrovalovna moč 20 mV, mikrovalovna frekvenca 9,61 GHz, ojačanje običajno 8×10^3 , temperatura 4 °C, 21 °C in 37 °C.

EPR-spekter je superpozicija več spektrov (v našem primeru 10), ki pripadajo spinskemu označevalcu.

Iz oblike spektra (slika 5) lahko ocenjujemo fluidnost membran.

Iz spektra smo s pomočjo programa na EPR-spektrometru določili naslednje parametre: $A_{||}$, $A_{\perp}$, ΔH_0 , h_{-1} , H_1 , H_3 (H13), h_0 , h_1

($h_1 - h_0$). Nato smo s pomočjo enačbe izračunali empirični korelacijski čas (τ_c) in razliko med maksimalnim in minimalnim hiperfinim razcepom ($A_{||} - A_{\perp}$), ki korelira z ureditvenim parametrom (S). Kot smo že omenili, nizka urejenost in hitra dinamika pomenita veliko fluidnost. Parameter S pove povprečni odklon acilnih verig od normalnega dvosloja. Parameter τ_c pa sporoča čas, v katerem molekule pozabijo svoje prvotno mesto; ima manjše vrednosti pri hitri dinamiki (večja fluidnost) in večje vrednosti pri počasni (manjša fluidnost) (32).

Za izračun je potrebna naslednja enačba:

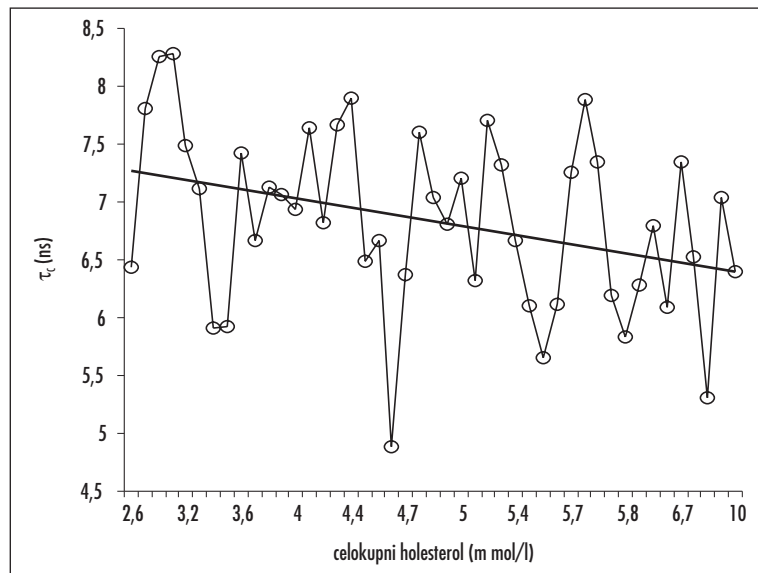
$$\tau_c = k \Delta H_0 (h_0 / h_{-1} - 1)^{1/2}$$

Konstanta k je odvisna od polarosti okolice spinskega označevalca, znaša $5,93 \times 10^{-10}$.

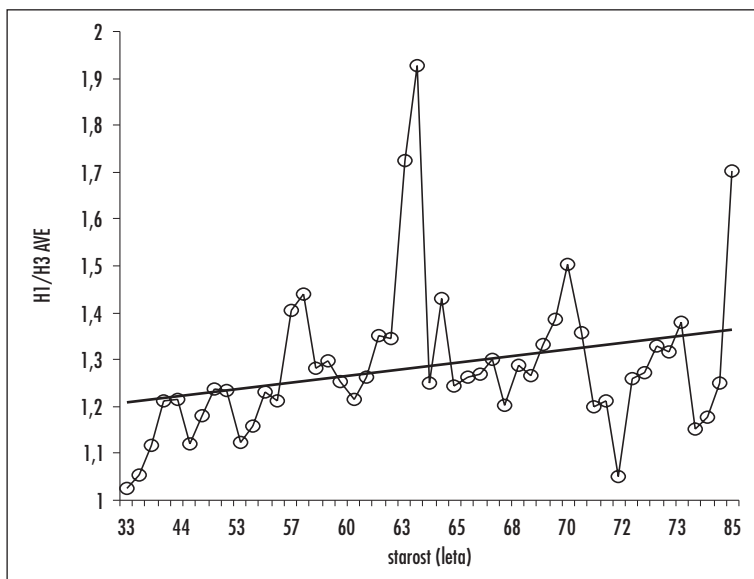
Parameter H13 odraža razmerje med bolj in manj fluidnimi regijami v tkivu. H1 ponašarja regijo z najmanjšo fluidnostjo, H3 pa z največjo. Visok H13 kaže na tkivo z veliko fluidnimi domenami (21).

REZULTATI

Parametre, ki opisujejo fluidnost membrane in smo jih razbrali iz spektrov smo primerjali glede na naslednje kategorije.



Slika 6. τ_c v odvisnosti od celokupnega holesterola.



Slika 7. H13 v odvisnosti od starosti bolnikov.

EPR-značilnosti - primerjava s kontrolami

Parametri, določeni iz EPR-spektrov, ki opisujejo fluidnost eritrocitnih membran (H13, $A_{||} - A_{\perp}$ pri 4 °C, $A_{||} - A_{\perp}$ pri 21 °C in τ_c [ns]), niso pokazali statistično značilne razlike med skupino bolnikov in zdravimi kontrolami.

EPR-značilnosti in celokupni serumski holesterol, HDL, LDL in TGC

Bolnike smo glede na celokupni holesterol in glede na LDL razdelili v tri skupine glede na normalno, povišano oziroma znižano koncentracijo holesterola. Glede na HDL-vrednosti smo bolnike razvrstili v dve skupini, saj nihče od njih ni imel povišanega HDL; glede na TGC pa smo jih razdelili na tiste s povišano in tiste z normalno koncentracijo TGC.

