

УДК 616.24-006.6-008.9:616.155.32:576.8

A. A. Savchenko¹, P. V. Lapeshin², U. A. Dychno²

INTERCONNECTION BETWEEN METABOLIC ENZYMES ACTIVITY LEVEL IN BLOOD LYMPHOCYTES, HEALTHY AND TUMOR LUNG TISSUE CELLS IN PATIENTS WITH LUNG CANCER

*¹Institute for Medical Problems of the North Siberian Branch Russian Academy of Medical Sciences, Krasnoyarsk**²Krasnoyarsk State Medical Academy*

ABSTRACT

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 didn't depend on tumor size. Blood lymphocytes metabolism 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 interconnections between blood lymphocytes, tumor and healthy lung cells are realized by intercellular metabolism through malat-aspartate shunt and amino acids reactions.

Key words: lung cancer, metabolism, lymphocytes, healthy tissue of lung, tumor tissue of lung, enzyme activities, anaerobic and aerobic processes, plastic processes.

A. A. Савченко¹, П. В. Лапешин², Ю. А. Дыхно²

ЗАВИСИМОСТЬ АКТИВНОСТИ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ В КЛЕТКАХ ЗДОРОВОЙ И ОПУХОЛЕВОЙ ТКАНИ ЛЕГКОГО У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЛЕГКОГО

*¹ГУ НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН, Красноярск**²Красноярская государственная медицинская академия*

РЕЗЮМЕ

Цель исследования — изучение уровней активности метаболитических 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 биоллюминесцентного 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 метаболитических 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.

Ключевые слова: рак легкого, метаболизм, лимфоциты, здоровая ткань легкого, опухолевая ткань легкого, активность ферментов, анаэробные и аэробные процессы, пластические процессы.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время отмечается прогрессирующий рост злокачественных новообразований во всем мире [3]. В 2001 г. в России было выявлено 451,3 тыс. случаев злокачественных новообразований. Среди мужского населения наиболее часто регистрировали рак легкого, заболеваемость которым составила 62,1 тыс. человек. Также отмечается тенденция к увеличению заболеваемости и омоложению рака легкого [5]. При этом рост заболеваемости связывают не только с улучшением диагностики и общим старением населения, но и с повышением степени загрязнения окружающей среды и генетическими факторами.

Одно из перспективных направлений, позволяющих охарактеризовать патофизиологические механизмы развития опухоли в организме, — 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; 18]. Вместе с тем большой интерес представляет изучение метаболизма лимфоцитов периферической крови. Доказано, что лимфоциты не только осуществляют иммунные функции (в т. ч. и в системе противоопухолевого иммунитета), но и синтезируют биологически активные вещества. С другой стороны, богатый набор рецепторов делает их высокочувствительными клетками к разнообразным нарушениям гомеостаза [1; 11].

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

В качестве показателей внутриклеточного метаболизма выбраны НАД(Ф)-зависимые дегидрогеназы в связи с тем, что, во-первых, основными переносчиками электронов в клетках являются пиридиновые нуклеотиды, а отсюда — активное участие оксидоредуктаз в биоэнергетических процессах; во-вторых, НАД(Ф)-зависимые дегидрогеназы, участвуя в направленной координации сопряженных метаболических потоков, в значительной степени обуславливают адаптивные изменения клеточного обмена веществ [2; 13; 14].

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-, билоб- и пульмонэктомии. Кровь для исследования забирали при поступлении больных в стационар. В качестве контроля обследовано 106 здоровых мужчин 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 биOLUMИнесцентным методом [8]. Данным методом определялась активность следующих ферментов: глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ, КФ 1.1.1.49), малик-фермента (НАДФМДГ, КФ 1.1.1.40), НАД- и НАДН-зависимой реакции лактатдегидрогеназы (ЛДГ и НАДН-ЛДГ, КФ 1.1.1.27), НАД- и НАДН-зависимой реакции малатдегидрогеназы (МДГ и НАДН-МДГ, КФ 1.1.1.37), НАДФ- и НАДФН-зависимой глутаматдегидрогеназы (НАДФ-ГДГ и НАДФН-ГДГ, КФ 1.4.1.4), НАД- и НАДН-зависимой глутаматдегидрогеназы (НАД-ГДГ и НАДН-ГДГ, КФ 1.4.1.2), НАД- и НАДФ-зависимых изоцитратдегидрогеназ (НАД-ИЦДГ, КФ 1.1.1.41 и НАДФ-ИЦДГ, КФ 1.1.1.42 соответственно) и глутатионредуктазы (ГР, КФ 1.6.4.2). 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 (m). 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, силы взаимосвязей между исследуемыми параметрами — методом ранговой корреляции по Спирмену, статистическую обработку результатов — 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 снижена активность НАДФ-ГДГ и НАДФ-ИЦДГ, но при повышении уровней НАД-ГДГ и НАДФН-ГДГ (табл. 1). Уровни активности Г6ФДГ, НАДФМДГ и НАДН-ГДГ в лимфоцитах крови больных раком легкого соответствуют контрольному диапазону.

