



Биолог. журн. Армении, 4 (71), 2019

ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕТАБОЛИЗМА АДЕНОЗИНА И ЛАКТАТА В ТКАНЯХ КРЫС ПРИ ОПУХОЛИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Н.К. АЙРАПЕТЯН, М.А. ХАЧАТРЯН, А.А. ТРЧУНЯН

Ереванский госуниверситет, кафедра биохимии, микробиологии и биотехнологии
nn.hayrapetyan@ysu.am

Исследовалась активность аденозиндеаминазы в гомогенатах опухолевых и злокачественно нетрансформированных тканей крыс. Выявлена взаимосвязь активности аденозиндеаминазы и концентрации лактата. Результаты исследования позволяют предположить, что стимулирующее влияние лактата на активность аденозиндеаминазы можно оценивать как показатель противоопухолевой эффективности лактата.

Аденозиндеаминаза – аденозин – лактат – гипоксия

Հետազոտվել է ադենոզինդեամինազի ակտիվությունը առևտեստերի բաղկացիկում և չարորակ փոխակերպման չենթարկված հյուսվածքների հոմոգենատներում: Բացահայտվել է ադենոզինդեամինազի ակտիվության և կաթնաթթվի կոնցենտրացիայի փոխկապակցվածությունը: Հետազոտման արդյունքները թույլ են տալիս ենթադրել, որ կաթնաթթվի խթանիչ ազդեցությունը ադենոզինդեամինազի ակտիվության վրա կարող է գնահատվել, որպես կաթնաթթվի հակառակորդային արդյունավետության ցուցանիշ:

Ադենոզինդեամինազ–ադենոզին–կաթնաթթու–հիպոքսիա

The activity of adenosine deaminase in homogenates of tumorous and non-transformed tissues of rats was studied. The relationship of the activity of adenosine deaminase and lactic acid concentrations in those tissues was revealed. Research results suggest that the stimulating effect of lactic acid on the activity of adenosine deaminase can be evaluated as an indicator of antitumor efficacy of lactic acid.

Adenosine deaminase – adenosine – lactic acid – hypoxia

Для опухолевых тканей характерно состояние гипоксии, так как формирующие раковое новообразование кровеносные сосуды содержат многочисленные дефекты и не способны обеспечивать доставку достаточного количества кислорода в ткани. Раковые клетки на низкое парциальное давление кислорода отвечают изменением энергетического метаболизма, что подтверждается данными об активации ферментов гликолиза, ответственных за обеспечение дополнительной энергией высоких потребностей злокачественно трансформированных клеток [7]. Активация гликолиза сопровождается избыточным образованием лактата, следовательно, снижением pH среды. В нормальных клетках снижение pH вызывает клеточную гибель путем некроза или апоптоза, а опухолевые клетки развивают резистентность к индуцированной кислотой токсичности и получают возможность выжить в кислых условиях среды. В современных работах приведены доказательства кислото-зависимой опухолевой инвазии при нарушении метаболизма глюкозы [5].

На протяжении длительного времени изучения истории метаболизма лактата рассматривался лишь как тупиковый метаболит анаэробного катаболизма глюкозы. Но в последние годы было показано, что в опухолевых клетках лактат играет важную роль: молекула участвует в модуляции активности многих ферментов [6]. Одним из таких ферментов считается ответственная за катаболизм аденозина аденозиндезаминаза. Лактат может влиять на обмен нуклеотидов и действовать на течение патологических состояний через изменение активности аденозиндезаминазы. В гипоксическом состоянии, когда ткани обесняются кислородом и в клетках увеличивается концентрация лактата, наблюдается существенное изменение метаболизма аденозина. В условиях спровоцированного гипоксией ацидоза усиливается транспорт аденозина из клетки, который в зависимости от концентрации в 2-10 раз усиливает выход лактата [10]. Накопление внеклеточного аденозина является признаком как гипоксии, так и патофизиологическим признаком широкого круга злокачественных новообразований, сопровождающихся гипоксией [9]. Надо отметить, что причиной увеличения концентрации аденозина при гипоксии может являться также усиленный синтез гипоксия-индуцибельного фактора 1 α (HIF-1 α), который увеличивает экспрессию ферментов, продуцирующих аденозин из адениновых нуклеотидов [11,12]. А аденозин считается одним из иммуносуппрессирующих факторов, продуцируемых опухолью. Аденозин не только ингибирует антиопухолевые иммунные клетки, но и активирует опухоль-промотирующие клетки, что позволяет опухоли уклониться от иммунного надзора и способствует ее развитию и метастазированию [1].