Nismo dokazali statistično pomembnih razlik v fluidnosti (primerjava parametrov H13, $A_{||} - A_{\perp}$ pri 4 °C, $A_{||} - A_{\perp}$ pri 21 °C in τ_c [ns]) med kontrolno skupino in zgoraj opisanimi posameznimi skupinami bolnikov glede na celokupni serumski holesterol, LDL, HDL in TGC.

Po Pearsonovi korelacijski metodi pa se je pokazala statistično pomembna povezava

med celokupnim holesterolom, LDL, HDL in τ_c . Izkazalo se je, da τ_c pada z naraščanjem koncentracije celokupnega holesterola (slika 6), LDL, HDL. Za TGC to ne drži.

EPR-značilnosti in starost bolnikov

Po Pearsonovi korelacijski metodi smo primerjali EPR-parametre in starost bolnikov. Parameter H13 je v povezavi s starostjo, in sicer se z naraščajočo starostjo večja, kar prikazuje tudi slika 7.

EPR-značilnosti in stadiji

Statistično pomembna je razlika $A_{||} - A_{\perp}$ pri 21 °C, ki kaže, da ta parameter narašča z višjim stadijem (stadij I, II glede na stadij III, IV). Drugi parametri ne pokažejo pomembnih razlik pri višjih stadijih.

Različni tumorji, njihovi stadiji in vrednosti serumskih holesterolov

Primerjava med serumskimi holesteroli pri treh pogostejših tumorjih, pri katerih smo delali raziskavo, je pokazala, da med tumorjem želodca in požiralnika ni bistvene razlike v koncentraciji serumskih holesterolov,

medtem ko obstaja statistično značilna razlika med pljučnimi tumorji na eni strani ter tumorji želodca in požiralnika na drugi. Pri pljučnih tumorjih smo opazili večje koncentracije celokupnega holesterola, LDL in TGC. Vrednosti HDL ne pokažejo značilne razlike.

Glede na stadij smo bolnike razvrstili v dve skupini (stadij I, II in stadij III, IV). Statistično pomembna razlika se pokaže pri celokupnem holesterolu, HDL in pri LDL in kaže, da imajo ti holesteroli nižje vrednosti pri višjih stadijih. Pri TGC razlika ni značilna.

Dodatek holesterola eritrocitom

Izbrali smo 5 posameznikov, jim vzeli vzorce krvi in jim dodali holesterol v koncentraciji 0,5 M. Relativen porast holesterola v eritrocitih kaže zvišano razmerje med holesteroli in proteini (protokol Bligh-Dyer). Ta porast smo primerjali s τ_c z dodatkom holesterola statistično značilno pade, kar pomeni, da membrana postane bolj fluidna.

RAZPRAVA

Ali ima holesterol utrditveni učinek

Raziskave kažejo, da imajo rakavi bolniki znižane vrednosti serumskih lipoproteinov (7, 34, 40). To je potrdila tudi naša raziskava. Ker se vzpostavlja ravnotežje med lipoproteini in eritrocitno membrano, ki temelji na uravnoteženem razmerju med holesteroli in fosfolipidi (5), smo sklepali, da imajo rakavi bolniki znižano razmerje holesterol/fosfolipidi v eritrocitni membrani, kar bi po dosedanjih dognanjih pomenilo večjo fluidnost eritrocitne membrane (13). Tega pa naša študija ni potrdila. Izkazalo se je, da empiričen parameter τ_c z naraščanjem celokupnega holesterola v serumu pada, kar kaže na povečano fluidnost. To si lahko razlagamo z dvema teorijama: prva temelji na spremeni presnove lipidov pri rakavih bolnikih, po drugi pa holesterol v visokih koncentracijah nima utrditvenega učinka, ampak deluje ravno obratno. To teorijo bomo razložili s teorijo o domenski zgradbi membrane.

Koncentracija serumskega holesterola in fluidnost eritrocitnih membran pri rakavih bolnikih

Pri rakavih bolnikih pride do sprememb v presnovi lipidov (48). Te spremembe so slabo definirane, vendar je zanimivo opažanje pri kolorektalnem karcinomu, kjer naj bi bili povišani serumski holesteroli in trigliceridi vzrok za nastanek tumorja in naj bi bili posledica povečanega vnosa visoko nasičenih maščob (40). Tako opisujejo visoke vrednosti holesterolov in trigliceridov v začetku bolezni, ki se ne spremenijo, dokler gre za *carcinoma in situ*, ter znižanje holesterolov v napredovanih stadijih (33). Znižanje si razlagajo s povečano aktivnostjo LDL-receptorjev. Ta aktivnost je velika predvsem na tumorskih celicah, ki naj bi za svojo delitev porabile veliko holesterola, hkrati pa ga potrebujejo za tvorjenje veziklov, s katerimi odplavljajo antigene (52). Drugi avtorji opisujejo, da naj bi prišlo do povečane porabe holesterola v perifernih tkivih na račun večje okvare membran kot posledice lipidne peroksidacije, ki je spremljevalec rakotvorb zaradi tvorbe prostih radikalov. Produkti lipidne peroksidacije namreč prehajajo iz mesta nastanka v kri po telesu (53). Celice za novo biogenezo potrebujejo več holesterola (34). Od tod prva teorija o hipoholesterolemiji pri rakavih bolnikih, po kateri naj bi bila hipoholesterolemija posledica tumorja. Za to govori tudi reverzibilnost znižanih koncentracij celotnega holesterola in LDL ob uspešnem zdravljenju s kemoterapijo (35). Ker pa predstavlja hiperholesterolemija visoko tveganje za srčno-žilne bolezni in ker za temi boleha kar polovica prebivalstva razvitega sveta, se postavlja druga teorija, po kateri naj bi bila hipoholesterolemija predhodna rakotvorbi, saj naj bi ljudje z nizkimi vrednostmi holesterola v krvi živeli dlje, s starostjo pa se možnosti za razvoj raka večajo (35, 37). Vsekakor naj bi bile nizke vrednosti holesterola povezane z večjo umrljivostjo in nekateri celo menijo, da bi bil znižan holesterol v krvi lahko indikator za novotvorbo (34, 37).