Исследуемые оксидоредуктазы локализуются в различных процессах внутриклеточного метаболизма. Так, активность МДГ и НАДИЦДГ характеризует интенсивность субстратного потока по циклу трикарбоновых кислот [2; 13; 15]. 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-аспаратного шунта митохондрий (поддержка водород-

Таблица 1
Активность НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ (мкЕ) в лимфоцитах крови у здоровых людей и больных раком легкого ($M \pm m$)

Показатель	Здоровые, $n=106$	Больные, $n=90$	P
Г6ФДГ	$6,78 \pm 0,67$	$5,42 \pm 0,64$	
НАДФМДГ	$4,68 \pm 0,52$	$4,19 \pm 0,45$	
НАДФ-ГДГ	$0,84 \pm 0,11$	$0,20 \pm 0,04$	$<0,001$
НАДФ-ИЦДГ	$45,42 \pm 6,16$	$2,30 \pm 0,33$	$<0,001$
НАД-ГДГ	$6,56 \pm 0,74$	$9,23 \pm 1,33$	$<0,05$
НАДФН-ГДГ	$60,15 \pm 5,97$	$198,39 \pm 26,08$	$<0,01$
НАДН-ГДГ	$55,39 \pm 7,04$	$46,30 \pm 3,85$	

А.

Б.

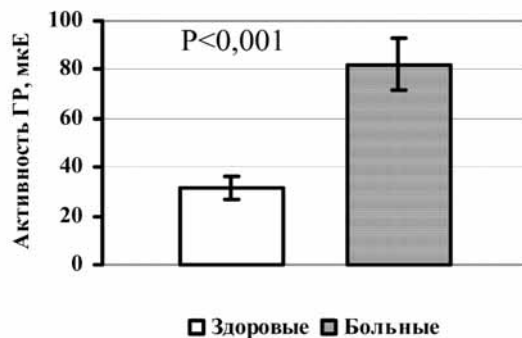
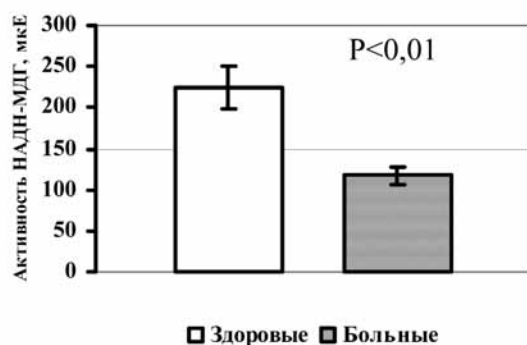
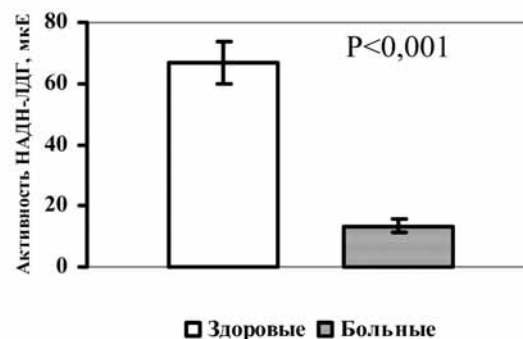
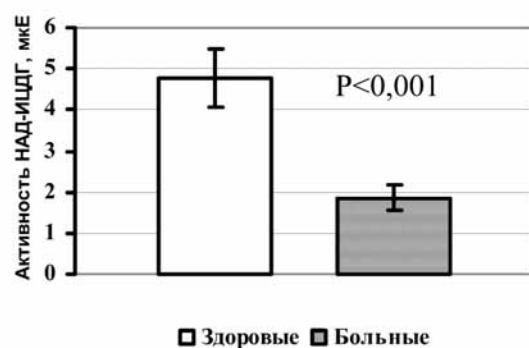
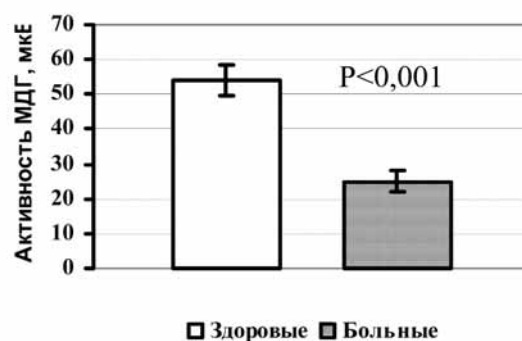
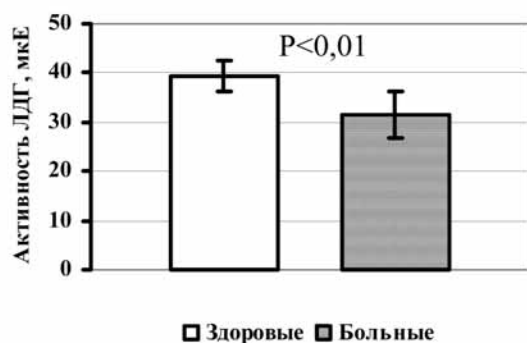


