

УДК 577.11:616-006.6

**ОСОБЕННОСТИ МЕТАБОЛИЗМА КЛЕТОК АСЦИТНОЙ КАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА
У МЫШЕЙ В ДИНАМИКЕ РОСТА ОПУХОЛИ¹**

**Е.Ю. Фоменко, Е.В. Инжеваткин,
Е.В. Слепов, А.А. Савченко***

Исследована активность некоторых ключевых ферментов метаболизма клеток асцитной карциномы Эрлиха у мышей в динамике роста опухоли. Полученные результаты свидетельствуют о зависимости характера протекания метаболических процессов в клетках АКЭ от стадии роста опухоли.

Введение

Реализация клетками своих функциональных возможностей во многом зависит от интенсивности метаболизма, от особенностей распределения субстратных потоков, наличия определенных ферментов и коферментов. Для опухолевых клеток характерен метаболический атипизм. Отличительной особенностью метаболизма углеводов в опухолевых клетках является высокая активность гликолиза при отрицательном эффекте Пастера. Большая интенсивность работы гликолитического пути обуславливает высокую выживаемость опухолевых клеток в условиях гипоксии. Для опухолевых клеток характерны изменения и в обмене белков, липидов, в функционировании антиоксидантных систем, связанные с усиленным делением клеток, нарушением их функциональной и морфологической дифференцировки [6, 2, 3].

Рост опухоли происходит неравномерно. В ростовой кривой различают три участка, соответствующих периодам роста опухоли. Так, латентный период, или лаг-фаза, охватывает, применительно к асцитной карциноме Эрлиха (АКЭ), первые пять дней после появления опухоли в организме, период логарифмического увеличения числа клеток, или лог-фаза, с 7-го по 12-й дни, а терминальный период, за которым следует гибель организма, с 13-го по 16-й дни [8].

Несомненно, что выраженная периодичность роста опухоли должна находить свое отражение и на уровне клеточного метаболизма. Возможно, что знание динамики метаболических процессов в опухолевых клетках позволит найти более эффективные схемы противоопухолевой терапии.

Таким образом, целью данного исследования стало изучение особенностей метаболизма опухолевых клеток у мышей с асцитной карциномой Эрлиха в динамике роста опухоли.

Методика

Объектом исследований служила асцитная карцинома Эрлиха, пассируемая на белых беспородных мышах. При этом использовались мыши обоих полов (в равном соотношении) с массой тела 20–25 г в возрасте 2,0–2,5 мес., содержащиеся в стандартных условиях вивария. Инокуляцию опухолевых клеток в брюшную полость животных осуществляли в количестве 3×10^6 клеток на одно животное в 0,2 мл физиологического раствора. Перед инокуляцией клетки трижды отмывались в физиологическом растворе от асцитической жидкости животного-донора путем центрифугирования.

Взятие асцитной опухоли осуществляли на 5, 7, 9, 11, 13 и 15 дни после инокуляции (к 15-му дню смертность мышей составляла 20 %). При этом клетки карциномы трижды отмывали от асцитической плазмы в охлажденном физиологическом растворе путем чередования циклов центрифугирования и последующего ресуспендирования. После третьего центрифугирования сливали супернатант, а оставшиеся клетки ресуспендировали в 1 мл среды 199. Полученную суспензию клеток замораживали. После размораживания суспензию гомогенизировали, как это описано в работе [4].

Биолюминесцентным методом определяли активность НАД-зависимой изоцитратдегидрогеназы (НАД-ДИЦДГ), НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназы (НАДФИЦДГ), малатдегидрогеназы (МДГ), лактатдегидрогеназы для реакции превращения пирувата в лактат (ЛДГ), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ), глицерол-3-фосфатдегидрогеназы (Г3ФДГ) [7]. Активность ферментов выражали в ферментативных единицах на 1 мг общего белка, где 1 Е=1кмоль/мин [1].

В каждой экспериментальной выборке при определении ферментативной активности использовали гомогенаты опухолевых клеток 20-22 животных. Для всех полученных данных определяли среднее арифметическое значение и ошибку средней арифметической. Проверку гипотезы о статистической достоверности различия выборок проводили с помощью критерия Манна-Уитни, различия считали достоверными при $P < 0,05$ [5].

¹ Работа выполнена при поддержке Красноярского краевого фонда науки (гранты 12F986С, 13G068, 14G088).

* © Е.Ю. Фоменко, Е.В. Инжеваткин, Е.В. Слепов, А.А. Савченко, Красноярский государственный университет, 2005.

Результаты и обсуждение

Как следует из полученных нами данных, представленных на рис. 1 а, стадия логарифмического роста АКЭ характеризуется повышением активности НАДИЦДГ. Реакция, катализируемая данным ферментом, наряду с цитратсинтазной реакцией, одна из наиболее медленных в ЦТК и может лимитировать общую скорость потока метаболитов через цикл. Следовательно, результатом возрастания активности НАДИЦДГ может являться повышение скорости прохождения субстратов через ЦТК, по крайней мере, на данном участке.

