**БИОХИМИЯ, БИОФИЗИКА,
МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ**

УДК 577.1 : 616-06.6

**ПРОСТРАНСТВЕННАЯ МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ НЕОДНОРОДНОСТЬ
СОЛИДНОЙ КАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА**

Е. В. Инжеваткин^{1,*}, А. А. Савченко²

Представлено академиком РАН И.И. Гительзоном 28.04.2017 г.

Поступило 29.05.2017 г.

Исследована активность НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в различных пространственных областях солидной формы карциномы Эрлиха. Обнаружено, что для солидного варианта карциномы Эрлиха характерна пространственная метаболическая неоднородность. Данное обстоятельство обуславливает существенное различие метаболических особенностей солидного варианта карциномы Эрлиха по сравнению с асцитным вариантом этой опухоли.

Ключевые слова: асцитная карцинома Эрлиха, солидная опухоль, метаболизм.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524865626-630>

ВВЕДЕНИЕ

Асцитная карцинома Эрлиха (АКЭ) является распространённой моделью в экспериментальной онкологии [1, 2]. Опухоль представляет собой суспензию злокачественных клеток, которые пролиферируют в брюшной полости мышей и имеют равный доступ к ресурсам организма через асцитическую плазму и в равной степени подвержены воздействию различных факторов, сопутствующих опухолевому росту.

Однако существует альтернативный, солидный вариант карциномы Эрлиха, который легко получить путем внутрикожной прививки АКЭ мышам. Клетки различных областей солидной опухоли в силу отличий в степени васкуляризации, контактов с различным микроокружением могут иметь неравный доступ к ресурсам организма и по-разному подвергаться действию факторов канцерогенеза, иммунным и регуляторным влияниям [3, 4]. Такое различие неизбежно должно проявляться и в характере обмена веществ опухолевых клеток.

¹Международный научный центр исследований экстремальных состояний организма
Федерального исследовательского центра
“Красноярский научный центр”
Сибирского отделения Российской Академии наук

²Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера
Федерального исследовательского центра
“Красноярский научный центр” Сибирского отделения
Российской Академии наук

*E-mail: inscience@mail.ru

Цель работы — исследовать активность НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в различных пространственных областях солидной формы карциномы Эрлиха.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве экспериментальных животных в работе использовались мыши ICR самцы с массой тела 22–23 г, полученные в питомнике Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии “ВЕКТОР” (Новосибирская область). Индукцию опухолевого роста осуществляли путём прокола кожи животного иглой шприца, на срезе которой находилась суспензия клеток АКЭ, полученная от животного-донора на 9-е сутки опухолевого роста. Индукция осуществлялась в коже проксимальной области правого бедра.

Солидную опухоль выделяли из организма животного на 67-е сутки после прививки. Из опухоли вырезали фрагмент в виде прямоугольной пластинки размером 22,5×18 мм и толщиной 4 мм и делили его на 20 квадратных образцов со сторонами 4,5 мм (рис. 1). Полученные образцы нумеровались, после чего осуществлялась их гомогенизация и экстрагирование ферментов по методике, описанной в работе Г.А. Кочетова [5]. Далее, в полученном экстракте определяли количество белка по методу Брэдфорда с использованием реактива кумасси бриллиантового синего G-250 [6].

Рис. 1. Схематичное изображение локализации исследуемого образца опухолевой ткани. Мышь с опухолью, вид сзади. 1 — опухоль, 2 — плоскости разреза опухоли, между которыми расположен исследуемый образец.

Биолюминесцентным методом определяли активность НАД-зависимой изоцитратдегидрогеназы (НАДИЦДГ), малатдегидрогеназы для НАД- и НАДН-зависимой реакции (НАДМДГ и НАДНМДГ), малик-фермента (НАДФМДГ), лактатдегидрогеназы для НАД- и НАДН-зависимой реакции (НАДЛДГ и НАДНЛДГ), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ), глицерол-3-фосфатдегидрогеназы (ГЗФДГ), глутаматдегидрогеназы для НАД-зависимой реакции (НАДГДГ), глутаматдегидрогеназы для НАДФ-зависимой реакции (НАДФГДГ) [7]. Активность ферментов выражали в единицах ферментативной активности на 1 мг белка.

Данные представлены как средние арифметические на основе пяти независимых определений активности ферментов в гомогенатах. Проверку гипотезы о статистической достоверности различия выборок проводили с помощью критерия Манна—Уитни. Все обсуждаемые в работе различия считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На рис. 2 показано распределение активности ферментов по площади исследованного фрагмента опухолевой ткани. Как следует из представленных данных, наибольшая активность НАДИЦДГ наблюдается в центральной области фрагмента (ряд 2, столбец 3). Поскольку НАДИЦДГ является одним из лимитирующих ферментов в реакциях цикла трикарбоновых кислот (ЦТК), изменение его активности будет влиять на интенсивность субстратного потока в ЦТК. Известно, что в опухоли ЦТК функционирует в значительной мере как источник субстратов для биосинтеза аминокислот и жирных

кислот, необходимых для пролиферации ее клеток [8]. Таким образом, высокие значения активности этого фермента в центральной области опухоли могут свидетельствовать о существовании высокого пролиферативного потенциала клеток карциномы. В то же время это может быть свидетельством хорошей оксигенации опухолевой ткани в данной области.