Naša študija je pokazala, da imajo bolniki v napredovalem stadiju znižane vrednosti celokupnega holesterola, HDL in LDL ter da

TGC niso pomembno spremenjeni. To je v skladu z drugimi raziskavami (34, 37, 40). Čeravno je LDL glavni prenašalec holesterola, pa so pri rakavih bolnikih znižane tudi vrednosti HDL, zmanjšanje le-tega se tudi smatra kot napovednik raka.

Vendar vsi tumorji niso povezani z nizkimi vrednostmi holesterola. Pomembna izjema je karcinom dojke, kjer je opaziti povišane vrednosti celokupnega holesterola, LDL in TGC. Razlog naj bi bila večja incidenca tumorja pri debelih ženskah in povečan vnos maščob s hrano (35).

Vsi tumorji tudi ne vplivajo enako na organizem. Zato nas je zanimalo, kakšne so razlike med različnimi vrstami tumorjev glede na vrednosti serumskega holesterola. Ker smo imeli že tako majhen vzorec bolnikov (49), smo izbrali le tri najpogostejše tumorje – karcinom pljuč (28 bolnikov), požiralnika (10 bolnikov) in želodca (6 bolnikov). Prikazali smo, da imajo bolniki s karcinomom požiralnika in želodca precej nižje vrednosti celokupnega holesterola, LDL in trigliceridov kot bolniki s karcinomom pljuč. Ta opažanja si razlagamo kot razlike zaradi izpostavljenosti različnim kancerogenom v dveh ločenih organskih sistemih – prebavila in dihal. V pljuča lahko prihajajo snovi iz zraka, vendar se le delci, veliki od 0,5 do 2,5 μm , ustavijo v alveolih (54). Med najpomembnejše kancerogene v dihalih štejemo sestavine cigaretne dima, ki se sicer lahko nalagajo tudi v prebavila. V prebavni trakt pa pridejo najrazličnejši kancerogeni s hrano. Seveda pa je treba vzeti v zakup tudi dejstvo, da vzorci niso bili enako veliki in da temelji naša domneva na majhnih vzorcih.

Zaradi sistemskega vpliva raka na telo se zdi verjetno, da bi bil lahko spremenjen tudi izmenjevalni sistem med lipoproteini in eritrocitno membrano in torej vrednosti serumskih holesterolov ne bi odražale količine holesterola v eritrocitih (40–42). Poleg tega bi bile lahko zaradi spremenjenega metabolizma lipidov spremenjene (zvišane) tudi koncentracije sfingomielina v eritrocitni membrani. To bi bilo v skladu z zgoraj omenjenimi fluidizirajočimi učniki holesterola na lipidne dvosloje, zgrajene iz sfingomielina.

Dejavniki, ki bi pri naših rakavih bolnikih lahko vplivali na spremenjeno fluidnost eritrocitnih membran

Reaktivne kisikove spojine

V organizmu rakavega bolnika naj bi bilo več prostih radikalov, ki povzročajo lipidno peroksidacijo (LP), le-ta pa zmanjša fluidnost membran, poveča propustnost, inaktivira membranske encime in povzroči pomanjkanje esencialnih maščobnih kislin v membrani (53). Zaradi povečane permeabilnosti prosti radikali okvarjajo tudi hemoglobin, tako da ga pretvorijo v methemoglobin, ki nadaljnje povzroča LP, in začaran krog je sklenjen (55). Eritrocitne membrane so še posebej dovzetne za proste radikale zaradi stalne izpostavljenosti kisiku in pa tudi velike vsebnosti polinenasičenih maščobnih kislin (53, 56). Koncentracija lipoproteinov v krvi naj bi tudi vplivala na količino prostih radikalov: LDL so zelo dovzetni za oksidacijo in tako višja koncentracija le-teh pripomore k večji LP. HDL imajo nasprotni učinek in preprečujejo LP in delujejo kot antioksidant (57). Zanimiva je raziskava z ozonom, ki je močan vir prostih radikalov in kaže, da ima ozon pri nizkih koncentracijah rigidizirajoč učinek na eritrocitno membrano, pri velikih pa fluidizirajočega (58). V fizioloških razmerah sicer verjetno koncentracije prostih radikalov nikoli ne dosežejo takih vrednosti, kot so jih v opisanem poizkusu.

Starost bolnikov

S staranjem organizma se tudi eritrociti spreminjajo, in sicer se spremeni njihova oblika, deformabilnost, fragilnost in tudi fluidnost njihovih membran (59). Staranje eritrocitov lahko razumemo na dva načina, in sicer kot življenjski cikel posameznega eritrocita, ki traja približno tri mesece, ter kot spremembe na eritrocitih zaradi starega eritropoetskega sistema. V prvem primeru gre za zmanjšano fluidnost membran starejših eritrocitov predvsem na račun zmanjšane razmerja lipidi/proteini, zmanjšane vsebnosti ATP-ja (ki naj bi bil pomemben za interakcijo proteinov in lipidov) in spremenjene oblike eritrocitov (17). V drugem primeru pa je

zmanjšana fluidnost povezana z zmanjšanim razmerjem fosfatidilserin/sfingomielin, kar poveča togost. Prav tako pa na spremembe v membrani vpliva LP, ki ima tudi v starosti velik pomen in prispeva k bolj togi membrani (59). S starostjo se kopičijo v telesu prosti radikali, poleg tega se poveča občutljivost eritrocitnih membran na oksidativni stres. To v prvi vrsti okvarja lipide, vendar ti lipidi povzročijo tudi strukturne spremembe na sosednjih proteinih, zaradi česar pride do povezovanja med proteini, fragmentacije in oblikovanja proteinsko-lipidnih domen (60).

