

СОСТОЯНИЕ АКТИВНОСТИ НАД(Ф)-ЗАВИСИМЫХ ДЕГИДРОГЕНАЗ В ЛИМФОЦИТАХ КРОВИ И В КЛЕТКАХ ЗДОРОВОЙ И ОПУХОЛЕВОЙ ТКАНИ ЛЕГКОГО У БОЛЬНЫХ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ ЛЕГКОГО

П.В. Лапешин¹, А.А. Савченко², Ю.А. Дыхно¹, И.Н. Денисов¹, М.Н. Московских¹, Е.В. Слепов²

*Красноярская государственная медицинская академия¹ ГУ
НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН, г. Красноярск²*

Целью исследования явилось изучение уровней активности метаболических ферментов лимфоцитов крови и в клетках здоровой и опухолевой ткани легкого и их взаимосвязи у больных раком легкого. Активность НАД- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ изучали с помощью биoluminesцентного метода. Обнаружено, что в клетках опухолевой ткани повышена активность оксидоредуктаз, характеризующих интенсивность анаэробных и аэробных процессов, а также ряда реакций макромолекулярного синтеза. Установлено, что изменения активности НАД- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ в клетках здоровой и опухолевой ткани легкого осуществляются сонаправленно. При этом интенсивность метаболических процессов в клетках здоровой и опухолевой ткани не взаимосвязана с размером опухоли. Метаболизм лимфоцитов крови у больных раком легкого характеризуется снижением активности анаэробных и аэробных энергетических процессов. С помощью корреляционного анализа выявлена отрицательная зависимость между уровнем активности дегидрогеназ лимфоцитов, определяющих интенсивность биоэнергетических и пластических процессов, и размером опухоли. Доказано, что регуляторные взаимосвязи между лимфоцитами крови и клетками здоровой и опухолевой ткани реализуются в системе внутриклеточного метаболизма через малат-аспаратный шунт и реакции аминокислотного обмена.

ACTIVITY OF NAD(P)-DEPENDENT DEHYDROGENASES IN BLOOD LYMPHOCYTES, HEALTHY AND TUMOR LUNG TISSUE CELLS IN PATIENTS WITH NON-SMALL-CELL LUNG CANCER

P.V. Lapeshin, A.A. Savchenko, U. A. Dychno, I.N. Denisov, M.N. Moskovskih, E.V. Slepov *Institute for Medical Problems of the North, Siberian Branch Russian Academy of Medical Sciences, Krasnoyarsk State Medical Academy, Krasnoyarsk, Russia*

The aim of the study was to examine enzyme's activity level in blood lymphocytes, healthy and tumor lung tissue cells in patients with lung cancer. NAD and NADP-dependent dehydrogenases activity was studied by bioluminescent method. Dehydrogenases characterizes activity of aerobic and anaerobic reactions and some macromolecular synthesis reactions. We revealed higher dehydrogenases activity in tumor tissue cells, then in healthy tissue. We found similar changes of NAD and NADP-dependent dehydrogenases activity in healthy and tumor lung tissue. Metabolism activity in both tumor and healthy lung tissue did not depend on tumor size. Metabolism of blood lymphocytes in patients with lung cancer was characterized by decreased activity of aerobic and anaerobic energetic processes. Lymphocytes dehydrogenases activity defines the level of bioenergetic and plastic processes in cells. Lymphocytes dehydrogenases activity correlated negatively with tumor size. We proved that regulatory correlation between blood lymphocytes, tumor and healthy lung cells are realized by intercellular metabolism through malat-aspartate shunt and amino acids reactions.

Рак легкого сегодня является одной из самых частых злокачественных опухолей. Во многих странах рак легкого занимает первое место по смертности относительно других видов онкологической патологии. Темп роста заболеваемости связан с широким распространением табако-

курения и загрязнением окружающей среды [3]. В России в 2001 г. раком легкого заболело 62,1 тыс. человек, в структуре заболеваемости мужского населения эта патология занимала I ранговое место. Заболеваемость мужчин в России в 8,7 раза выше, чем женщин [3,5].

Одним из перспективных направлений, позволяющих охарактеризовать патофизиологические механизмы развития опухоли в организме, является исследование особенности метаболических процессов клеток здоровой и опухолевой ткани при раке легкого. Связано это с тем, что все изменения клеточной генетической программы реализуются в том числе и через метаболические процессы [6, 15]. При этом большой интерес представляет изучение метаболизма не только клеток опухолевой ткани, но и лимфоцитов периферической крови. Доказано, что лимфоциты не только осуществляют иммунные функции (в том числе и в системе противоопухолевого иммунитета), но и синтезируют широкий спектр биологически активных веществ, которые играют ключевые роли во взаимосвязях регуляторных систем организма. С другой стороны, богатый набор рецепторов делает их клетками, высокочувствительными к различным нарушениям гомеостаза [1, 10].