Активность НАДМДГ максимальна в центральной, а также в правой верхней областях исследованного фрагмента (ряд 1, столбец 4; ряд 2, столбец 3). На основании того, что НАДМДГ также является одним из ферментов, которые определяют интенсивность субстратного потока в ЦТК, при повышении его активности можно предположить возрастание уровня аэробных энергетических процессов в клетках опухоли [9]. Максимум активности НАДНМДГ наблюдается в смежной области исследованного фрагмента (ряд 2, столбец 4), правее и ниже максимума активности НАДМДГ. Поскольку этот фермент участвует в работе малат-аспартатного шунта, можно сделать предположение о высокой активности этого механизма в данной области опухоли. В дальнейшем малат в митохондриях опухолевых клеток может превращаться в оксалоацетат, который, в свою очередь, становится субстратом для получения аминокислот.

Активность НАДФМДГ, НАДЛДГ и НАДНЛДГ достигает максимума в той же области опухоли, что и НАДНМДГ. НАДФМДГ выполняет в клетках роль поставщика НАДФН. С этим ферментом связывают усиление инвазивной способности опухоли, поскольку восстанавливаемый им НАДФН используется для синтеза жирных кислот в опухолевых клетках, а также обеспечивает поддержание внутриклеточного редокс-статуса и защищает клетки опухоли от окислительного стресса [10]. Высокая активность НАДЛДГ и НАДНЛДГ свидетельствует о высоком уровне активности гликолиза.

Г6ФДГ является иницирующим ферментом пентозо-фосфатного пути (ПФП), в результате деятельности которого образуется НАДФН, необходимый для регенерации восстановленного глутатиона. Вследствие этого Г6ФДГ часто рассматривают в качестве одного из защитных ферментов клеток наряду с такими ферментами, как каталаза, супероксиддисмутаза, глутатион-S-трансфераза и глутатионредуктаза. Важно, что ПФП обеспечивает субстратами и НАДФН макромолекулярный синтез, что имеет особое значение для активно пролиферирующих клеток [11]. Следовательно, повышение активности Г6ФДГ в центральной об-

Рис. 2. Распределение активности НАД- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ в пределах исследованного образца опухлевой ткани у мышей, мкЕ/мг белка.

ласти исследованного фрагмента опухоли (ряд 2, столбец 3) может говорить об усилении в клетках биосинтетических процессов.

Активность ГЗФДГ достигает максимальных уровней на периферии. Этот фермент катализирует НАД-зависимое превращение глицерол-3-фосфата, который является предшественником триацилглицеролов, в диоксиацетонфосфат — один из интермедиатов гликолиза [12]. Высокий уровень активности ГЗФДГ свидетельствует о возникновении предпосылок для перераспределения субстратов липидного обмена в направлении гликолиза. В то же время низкий уровень активности данного фермента в центральной области исследованного фрагмента опухоли (ряд 2, столбец 3) говорит о преимущественном использовании глицерол-3-фосфата в качестве субстрата для синтеза липидов. Наряду с повышенной активностью ГЗФДГ и другими особенностями метаболизма, характерными для центральной области исследованного фрагмента, это может свидетельствовать о развитии процессов метаболической адаптации опухолевых клеток.

Также связывают пластический и энергетический обмен НАДФ- и НАД-зависимые реакции глутаматдегидрогеназы, которые обеспечивают поступление в ЦТК субстратов от аминокислотного обмена в виде α -кетоглутарата с образованием аммиака [13]. Исходя из наших данных, наибольший уровень активности НАДФГДГ наблюдается в центральной и правой верхней областях исследуемого фрагмента (ряд 1, столбец 4; ряд 2, столбец 3), тогда как активность фермента для НАД-зависимой реакции достигает наибольших значений в смежных областях. Таким образом, в целом распределение активности реакций НАДФГДГ и НАДГДГ противоположно: высокий уровень активности НАДФГДГ соответствует пониженному уровню НАДГДГ и наоборот.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, для солидного варианта карциномы Эрлиха характерна пространственная метаболическая неоднородность, что существенно отличает его от асцитного варианта этой опухоли [14]. Результаты показывают, что для центральной области исследованного фрагмента опухоли характерно усиление энергетического метаболизма, а также возникновение условий для увеличения интенсивности процессов биосинтеза по сравнению с периферическими областями. В рамках ранее предложенной авторами концепции неспецифической метаболической реакции клеток на экстремальные