V naši raziskavi se je izkazalo, da se s starostjo povečuje parameter H13, ki je empiričen parameter, ki določa razliko v fluidnosti med različnimi membranskimi domenami (24). Ostali parametri fluidnosti niso pokazali pomembnejše povezave s starostjo. H13 je najbolj odvisen od razmerja med holesteroli in fosfolipidi v membrani, stopnje nenasičenosti fosfolipidnih acilnih verig in količine in razporeditve membranskih proteinov (26). S starostjo naj bi se povečala količina holesterola v membrani, prav tako tudi fosfolipidov, vendar naj bi njuno razmerje ostalo bolj ali manj nespremenjeno (61). Nenasičene acilne verige imajo v membrani fluidizirajoč učinek (22), povečana količina transmembranskih proteinov pa ima za posledico ustvarjanje proteinsko-lipidnih domen, ki zmanjšajo dinamiko membrane (16). Iz naštetega lahko sklepamo, da na naraščanje H13-parametra pri naših bolnikih in s tem na razliko v fluidnosti različnih domen najpomembneje vpliva obilnejše nastajanje proteinsko-lipidnih domen.

Spremljajoče bolezni

Izrednega pomena so tudi spremljajoča obolenja. Imamo podatke o predhodnih tumorjih (13 bolnikov), o srčno-žilnih boleznih (ki so tudi splošno v populaciji zelo pogosta, 12 bolnikov) ter o kajenju (21 bolnikov). Kar se tiče arterijske hipertenzije, ki je najbolj pogost spremljevalec (vzrok?) srčno-žilnim boleznim, raziskave kažejo, da bi bil vzrok lahko tudi sama spremenjenost eritrocitne membrane. Izkazalo se je namreč, da imajo bolniki z arterijsko hipertenzijo manj fluidne membrane (62). Kajenje pomembno vpliva na koncentracije serumskih holesterolov, in sicer

naj bi veljalo obratno sorazmerje (33, 34). Vendar raziskave kažejo, da kadilci pojedo več nasičenih maščob, zaradi česar se jim vrednosti LDL ne spremenijo pomembno. HDL pa so nižji tako pri aktivnih kot pasivnih kadilcih (34, 37). Pri sladkorni bolezni tipa II se zaradi sprememb v koncentraciji palmitinske, stearinske (znižani) in oleinske, linolenske (povišani) kisline spremeni fluidnost, kar vodi v manjšo deformabilnost eritrocita in zaradi tega do večjih patoloških sprememb drobnega žilja (63).

Zdravila

Statini povečajo fluidnost membran in tudi na ta način potencirajo antiaterogeni učinek zdravila (19, 20). Hormonsko nadomestno zdravljenje pri pomenopavzalnih ženskah poveča fluidnost eritrocitnih membran ter s tem deluje antihipertenzivno (62). Zdravljenje z antioksidantom etretinatom je izboljšalo fluidnost ne le zaradi zmanjšane količine prostih radikalov, ampak tudi zaradi neposrednega fluidnega učinka na membrano (64). Tudi zloraba alkohola zvišuje fluidnost eritrocitnih membran (65).

So lipidni rafti odgovor na presentljiv rezultat

Temelj naše študije in z njo povezana hipoteza je, da naj bi se zaradi znižanih vrednosti serumskih holesterolov pri rakavih bolnikih zmanjšala tudi vsebnost holesterola v eritrocitnih membranah in s tem naj bi se povečala njena fluidnost. Ker so naši rezultati v nasprotju s splošno poznano tezo o vlogi holesterola, smo naredili preizkus, v katerem smo eritrocitom dodali holesterol, raztopljen v kloroformu. S tem smo želeli ugotoviti, ali je res dodatek holesterola tisti, ki zvišuje fluidnost, ali pa gre za nek drug mehanizem. S preizkusom smo ugotovili, da tudi dodatek holesterola zviša fluidnost.

Razlago za tovrstne rezultate vidimo v domenski strukturi membrane. Temelj za nastanek lipidnih domen so tekoče lipidne faze, ki so tri: fosfolipidna faza, holesterolna faza in faza kondenziranih kompleksov (ta je bogata tako s holesteroli kot s fosfolipidi). Kondenzirani kompleksi naj bi bili osnova za tvorbo raftov (27), le-ti so domene urejenih

Tabela 1. Membranske karakteristike štirih domen.