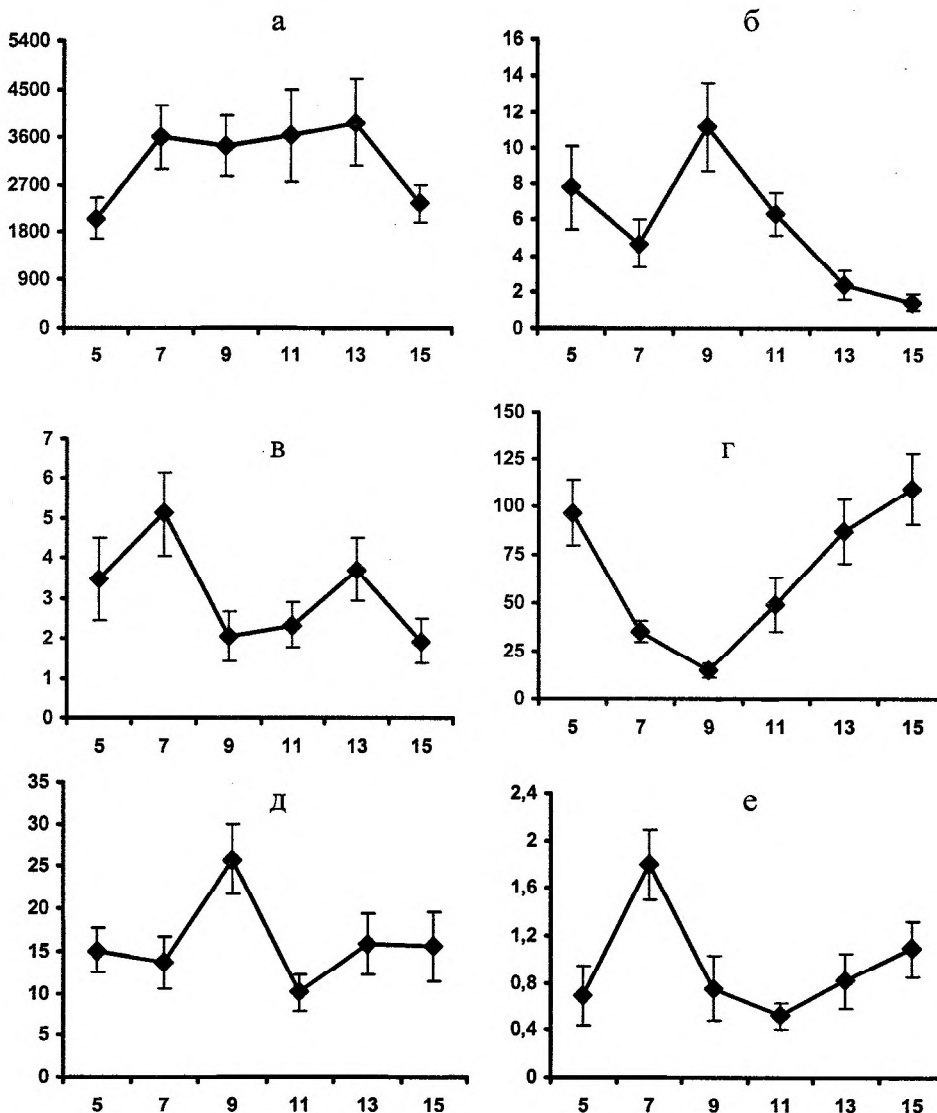


Рис.1. Активность НАДИЦДГ (а), НАДФИЦДГ (б), МДГ (в), ЛДГ (г), Г6ФДГ (д), Г3ФДГ (е) клеток АКЭ в динамике роста опухоли: по оси абсцисс – дни после прививки опухоли, по оси ординат – активность фермента, Е/мг белка

Однако на терминальной стадии болезни активность этого фермента снижается, что может быть причиной замедления работы ЦТК, причем одновременно наблюдается и снижение активности НАДФИЦДГ (рис.1 б). В силу своей преимущественно внемитохондриальной локализации НАДФИЦДГ обычно не принимает участия в работе ЦТК. Считается, что в норме его физиологическая роль состоит в регенерации НАДФН. Однако при снижении интенсивности субстратного потока и недостатке водорода в митохондриях этот фермент может включаться в ЦТК в качестве вспомогательного фермента, катализирующего образование α -кетоглутарата. Следовательно, снижение активности НАДФИЦДГ в терминальной стадии болезни также имеет неблагоприятные последствия для скорости субстратного потока по ЦТК.