условия [15] это говорит о развитии адаптационных процессов в клетках центральной области исследованного фрагмента опухоли.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Круглик О.В., Моргулис И.И., Хлебопрот Р.Г.* Влияние электромагнитного излучения сверхвысокочастотного диапазона на жизнеспособность клеток экспериментальной опухоли // ДАН. 2013. Т. 449. № 1. С. 104–106.
2. *Крюкова О.В., Пьянков В.Ф., Копылов А.Ф., Хлебопрот Р.Г.* Влияние электромагнитного сверхвысокочастотного излучения на рост асцитной карциномы Эрлиха // ДАН. 2016. Т. 470. № 4. С. 487–489.
3. *Dayan F., Mazure N.M., Brahimi-Horn M.C., Pouyssegur J.* A Dialogue between the Hypoxia-Inducible Factor and the Tumor Microenvironment // Cancer Microenviron. 2008. V. 1. № 1. 53–68.
4. *Chiche J., Brahimi-Horn M.C., Pouyssegur J.* Tumour Hypoxia Induces a Metabolic Shift Causing Acidosis: a Common Feature in Cancer // J. Cell. Mol. Med. 2010. V. 14. № 4. P. 771–794.
5. *Кочетов Г.А.* Практическое руководство по энзимологии. 2-е изд., перераб. и доп. М.: Высшая школа, 1980. 272 с.
6. *Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К.* Справочник биохимика. М.: Мир, 1991. 544 с.
7. *Савченко А.А.* Определение активности NAD(P)-зависимых дегидрогеназ в нейтрофильных гранулоцитах биолюминесцентным методом // Бюл. экспериментал. биологии и медицины. 2015. Т. 159. № 5. С. 656–660.
8. *DeBerardinis R.J., Lum J.J., Hatzivassiliou G., Thompson C.B.* The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation // Cell Metab. 2008. V. 7. № 1. P. 11–20.
9. *Ban H.S., Xu X., Jang K., Kim I., Kim B-K., Lee K., Won M.* A Novel Malate Dehydrogenase 2 Inhibitor Suppresses Hypoxia-Inducible Factor-1 by Regulating Mitochondrial Respiration // PLoS ONE. 2016. V. 11. № 9.
10. *Zheng F.-J., Ye H.-B., Wu M.-S., Lian Y.-F., Qian C.-N., Zeng Y.-X.* Repressing Malic Enzyme 1 Redirects Glucose Metabolism, Unbalances The Redox State, and Attenuates Migratory, and Invasive Abilities In Nasopharyngeal Carcinoma Cell Lines // Chinese J. Cancer. 2012. V. 31. Iss. 11. P. 519–531.
11. *Perl A., Hanczko R., Telarico T., Oaks Z., Landas S.* Oxidative Stress, Inflammation and Carcinogenesis are Controlled Through the Pentose Phosphate Pathway by Transaldolase // Trends Mol. Med. 2011. V. 17. № 7. P. 395–403.

12. Kelly T.J., Souza A.L., Clish C.B., Puigserver P. A Hypoxia-Induced Positive Feedback Loop Promotes Hypoxia-Inducible Factor 1alpha Stability Through Mir-210 Suppression of Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase 1-Like // *Mol. Cell. Biol.* 2011. V. 31. № 13. P. 2696–2706.
13. Li M., Li C., Allen A., Stanley C.A., Smith T.J. The Structure and Allosteric Regulation of Mammalian Glutamate Dehydrogenase // *Arch Biochem Biophys.* 2012. V. 519. Iss. 2. P. 69–80.
14. Инжеваткин Е.В., Фоменко Е.Ю., Слепов Е.В., Савченко А.А. Метаболические изменения лимфоцитов и опухолевых клеток у мышей с асцитной карциномой Эрлиха в процессе роста опухоли // *Изв. РАН. Сер. биол.* 2007. № 3. С. 376–380.
15. Инжеваткин Е.В., Савченко А.А. Неспецифическая метаболическая реакция клеток на экстремальные условия // *Изв. РАН. Сер. биол.* 2016. № 1. С. 6–16.

THE SPATIAL METABOLIC HETEROGENEITY OF SOLID TYPE OF EHRLICH CARCINOMA

E. V. Inzhevatkin¹, A. A. Savchenko²

¹*International Scientific Center for Organism Extreme Conditions Research, Federal Research Center “Krasnoyarsk Science Center”,
Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation*

²*Institute of Medical Problems of the North, Federal Research Center “Krasnoyarsk Science Center”,
Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation*

Presented by Academician of the RAS I.I. Gitelzon April 28, 2017

Received May 29, 2017

The NAD(P)-dependent dehydrogenase activity was studied in different fields of solid form of Ehrlich carcinoma. It was shown that there is a metabolic distinction between different fields of the solid tumor. In this way there is a significant difference between ascites and solid type of Ehrlich carcinoma.

Keywords: Ehrlich ascites carcinoma, solid tumor, metabolism.