Целью исследования явилось сравнительное изучение уровней активности метаболических ферментов лимфоцитов периферической крови и в клетках здоровой и опухолевой ткани легкого у больных раком легкого.

Материалы и методы

На базе торакального отделения Красноярского краевого онкологического диспансера обследовано 90 пациентов в возрасте 30-55 лет, страдающих раком легкого. Всем пациентам выполнены расширенные лоб-, биллоб- и пульмонэктомии. Кровь для исследования забирали при поступлении больных в стационар. В качестве контроля обследовано 106 здоровых мужчины аналогичного возраста.

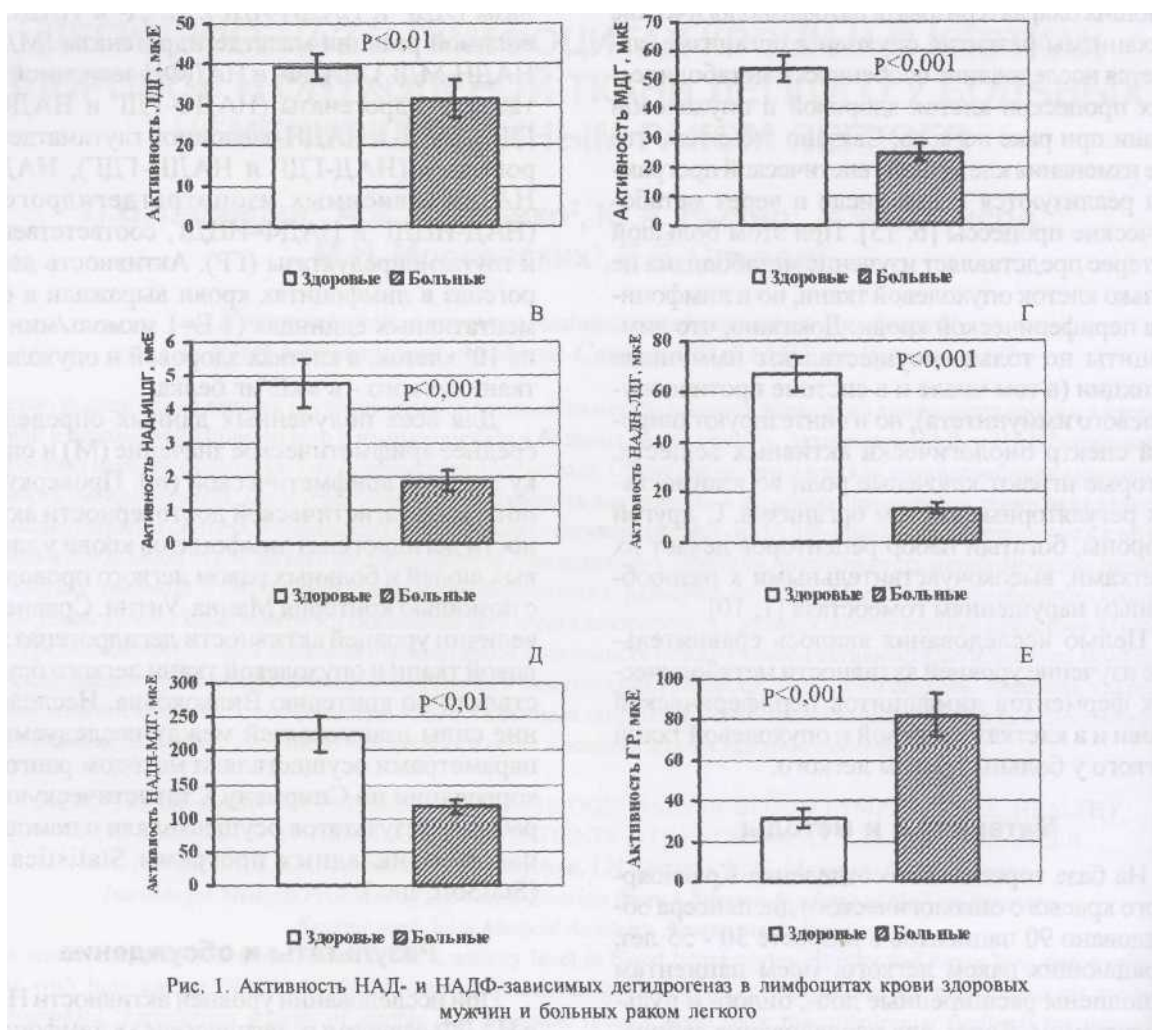
Выделение общей фракции лимфоцитов осуществляли по общепринятому методу в градиенте плотности фиколл-верографина с последующей очисткой от прилипающих клеток. Определение активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах крови и в клетках здоровой и опухолевой ткани легкого проводили биолюминесцентным методом [8]. Данным методом определялась активность следующих ферментов: глюкозо-6 - фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ), малик-фермента (НАДФМДГ), НАД-