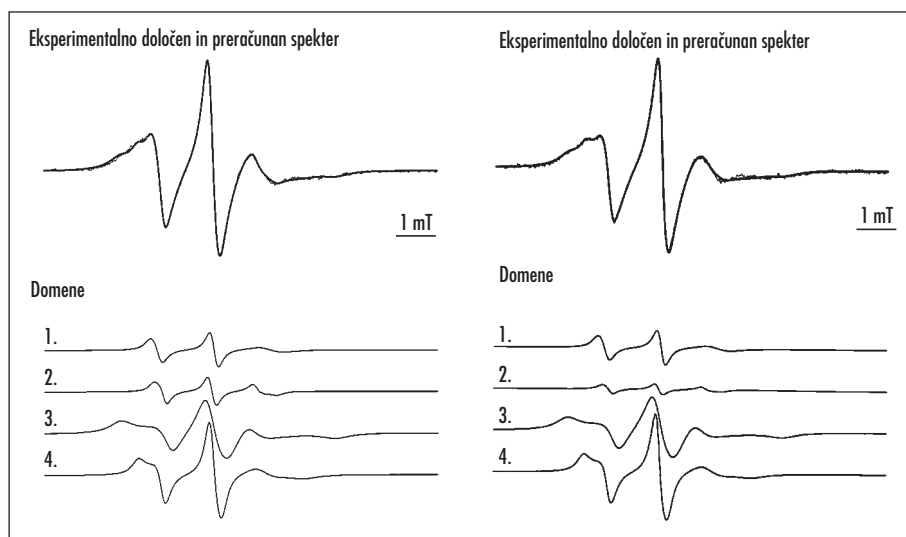
		Domena 1	Domena 2	Domena 3	Domena 4
Ureditveni parameter (S)	Spekter 1	0,121	0,15	0,58	0,32
	Spekter 2	0,121	0,178	0,58	0,312
Rotacijski korelacijski čas (τ_c)	Spekter 1	2,0	0,3	0,5	1,8
	Spekter 2	2,0	0,2	0,5	1,8
Prostorska konstanta (W)	Spekter 1	0,2	1,5	2,8	0,2
	Spekter 2	0,2	1,5	2,8	0,2
Polarni korekcijski faktor (pa)	Spekter 1	1,00012	1,00028	0,999967	1,00004
	Spekter 2	0,00012	1,00028	0,99997	1,00007
Masa domene (d)	Spekter 1	0,07	0,02	0,61	0,29
	Spekter 2	0,07	0,056	0,61	0,26

lipidov (30) in so obdani z bolj neurejenimi deli membrane (29). Holesterol je eden najpomembnejših dejavnikov v tvorbi domen (27, 30). Dokazana je tvorba raftov v eritrocitnih membranah (12) in v fizioloških razmerah (30). Povišan holesterol naj bi povečal trdnost membrani, zmanjšal propustnost in pri tem ohranjal fluidnost, izkaže pa se, da holesterol lahko naredi tekoče bolj trdno in trdno bolj tekoče, zveča urejenost tekoči fazi, zmanjša urejenost gel fazi (11, 66). Holesterol zmanjša fluidnost umetno pripravljenim lipidnim dvoslojem iz možganskega fosfatidilholina in zveča fluidnost dvoslojem, pripravljenim iz možganskega sfingomielina. Preprečeval naj bi fazno ločevanje v gel in tekočo fazo in bi lahko pretvoril obe v vmesno fazo – teko-

čo urejeno fazo (29). Možno je, da je več tipov raftov (30).

Zaradi različnih domen v membrani smo predpostavljali, da se holesterol ne vgrajuje v vse domene enakomerno in smo na podlagi tega naredili preizkus s simulacijo spektrov. EPR- spekter je sestavljen iz več spektralnih komponent, ki ustrezajo membranskim domenam. Za simulacijo potrebujemo naslednje parametre za vsako spektralno domeno: S – ureditveni parameter, τ_c – rotacijski korelacijski čas, W – prostorska konstanta, pa – polarni korekcijski faktor in d – masni faktor (67). Primerjali smo dva spektra (tabela 1, slika 8), ki se razlikujeta v fluidnosti. Spekter smo opisali s štirimi komponentami (domenami), dve sta bolj rigidni (domena 3, 4), dve

15



Slika 8.

Spekter 1

Spekter 2

domeni pa sta bolj fluidni (domena 1, 2). Izkazalo se je, da se bistveno spremeni sestava domene 2, ki se poveča, hkrati pa se poveča tudi njena urejenost, vendar ne za toliko, kolikor se poveča velikost domene. Velikost domene 4 pa se zmanjša, nekoliko se zmanjša tudi njena urejenost. Predvidevamo lahko, da se holesterol vgrajuje v manj fluidno od bolj fluidnih domen (domena 2) ter poveča velikost bolj fluidnih domen. Tako si razlagamo, da pride do povečane fluidnosti pri višjih serumskih holesterolih.

Napake in uporabnost študije v bazni in klinični znanosti

Izbira skupine bolnikov in kontrolne skupine

Pri izbiri kontrolne skupine smo želeli imeti zdravo skupino posameznikov, brez kroničnih bolezni, brez rednega zdravljenja in z vrednostmi serumskih holesterolov v mejah normale. Starost smo pri tem manj upoštevali (kontrolna skupina je bistveno mlajša od skupine bolnikov), toda le-ta se je izkazala za pomemben dejavnik. Tudi razmerje med moškimi in ženskami v kontrolni skupini ni v skladu s skupino bolnikov. Vplivu prehrane na koncentracije holesterolov (18, 40, 48), smo se želeli izogniti z jemanjem krvi na tešče. Skupina bolnikov tudi ni bila homogena glede tipa tumorja. Vse to bi veljalo v prihodnje upoštevati in raziskavo nadaljevati na enem tipu tumorja.

Napaka EPR-metode

EPR-spektroskopija je zelo zamudna metoda. Od odvzema vzorca do obdelave je poteklo različno dolgo časa (od 1 do 2 h), kar vpliva na kvaliteto vzorca. V vzorcih so bile lahko prisotne tudi druge celice in nečistoče, kar ima lahko vpliv na obliko spektra. Nekatere raziskave kažejo, da se spinski označevalec ne vgradi enakomerno v membrano (12). Pomembna so tudi nihanja temperature (merili smo pri treh različnih), včasih so bila kar precejšnja in to bi lahko vplivalo na lastnosti eritrocitov v vzorcih. Pri nekaterih vzorcih so bili prisotni šumi, ki so oteževali natančnejše meritve parametrov. Lahko zaključimo, da metoda ni uporabna v klinični praksi.