Рис. 1. Активность НАД- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах крови здоровых мужчин и больных раком легкого

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 ($r = -0,34$, $p < 0,01$), НАД-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 [2; 12; 16]. 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. Обнаруже-

но, 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 соответствуют 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 на-

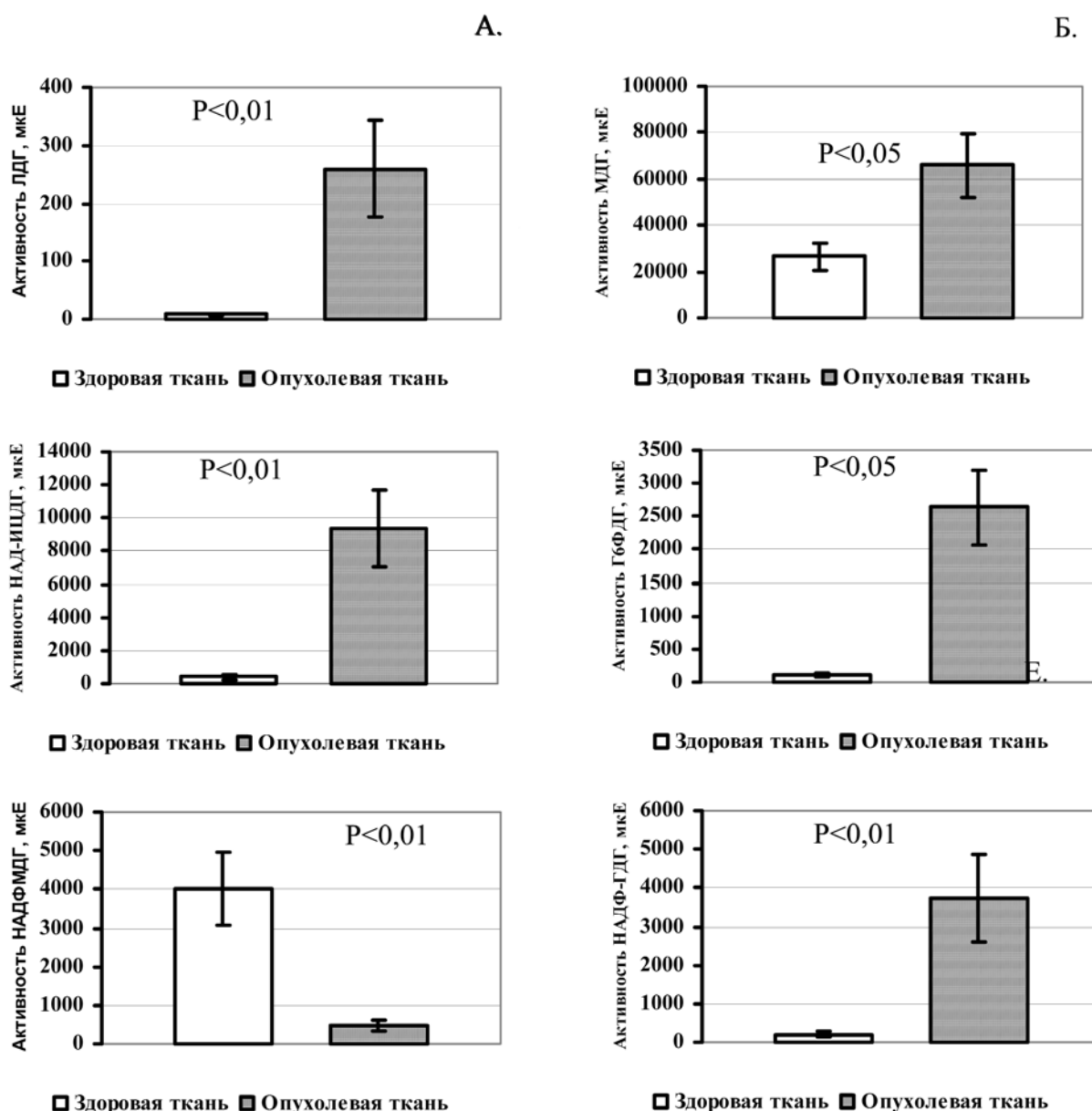


Рис. 2. Активность дегидрогеназ в клетках здоровой и опухолевой ткани легкого у больных раком легкого

работки 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 сонаправленно. При этом интенсивность метаболических процессов в клетках здоровой и опухолевой ткани не взаимосвязана 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-аспартатный шунт и реакции аминокислотного обмена.

ЛИТЕРАТУРА

1. Адо А. Д., Федосеева В. Н., Камышева В. А. О взаимодействии нейромедиаторных и иммунных рецепторов // 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 Л. 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.: МИА, 2003. — 296 с.
6. Короткина Р. Н., Мацкевич Г. Н., Панова Н. В. и др. Исследование ферментов обмена глутатиона в злокачественных новообразованиях легких и вилочковой железы // Российский онкологический журнал. — 1999. — № 2. — С. 21–24.
7. Нарциссов Р. П. Анализ изображения клетки — следующий этап развития клинической цитохимии в педиатрии // Педиатрия. — 1998. — № 4. — С. 101–105.
8. Савченко А. А., Сунцова Л. И. Высококочувствительное определение активности дегидрогеназ в лимфоцитах периферической крови биolumинисцентным методом // Лаб. дело. — 1989. — № 11. — С. 23–25.
9. Arai T., Inoue A., Uematsu Y. et al. Activities of enzymes in the malate-aspartate shuttle and the isoenzyme pattern of lactate dehydrogenase in plasma and peripheral leukocytes of lactating Holstein cows and riding horses // Res. Vet. Sci. — 2003. — Vol. 75, No. 1. — P. 15–19.