и НАДН-зависимой реакции лактатдегидрогеназы (ЛДГ и НАДН-ЛДГ), НАД- и НАДН-зависимой реакции малатдегидрогеназы (МДГ и НАДН-МДГ), НАДФ- и НАДФН-зависимой глутаматдегидрогеназы (НАДФ-ГДГ и НАДФН-ГДГ), НАД- и НАДН-зависимой глутаматдегидрогеназы (НАД-ГДГ и НАДН-ГДГ), НАД- и НАДФ-зависимых изоцитратдегидрогеназ (НАД-ИЦДГ и НАДФ-ИЦДГ, соответственно) и глутатионредуктазы (ГР). Активность дегидрогеназ в лимфоцитах крови выражали в ферментативных единицах (1 Е=1 мкмоль/мин [2]) на 10^4 клеток, в клетках здоровой и опухолевой ткани легкого - в мкЕ/мг белка.

Для всех полученных данных определяли среднее арифметическое значение (М) и ошибку средней арифметической (/и). Проверку гипотезы о статистической достоверности активности дегидрогеназ лимфоцитов крови у здоровых людей и больных раком легкого проводили с помощью критерия Манна-Уитни. Сравнение величин уровней активности дегидрогеназ здоровой ткани и опухолевой ткани легкого осуществляли по критерию Вилкоксона. Исследование силы взаимосвязей между исследуемыми параметрами осуществляли методом ранговой корреляции по Спирмену. Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью пакета прикладных программ Statistica 6.0 (StatSoft, Inc.).

Результаты и обсуждение

При исследовании уровней активности НАД- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах периферической крови обнаружено, что у больных раком легкого снижена активность ЛДГ, МДГ, НАД-ИЦДГ, НАДН-ЛДГ и НАДН-МДГ, но при повышении уровня ГР (рис. 1). Кроме того, в лимфоцитах крови больных мужчин понижена активность НАДФ-ГДГ (у больных - $0,20 \pm 0,04$ мкЕ; в контроле - $0,84 \pm 0,11$ мкЕ; $p < 0,001$) и НАДФ-ИЦДГ (у больных - $2,30 \pm 0,33$ мкЕ; в контроле - $45,42 \pm 6,16$ мкЕ; $P < 0,001$), но при повышении уровней НАД-ГДГ (у больных - $9,23 \pm 1,33$ мкЕ; в контроле - $6,56 \pm 0,74$ мкЕ; $p < 0,05$) и НАДФН-ГДГ (у больных - $198,39 \pm 26,08$ мкЕ; в контроле - $60,15 \pm 5,97$ мкЕ; $p < 0,01$). Уровни активности Г6ФДГ, НАДФМДГ и НАДН-ГДГ в



лимфоцитах крови больных раком легкого соответствуют контрольному диапазону.

Исследуемые оксидоредуктазы участвуют в различных процессах внутриклеточного метаболизма. Так, активность МДГ и НАДИДГ характеризует интенсивность субстратного потока по циклу трикарбоновых кислот [2,12]. Снижение активности данных дегидрогеназ в лимфоцитах крови больных раком легкого отражает понижение активности основного метаболического процесса в митохондриях, определяющего наработку интермедиатов для аэробного дыхания. В то же время в лимфоцитах