Biokemijska analiza eritrocitne membrane

V želji, da potrdimo ali ovržemo teorijo, dobljeno na rezultatih, da holesterol v visokih koncentracijah zveča fluidnost eritrocitne membrane, smo izvedli opisani preizkus na 5 zdravih posameznikih. Z dodajanjem holesterola smo hoteli doseči vrednosti, ki naj bi jih imeli bolniki s povišanimi vrednostmi serumskega holesterola. Problem preizkusa je v majhni skupini ter v dejstvu, da je šlo za zdravo skupino. Sama metoda je hitra in enostavna, tako da je uporabna v praksi, zato bi bilo priporočljivo v nadaljnjih študijah te meritve izvajati hkrati z merjenjem fluidnosti z EPR-metodo. Tako bi dejansko lahko razjasnili povezavo med serumskimi holesteroli in holesterolom v eritrocitni membrani ter fluidnostjo, tako pri zdravih ljudeh kot pri bolnikih z rakom. Menimo, da bi bilo bolje holesterol dodajati v obliki topnega holesterola ali v obliki liposomov, LDL-partikov, saj je kloroform precej močno topilo, hkrati pa pride pri pripravi vzorca do mešanja s pufrom PBS, ki vsekakor ni ugodno okolje za holesterol.

ZAKLJUČEK

Z EPR-metodo nismo potrdili hipoteze o večji fluidnosti eritrocitnih membran ob znižanih koncentracijah serumskega holesterola v krvi rakavih bolnikov. Naši rezultati so pokazali nasprotno, z višanjem koncentracij serumskih lipidov (razen TGC), se večja fluidnost eritrocitnih membran, to pa prav tako potrdi *in vitro* poizkus z dodatkom holesterola eritrocitnim vzorcem.

Potrdili smo statistično značilno znižanje celokupnega serumskega holesterola, HDL in LDL pri rakavih bolnikih v napredovalem stadiju. V napredovalem stadiju smo tudi ugotovili povišanje parametra $A_{\parallel} - A_{\perp}$ pri 21 °C, kar pa kaže na manjšo fluidnost eritrocitnih membran.

Obstajajo razlike v koncentracijah serumskih lipidov pri različnih vrstah tumorja, tako so pri karcinomu požiralnika in želodca koncentracije relativno precej nižje kot pri karcinomu pljuč.

S starostjo se viša parameter H13, ki kaže na različno fluidnost membrane pri mlajši in starejši populaciji.

Vsekakor je študija pomembnejša s stališča bazne znanosti kot s kliničnega vidika. Morda bi bilo zaradi pomanjkljivosti EPR-metode smotrno uporabiti še kakšno drugo (fluorescenčna metoda) ter primerjati rezultate in jih objektivizirati. Problem predstavljajo različne definicije fluidnosti pri teh dveh metodah. V prihodnje je nujno, da se upora-

bi tudi biokemijska analiza membrane, saj brez te lahko le posredno sklepamo na vpliv holesterola na fluidnost membrane. Pri študiju metabolizma lipidov pri rakavih bolnikih pa bi bilo potrebno večje poenotenje kar se tiče vrste tumorja, stadija, prehrane, spola, starosti, razvad, spremljajočih bolezni, zdravil, družinske obremenjenosti.