Активность другого фермента ЦТК, а именно МДГ, испытывала колебания в течение всего исследованного периода, однако общей тенденцией при этом было снижение активности вплоть до 15-го дня после появления опухоли в организме животных (рис. 1 в). Впрочем, эта тенденция полностью соответствует опи-

санной выше картине изменения активности других ферментов цикла, характеризующейся снижением к терминальному периоду скорости субстратного потока по такому важному катаболическому пути, как ЦТК.

Дополняют это заключение результаты исследования активности ЛДГ для реакции превращения пирувата в лактат (рис.1 г). Они показывают, что уровень фермента к 9-му дню после попадания опухоли в организм резко снижастся, по сравнению с начальным периодом стадии логарифмического роста, с последующим очень значительным возрастанием к 15-му дню. Стремление опухолевых клеток избавляться от пирувата путем превращения его в лактат может только подтвердить заключение о замедлении работы ЦТК на терминальной стадии роста.

Полученные данные также показывают, что на 9-й день после появления опухоли в организме в опухолевых клетках отмечается повышенный уровень активности Г6ФДГ (рис.1 д). Так как этот фермент играет важную роль в снабжении клеток НАДФН, а последний, в свою очередь, необходим для синтеза жирных кислот и других структурных липидов, можно предположить, что всплеск его активности в середине стадии логарифмического роста направлен на удовлетворение потребностей интенсивно делящихся клеток в этом факторе.

При этом, как следует из данных, показанных на рис. 1 е, на 7-й день роста опухоли наблюдается всплеск активности ГЗФДГ при последующем падении активности к 9-му и 11-му дням и небольшом росте в терминальный период. Данные об активности этого фермента в определенной степени отражают изменения в распределении субстратов между пластическим и энергетическим направлениями обмена в клетке. ГЗФДГ катализирует превращение глицерол-3-фосфата, предшественника триацилглицеролов, в диоксиацетонфосфат, тем самым вовлекая его в гликолиз. Следовательно, к концу стадии логарифмического роста вовлечение глицерол-3-фосфата в энергетический обмен клетки значительно снижается, и при этом возникают условия для активизации липидного синтеза и воспроизводства липидных компонентов клеточных мембран. Также очевидно, что вследствие снижения активности ГЗФДГ снижается и интенсивность работы глицерофосфатного челночного механизма, компонентом которого этот фермент является, в результате чего поток протонов от цитоплазматического НАДН в митохондриальный компартмент снижается.

Анализируя наши результаты в целом, можно сделать заключение о различном характере протекания метаболических процессов в клетках АКЭ на разных стадиях роста опухоли. Стадия логарифмического роста преимущественно характеризуется относительно высокой интенсивностью реакций энергетического обмена при выраженном снижении к концу терминальной стадии. Активность Г6ФДГ и ГЗФДГ испытывает колебания, характер которых, по-видимому, отражает потребность клеток опухоли в соответствующих субстратах на разных стадиях ее роста.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Досон Р. Справочник биохимика / Р.Досон, Д.Эллиот, У.Эллиот, К.Джонс. - М.: Мир, 1991. - 544 с.
2. Кобляков В.А. Различия в составе липидов и пролиферативной активности гепатомы-27 крыс в зависимости от органа трансплантации / В.А.Кобляков, О.Г.Сомова, В.Ф.Кондаленко и др. // Биохимия.-2001.-Т.66.-Вып.6.-С. 745-750.
3. Короткина Р.Н. Сравнительное исследование активности ферментов обмена глутатиона и антиоксидантных ферментов в злокачественных и доброкачественных опухолях человека / Р.Н.Короткина, Г.Н.Мацкевич, А.Ш.Девликанова и др. // Бюл. экспер. биологии и медицины-2002.-Т.133.-№ 6.-С.697-700.
4. Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии / Г.А.Кочетов. - М.: Высшая школа, 1980. - 272с.
5. Лакин Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин. - М.:Высшая школа, 1990.-351 с.
6. Патофизиология / Под ред. П.Ф.Литвицкого. - М.: Медицина, 1997.-752 с.
7. Савченко А.А. Высокочувствительное определение активности дегидрогеназ в лимфоцитах периферической крови человека биоллюминесцентным методом / А.А.Савченко, Л.Н.Сунцова // Лаб.дело.-1989.-№ 11.-С.23-25.
8. Эмануэль Н.М. Кинетика экспериментальных опухолевых процессов / Н.М.Эмануэль. - М.: Наука, 1977.-419 с.

INVESTIGATION OF METABOLIC CHANGES OF CANCER CELLS IN MICE WITH EHRLICH ASCITIC CARCINOMA

**E.J. Fomenko, E.V. Inzhevatin,
E.V. Slepov, A.A. Savchenko**

In this work was investigated the metabolic changes of cancer cells in mice with Ehrlich ascitic carcinoma in the dynamics of the tumor growing. It is discovered, that the metabolism of Ehrlich ascitic carcinoma cells depends on the stage of the tumor growing.