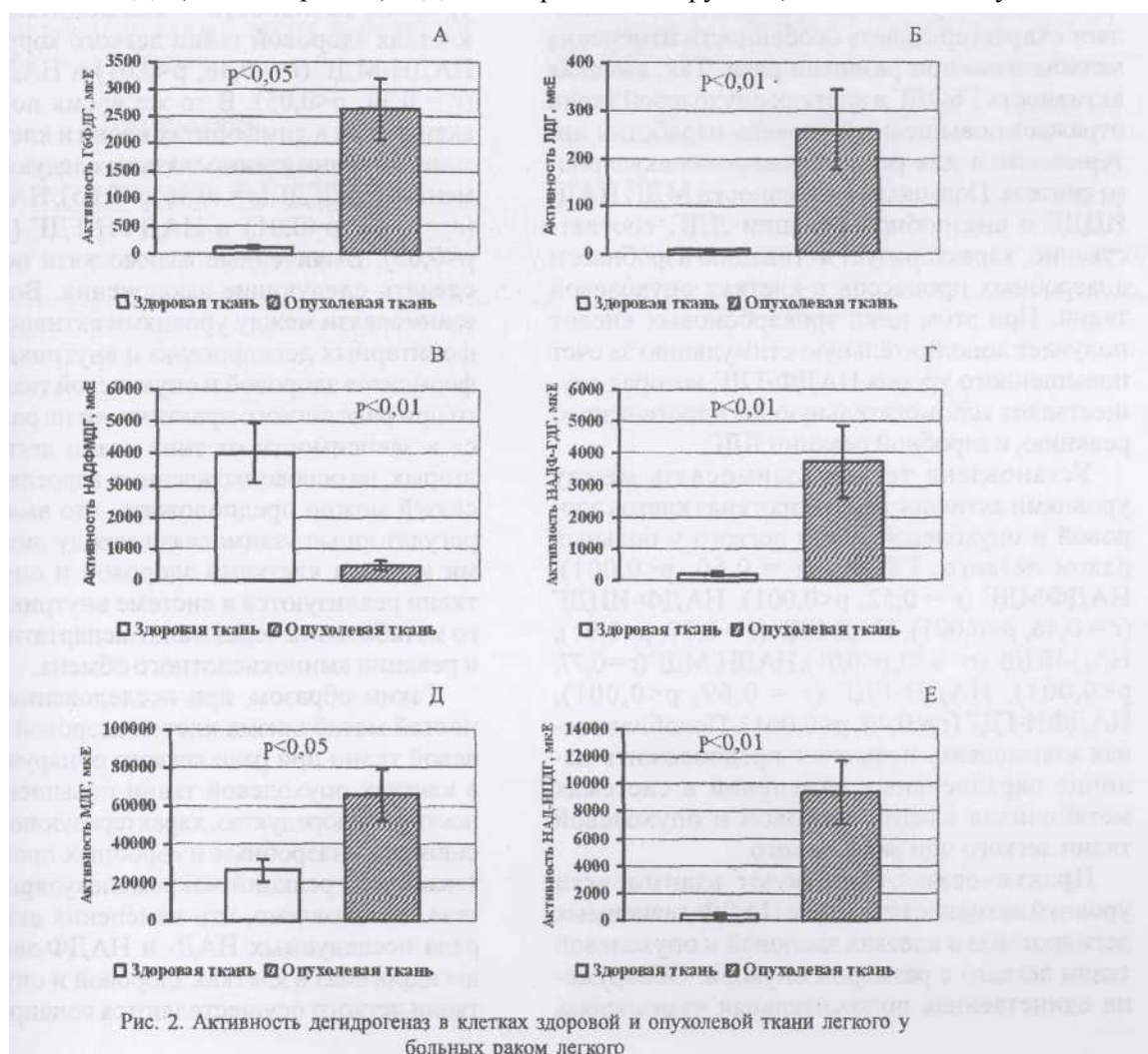
крови больных мужчин выявляется понижение активности анаэробной реакции ЛДГ (НАДН-ЛДГ) и НАДН-зависимой реакции МДГ, которая является ключевой в системе малат-аспартатного шунта митохондрий (поддержка водородного градиента для осуществления окислительного фосфорилирования) [2, 9]. При этом данные ферментативные реакции используют наработанный в гликолизе НАДН. Следовательно, в лимфоцитах крови больных раком легкого снижена интенсивность анаэробных и аэробных энергетических процессов. Биоэнергетическое состояние лимфоцитов у больных

также ухудшает снижение активности аэробной реакции ЛДГ и вспомогательных дегидрогеназных реакций (НАДФ-ГДГ и НАДФ-ИЦДГ), функция которых направлена на повышение интенсивности субстратного потока по циклу Кребса [13]. Повышение активности НАДФН-ГДГ отражает увеличенный отток субстратов с цикла трикарбоновых кислот на реакции аминокислотного обмена.