LITERATURA

- Cooper GM. The cell surface. In: Cooper GM, ed. *The cell: a molecular approach*. 1st ed. Washington: ASM Press, Sunderland: Sinauer Associates, Inc; 1997. p. 467–76.
- Virtanen JA, Cheng KH, Somerharju P. Phospholipid composition of the mammalian red cell membrane can be rationalized by a superlattice model. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95 (9): 4964–9.
- Vereb G, Szollosi J, Matko J, et al. Dynamic, yet structured: the cell membrane three decades after the Singer – Nicolson model. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100 (14): 8053–8.
- Cooper RA. Abnormalities of cell-membrane fluidity in the pathogenesis of disease. *N Engl J Med* 1977; 297 (7): 371–7.
- Cooper RA. Influence of increased membrane cholesterol on membrane fluidity and cell function in human red blood cells. *J Supramol Struct* 1978; 8 (4): 413–30.
- Cooper RA, Leslie MH, Fischkoff S, et al. Factors influencing the lipid composition and fluidity of red cell membranes in vitro: production of red cell possessing more than two cholesterol per phospholipid. *Biochemistry* 1978; 17 (2): 327–31.
- Cooper RA, Durocher JR, Leslie MH. Decreased fluidity of red cell membrane lipids in abetalipoproteinemia. *J Clin Invest* 1977; 60 (1): 115–21.
- Yamaguchi T, Kuroki S, Tanaka M. Effects of temperature and cholesterol on human erythrocyte membranes. *J. Biochem (tokyo)* 1982; 92 (3): 673–78.
- Suda T, Maeda N, Shiga T. Effect of cholesterol on human erythrocyte membrane. A spin labled study. *J Biochem (Tokyo)* 1980; 87 (6): 1703–13.
- Simons K, Ikonen E. How cells handle cholesterol. *Science* 2000; 290 (5497): 1721–26.
- Bloom M. The physics of soft, natural materials. *Physics in Canada* 1992; 48: 7–16.
- Cassera MB, Silber AM, Gennaro AM. Differential effects of cholesterol on acyl chain order in erythrocyte membranes as a function of depth from the surface. An electron paramagnetic resonance (EPR) spin label study. *Biophys Chem* 2002; 99 (2): 117–27.
- Seigneuret M, Zachowski A, Hermann A, et al. Asymmetric lipid fluidity in human erythrocyte membrane: new spin-label evidence. *Biochem* 1984; 23 (19): 4271–5.
- Moore DJ, Gioioso S, Sills RH, et al. Some relationships between membrane phospholipid domains, conformational order, and cell shape in intact human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1415 (2): 342–8.
- Yawata Y, Miyashima K, Sugihara T, et al. Self-adaptive modification of red-cell membrane lipids in lecithin: cholesterol acyltransferase deficiency. Lipid analysis and spin labeling. *Biochim Biophys Acta* 1984; 769 (2): 440–8.
- Subczynski WK, Wisniewska A. Physical properties of lipid bilyaer membranes: relevance to membrane biological functions. *Acta Biochim Pol* 2000; 47 (3): 613–25.
- Shiga T, Maeda N, Suda T, et al. The decreased membrane fluidity of in vivo aged, human erythrocytes. A spin label study. *Biochim Biophys Acta* 1979; 553 (1): 84–95.
- Prisco D, Rogasi PG, Panicia R, et al. Age-related changes in red blood cell lipids. *Angiology* 1991; 42 (4): 316–22.
- Levy Y, Leibowitz R, Aviram M, et al. Reduction of plasma cholesterol by lovastatin normalizes erythrocyte membrane fluidity in patients with severe hypercholesterolemia. *Br J Clin Pharmacol* 1992; 34 (5): 427–30.
- Koter M, Franiak I, Broncel M, Chojnowska-Jezierska J. Effects of simvastatin and pravastatin on peroxidation of erythrocyte plasma membrane lipids in patients with type 2 hypercholesterolemia. *Can J Physiol Pharmacol* 2003; 81 (5): 485–92.
- Sok M. Študij fluidnosti celičnih membran pljučnega raka z elektronsko paramagnetno resonanco [dissertacija]. Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani; 1995
- Shinitzky M. Membrane fluidity in malignancy. Adversative and recuperative. *Biochim Biophys Acta* 1984; 738 (4): 251–61.
- Wood CB, Habib NA, Thompson A, et al. Increase in oleic acid in erythrocytes associated with malignancies. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1985; 291 (6489): 163–5.
- Sok M, Šentjurc M, Schara M. Membrane fluidity characteristics of human lung cancer. *Cancer Lett* 1999; 139 (2): 215–220.

25. Cader AA, Butterfield BA, Watkins BA, et al. Electron spin resonance studies of fatty acid-induced alterations in membrane fluidity in cultured endothelial cells. *Int J Biochem Cell Biol* 1995; 27 (7): 665-73.
26. Sok M, Šentjerc M, Schara M, et al. Cell membrane fluidity and prognosis of lung cancer. *Ann Thorac Surg* 2002; 73 (5): 1567-71.
27. Radhakrishnan A, Anderson TG, McConnell HM. Condensed complexes, rafts, and the chemical activity of cholesterol in membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97 (23): 12422-7.
28. de Almeida RF, Fedorov A, Prieto M. Sphingomyelin/phosphatidylcholine/cholesterol phase diagram: boundaries and composition of lipid rafts. *Biophys J* 2003; 85 (4): 2406-16.
29. Crane JM, Tamm LK. Role of cholesterol in the formation and nature of lipid rafts in planar and spherical model membranes. *Biophys J* 2004; 86 (5): 2965-79.
30. London E. Insights into lipid raft structure and formation from experiments in model membranes. *Curr Opin Struct Biol* 2002; 12 (4): 480-6.
31. Joly E. Hypothesis: could the signalling function of membrane microdomains involve a localized transition of lipids from liquid to solid state? *BMC Cell Biol* 2004; 5: 3.
32. Šentjerc M, Štalc A. Uporaba elektronske paramagnetne resonance v biologiji in medicini. *Med Razgl* 1976; 15: 259-79.
33. Yamada K, Araki S, Tamura M, et al. Relation of serum total cholesterol, serum triglycerides and fasting plasma glucose to colorectal carcinoma in situ. *Int J Epidemiol* 1998; 27 (5): 794-8.
34. Patel PS, Shah MH, Jha FP, et al. Alterations in plasma lipid profile patterns in head and neck cancer and oral precancerous conditions. *Indian J Cancer* 2004; 41 (1): 25-31.
35. Alexopoulos CG, Blatsios B, Avgerinos A. Serum lipids and lipoprotein disorders in cancer patients. *Cancer* 1987; 60 (12): 3065-70.
36. Alexopoulos CG, Pournaras S, Vaslamatzis M, et al. Changes in serum lipids and lipoproteins in cancer patients during chemotherapy. *Cancer Chemother Pharmacol* 1992; 30 (5): 412-6.
37. Eichholzer M, Stahelin HB, Gutzwiller F, et al. Association of low plasma cholesterol with mortality for cancer at various sites in men: 17-y follow-up of the prospective Basel study. *Am J Clin Nutr* 2000; 71 (2): 569-74.
38. Wood CB, Habib NA, Apostolov K, et al. Reduction in the stearic to oleic acid ratio in the circulating red blood cells: a possible tumour marker in solid human neoplasms. *Eur J Surg Oncol* 1985; 11 (2): 167-9.
39. Wood CB, Habib NA, Apostolov K, et al. Reduction in the stearic to oleic acid ratio in human malignant liver neoplasms. *Eur J Surg Oncol* 1985; 11 (4): 347-8.
40. Nicholson ML, Neoptolemos JP, Clayton HA, et al. Dietary and erythrocyte fatty acids in experimental colorectal carcinogenesis. *Eur J Surg Oncol* 1992; 18 (2): 146-51.
41. Pala V, Krogh V, Muti P, et al. Erythrocyte membrane fatty acids and subsequent breast cancer: a prospective Italian study. *J National Cancer Inst* 2001; 93: 1088-95.
42. Pandey M, Sharma LB, Singh S, et al. Erythrocyte membrane fatty acid profile and saturation index in gallbladder carcinogenesis: a case control study. *World J Surg Oncol* 2003; 1 (1): 5.
43. Worman CP, Barker WR, Apostolov K. Saturation index of blood cell membrane fatty acids before and after IFN treatment in hairy cell leukemia. *Leukemia* 1987; 1 (4): 379-82.
44. Persad RA, Gillatt DA, Heinemann D, et al. Erythrocytes stearic to oleic acid ratio in prostatic carcinoma. *Br J Urol* 1990; 65 (3): 268-70.
45. Apostolov K, Barker W, Catovsky D, et al. Reduction in the stearic to oleic acid ratio in leukaemic cells - a possible chemical marker. *Blut* 1985; 50 (6): 349-54.
46. Kelly SB, Miller J, Wood CB, et al. Erythrocyte stearic acid desaturation in patients with colorectal carcinoma. *Dis Colon Rectum* 1990; 33 (12): 1026-30.
47. Hershman MJ, Habib NA, George CD, et al. Effect of cachexia on lipid saturation of erythrocyte membranes. *Curr Surg* 1987; 44 (4): 292-4.
48. Neoptolemos JP, Clayton H, Heagerty AM, et al. Dietary fat in relation to fatty acid composition of red cells and adipose tissue in colorectal cancer. *Br J Cancer* 1988; 58 (5): 575-9.
49. Neoptolemos JP, Heagerty AM, Nicholson M, et al. Inadequacy of oleic acids in erythrocytes as a marker for malignancies. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1987; 294 (6580): 1157-8.
50. Lawson N, Taylor AJ, Manche A, et al. Inadequacy of oleic acid in erythrocytes as a marker of malignancies. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1987; 294 (6574): 769.
51. Zheng YH, Plemenitas A, Linnemann T, et al. Nef increases infectivity of HIV via lipid rafts. *Curr Biol* 2001; 11 (11): 875-9.
52. Šentjerc M, Sok M, Serša G. Plasma membrane fluidity alternations in cancerous tissues. *Radiol Oncol* 1998; 32 (1): 109-17.
53. Kolanjiappan K, Manoharan S, Kayalvizhi M. Measurement of erythrocyte lipids, lipid peroxidation, antioxidants and osmotic fragility in cervical cancer patients. *Clin Chim Acta* 2002; 326 (1-2): 143-9.