10. Arai T., Nakamura M., Magori E. et al. Decrease in malate dehydrogenase activities in peripheral leucocytes of type 1 diabetic dogs // Res. Vet. Sci. — 2003. — Vol. 74, No. 2. — P. 183–185.
11. Chan S., Kilby M. D. Thyroid hormone and central nervous system development // J. Immunol. — 2000. — Vol. 165. — P. 1–8.

12. *Clarke J. L., Vulliamy T. J., Roper D. et al.* Combined glucose-6-phosphate dehydrogenase and glucosephosphate isomerase deficiency can alter clinical outcome // *Blood Cells Mol. Dis.* — 2003. — Vol. 30, No. 3. — P. 258–263.
13. *Dawson K. D., Howarth K. R., Tarnopolsky M. A. et al.* Short-term training attenuates muscle TCA cycle expansion during exercise in women // *J. Appl. Physiol.* — 2003. — Vol. 95, No. 3. — P. 999–1004.
14. *Hertz L., Hertz E.* Cataplerotic TCA cycle flux determined as glutamate-sustained oxygen consumption in primary cultures of astrocytes // *Neurochem. Int.* — 2003. — Vol. 43, No. 4–5. — P. 355–361.
15. *Lu S., Sun X., Shi C., Zhang Y.* Determination of tricarboxylic acid cycle acids and other re-lated substances in cultured mammalian cells by gradient ion-exchange chromatography with suppressed conductivity detection // *J. Chromatogr. A.* — 2003. — Vol. 1012, No. 2. — P. 161–168.
16. *Matsubara S., Matsubara D., Ishibashi T., Takizawa T.* Demonstration of glucose-6-phosphate dehydrogenase in rat Kupffer cells by a newly-developed ultrastructural enzyme-cytochemistry // *Eur. J. Histochem.* — 2003. — Vol. 47, No. 2. — P. 173–176.
17. *Wrenger C., Muller S.* Isocitrate dehydrogenase of *Plasmodium falciparum* // *Eur. J. Bio-chem.* — 2003. — Vol. 270, No. 8. — P. 1775–1783.
18. *Yin D., Galivan J., Ao W., Yao R.* Characterization of the human gamma-glutamyl hydrolase promoter and its gene expression in human tissues and cancer cell lines // *Gene.* — 2003. — Vol. 312. — P. 281–288.