Выявлена взаимосвязь между уровнями активности ряда исследуемых дегидрогеназ в лимфоцитах крови и размером опухоли. Так обнаружено, что размер опухоли у больных раком легкого отрицательно взаимосвязан с уровнями активности Г6ФДГ ($r = -0,35$, $p < 0,01$), ЛДГ

($r = -0,32$, $p < 0,05$), НАДФ-ГДГ ($r = -0,34$, $p < 0,01$), НАДФ-ИЦДГ ($r = -0,34$, $p < 0,01$) и НАДФН-ГДГ ($r = -0,37$, $p < 0,01$). Необходимо отметить, что Г6ФДГ является инициализирующим и ключевым ферментом пентозофосфатного цикла, от активности которого зависит интенсивность ряда процессов макромолекулярного синтеза [11,14]. Следовательно, установленные взаимосвязи отражают снижение интенсивности пластических и энергетических процессов в лимфоцитах крови у больных раком легкого с ростом опухоли.

Уровни активности метаболических ферментов в клетках здоровой и опухолевой ткани легкого у больных раком легкого представлены на рис. 2. Обнаружено, что в клетках опухолевой



ткани легкого повышена активность Г6ФДГ, ЛДГ, НАДФ-ГДГ, МДГ, НАД-ИЦДГ, но снижен уровень НАДФМДГ. Кроме того, установлено, что в клетках опухолевой ткани легкого значительно повышен уровень анаэробной реакции ЛДГ (в клетках опухолевой ткани - $1322,01 \pm 171,56$ мкЕ/мг белка; в клетках здоровой ткани - $0,01 \pm 0,001$ мкЕ/мг белка; $p < 0,001$). Уровни активности НАДФ-ИЦДГ, НАДН-МДГ, ГР, НАДН-ГДГ и НАДФН-ГДГ в клетках опухолевой ткани отвечает соответствующему диапазону, выявленному в клетках здоровой ткани легкого.

Анализ уровней активности исследуемых дегидрогеназ в клетках здоровой и опухолевой ткани легкого у больных раком легкого позволяет охарактеризовать особенности изменения метаболизма при развитии рака. Так, высокая активность Г6ФДГ в клетках опухолевой ткани отражает повышенный уровень наработки интермедиатов для реакций макромолекулярного синтеза. Повышение активности МДГ, НАД-ИЦДГ и анаэробной реакции ЛДГ, соответственно, характеризует активацию аэробных и анаэробных процессов в клетках опухолевой ткани. При этом цикл трикарбоновых кислот получает дополнительную стимуляцию за счет повышенного уровня НАДФ-ГДГ, которая осуществляет вспомогательную дегидрогеназную реакцию, и аэробной реакции ЛДГ.

Установлена тесная взаимосвязь между уровнями активности дегидрогеназ клеток здоровой и опухолевой ткани легкого у больных раком легкого: Г6ФДГ ($r = 0,60$, $p < 0,001$), НАДФМДГ ($r = 0,52$, $p < 0,001$), НАДФ-ИЦДГ ($r = 0,46$, $p < 0,001$), НАД-ГДГ ($r = 0,37$, $p < 0,01$), НАД-ИЦДГ ($r = 0,40$, $p < 0,01$), НАДН-МДГ ($r = 0,77$, $p < 0,001$), НАДН-ГДГ ($r = 0,69$, $p < 0,001$), НАДФН-ГДГ ($r = 0,46$, $p < 0,001$). Подобная тесная взаимосвязь позволяет предположить наличие параллельных изменений в системах метаболизма клеток здоровой и опухолевой ткани легкого при раке легкого.

Практически отсутствуют взаимосвязи уровней активности НАД- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ в клетках здоровой и опухолевой ткани легкого с размером опухоли. Обнаружена единственная положительная взаимосвязь

между активностью НАДФ-ИЦДГ в клетках здоровой ткани легкого и размером опухоли ($r = 0,30$, $p < 0,05$).