54. Speizer FE. Environmental lung diseases. In: Braunwald E, Isselbacher KJ, Petersdorf RG, Wilson JD, Martin JB, Fauci AS, ed. *Harrison's principles of Internal medicine 2*. McGraw-Hill company; 1988. p. 1068–75.
55. Della Rovere F, Granata A, Broccio M, et al. Hemoglobin oxidative stress in cancer. *Anticancer Res* 1996; 15 (5B): 2089–96.
56. Abou-Seif MA, Rabia A, Nasr M. Antioxidant status, erythrocyte membrane lipid peroxidation and osmotic fragility in malignant lymphoma patients. *Clin Chem Lab Med* 2000; 38 (8): 737–42.
57. Ray G, Husain SA. Role of lipids, lipoproteins and vitamins in women with breast cancer. *Clin Biochem* 2001; 34 (1): 71–6.
58. Gornicki A, Gutsze A. In vitro effects of ozone on human erythrocyte membranes: an EPR study. *Acta Biochim Pol* 2000; 47 (4): 963–71.
59. Marin MS, Fernandez A, Sanchez-Yague J, et al. Changes in the phospholipid and fatty acid composition in normal erythrocytes from sheep in different ages. *Aminophospholipid organization in the membrane bilayer*. *Biochimie* 1990; 72 (10): 745–50.
60. Ozaydin B, Onaran I, Avsar K, et al. Relationship between ageing and susceptibility to oxidative damage: An assessment by erythrocyte membrane proteins and lipids. *Turk J Med Sci* 2001; 35: 95–101.
61. Rifkind JM, Araki K, Mohanty JG, et al. Age dependent changes in erythrocyte membrane function. *Prog Clin Biol Res* 1985; 195: 159–72.
62. Tsuda K, Kinoshita-Shimamoto Y, Mabuchi Y, et al. Hormone replacement therapy improves membrane fluidity of erythrocytes in postmenopausal women: an electron paramagnetic resonance investigation. *Am J Hypertens* 2003; 16 (6): 502–7.
63. Kulacoglu DN, Kocer I, Kurtul N, et al. Alterations of fatty acid composition of erythrocyte membrane in type 2 diabetes patients with diabetic retinopathy. *Jpn J Ophthalmol* 2003; 47 (6): 551–6.
64. Gornicki A, Gutsze A. In vivo and in vitro influence of etretinate on erythrocyte membrane fluidity. *Eur J Pharmacol* 2001; 423 (2–3): 127–34.
65. Wrobel A, Kaminska D, Klinger M. Electron paramagnetic resonance study of erythrocyte membrane fluidity in renal transplant recipients. *Transplant Proc* 2003; 35 (6): 2230–2.
66. Koivusalo M. Probing lipid domains in model membranes and in mammalian cells [academic dissertation]. Finland: University of Helsinki; 2004.
67. Šentjurc M, Štrancar J, Koklič T. Membrane domain alternation under the action of biologically active substances: an epr study. *Current topics in biophysics* 2002; 26 (1): 65–73.

Priselo 19. 9. 2005