В ряде работ метаболизм лимфоцитов периферической крови характеризуется как «зеркало», отражающее состояние обменных и регуляторных процессов в организме в норме и при патологии [4, 7]. Причем данное положение подтверждается зависимостью ряда метаболических процессов в лимфоцитах от размера опухоли. Кроме того, мы исследовали взаимосвязи между уровнями активности метаболических ферментов лимфоцитов крови и клеток здоровой и опухолевой ткани легкого у больных раком легкого. Обнаружено, что по уровням активности в лимфоцитах крови и клетках здоровой ткани легкого коррелируют НАДН-МДГ ($r = 0,46$, $p < 0,01$) и НАДФН-ГДГ ($r = 0,34$, $p < 0,05$). В то же время по уровням активности в лимфоцитах крови и клетках опухолевой ткани взаимосвязаны следующие ферменты: НАДГДГ ($r = -0,36$, $p < 0,05$), НАДН-МДГ ($r = 0,49$, $p < 0,01$) и НАДФН-ГДГ ($r = 0,35$, $p < 0,05$). Выявленные взаимосвязи позволяют сделать следующие заключения. Во-первых, взаимосвязи между уровнями активности лимфоцитарных дегидрогеназ и внутриклеточных ферментов здоровой и опухолевой ткани легкого при раке легкого практически не различаются в зависимости от типа ткани легкого. Во-вторых, на основе выявленных корреляционных связей можно предположить, что выявленные регуляторные взаимосвязи между лимфоцитами крови и клетками здоровой и опухолевой ткани реализуются в системе внутриклеточного метаболизма через малат-аспартатный шунт и реакции аминокислотного обмена.

Таким образом, при исследовании особенностей метаболизма клеток здоровой и опухолевой ткани при раке легкого обнаружено, что в клетках опухолевой ткани повышена активность оксидоредуктаз, характеризующих интенсивность анаэробных и аэробных процессов, а также ряда реакций макромолекулярного синтеза. Установлено, что изменения активности ряда исследуемых НАД- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ в клетках здоровой и опухолевой ткани легкого осуществляются сопоставленно.

При этом интенсивность метаболических процессов в клетках здоровой и опухолевой ткани не связана с размером опухоли. Установлено, что метаболизм лимфоцитов крови у больных раком легкого характеризуется снижением активности анаэробных и аэробных энергетических процессов. С помощью корреляционного анализа выявлена отрицательная зависимость между уровнем активности дегидрогеназ лимфоцитов, определяющих интенсивность биоэнергетических и пластических процессов, и размером опухоли. Доказано, что регуляторные взаимосвязи между лимфоцитами крови и клетками здоровой и опухолевой ткани реализуются в системе внутриклеточного метаболизма через малат-аспаратный шунт и реакции аминокислотного обмена.

Литература

1. Адо А.Д., Федосеева В.Н., Камышева В.А. // Патол. физиол. и эксперим. терапия. 1999. № 1. С. 4 - 6.

2. Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф. Биологическая химия. М.: Медицина, 1998. 704 с.

3. Давыдов М.И., Полоцкий Б.Е. Рак легкого. М.: Радикс, 1994. 216 с.

4. Захарова Я.Б., Манчук В.Т., Нагирная Л.Л. Метаболизм иммунокомпетентных клеток жителей Севера в онтогенезе. Новосибирск: Изд-во СО РАМН, 1999. 144 с.

5. Злокачественные новообразования в России и странах СНГ в 2001 г. / Под ред. М.И. Давыдова, Е.М. Аксель. ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. М.: Медицинское информационное агентство, 2003. 296 с.

6. Короткими Р.Н., Мацкевич Г.Н., Панова Н.В. и др. // Российский онкологический журнал. 1999. № 2. С. 21 - 24.

7. Нарциссов Р.П. // Педиатрия. 1998. № 4. С. 101 - 105.

8. Савченко А.А., Сунцова Л.И. // Лаб. дело. 1989. №11. С. 23 - 25.

9. Ami T., Inoue A., Uematsu Y. et al. // Res. Vet. Sci. 2003. Vol. 75, № 1. P. 15 - 19.

10. Chan S., Kilby M.D. // J. Immunol. 2000. Vol. 165. P. 1 - 8.

11. Clarke J.L., Vulliamy T.J., Roper D. et al // Blood Cells Mol. Dis. 2003. Vol. 30, № 3. P. 258 - 263.

12. Dawson K.D., Howarth K.R., Tarnopolsky M.A. et al. // J. Appl. Physiol. 2003. Vol. 95, № 3. P. 999 - 1004.

13. Hertz L., Hertz E. // Neurochem. Int. 2003. Vol. 43, № 4 - 5. P. 355 - 361.

14. Matsubara S., Matsubara D., Ishibashi T., Takizawa T. // Eur. J. Histochem. 2003. Vol. 47, № 2. P. 173 - 176.

15. Yin D., Galivan J., Ao W., Yao R // Graie. 2003. Vol. 312. P. 281 - 288.

Поступила 21.09.04