Учитывая вышесказанное, можно рассматривать возможную взаимосвязь между нарушениями углеводного и нуклеотидного обмена, так как лактат, будучи конечным продуктом анаэробного окисления глюкозы, может являться связующим звеном между обменом нуклеиновых кислот и углеводов.

Целью данного исследования была оценка влияния опухоли молочной железы на катаболизм аденозина в тканях с пораженными участками в злокачественно нетрансформированных тканях, изучение взаимосвязи активности аденозиндезаминазы и концентрации лактата, также исследование особенностей распределения активности изоферментов АДА в тканях молочной железы.

Материал и методика. *Лабораторные животные.* Исследование проводилось на 8-недельных крысах породы Wistar массой 90-120 г. Животные содержались в стандартных условиях вивария со свободным доступом к воде и пище, в помещении с температурой воздуха 22 °С при 12-часовом цикле свет/темнота. Исследования проводились в соответствии с правилами биоэтики, утвержденными Национальным комитетом по биоэтике (Армения).

Моделирование эксперимента. Для исследований животные были разделены на 2 группы: 1-я группа – интактные крысы, 2-я – экспериментальная группа (опухоленосители). Опухоль молочной железы индуцировалась введением 20 мг 7,12-диметилбензантрацена (ДМБА). ДМБА вводился крысам в возрасте 45-60 дней с помощью желудочного зонда.

Извлечение биологического материала. Животные выводились из опыта декапитацией. Материалом для исследования служили ткани молочной железы и смежной с ней ткани, а также ткани печени и почек. Для приготовления гомогенатов образцы тканей промывали охлажденным физиологическим раствором, гомогенизировали на льду. Ткани органов гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе Поттера–Эльведжейма в соотношении 1:10 (масса/объем) в К⁺-фосфатном буфере (рН 7.4). Гомогенаты тканей центрифугировали в течение 15 мин при 3000 об/мин. Определение показателей проводилось в надосадках гомогенатов.

Определение биохимических показателей крови. Для определения ферментативной активности АДА в сыворотке крови использовалась методика, основанная на колориметрическом определении аммиака с применением фенолгипохлоритного реактива [8]. Изоферменты аденозиндезаминазы выделяли методом гельфильтрации (Sephadex G100). Количественное определение лактата проводилось по реакции Уфельмана [3]:

Обработка результатов. Данные представлены в виде средних арифметических величин со стандартной ошибкой в соответствии с программой Microsoft Excel 2013. Стандартная ошибка средних арифметических величин не превышает 3% от абсолютных значений (на рисунках не указано). Статистическая обработка данных разных серий экспериментов проводилась с использованием критерия Стьюдента (p) [2]. Различия считали статистически достоверными при $p < 0.05$.

Результаты и обсуждение. Результаты анализа аденозиндезаминазы в тканях крыс, пораженных аденокарциномой молочной железы, показали, что активность фермента в опухолевой ткани составила 46,5 мкмоль/г ткани, что в 1,8 раз превышает соответствующее значение в тканях интактных животных (25,8 мкмоль/г ткани) (рис. 1). Данные подтверждают гипотезу об усилении экспрессии аденозиндезаминазы при злокачественной модификации ткани.

Что касается злокачественно нетрансформированных тканей (печень, почки), то здесь наблюдаются небольшие колебания активности аденозиндезаминазы. В гомогенате тканей печени 2-й группы животных активность АДА составляла 15,4 мкмоль/г ткани, в той же ткани интактных животных – 14,1 мкмоль, в тканях почек – 12,2 мкмоль и 11,2 мкмоль соответственно (рис. 1). Полученные различия в пределах физиологической нормы указывают на отсутствие значительных изменений в этих тканях.

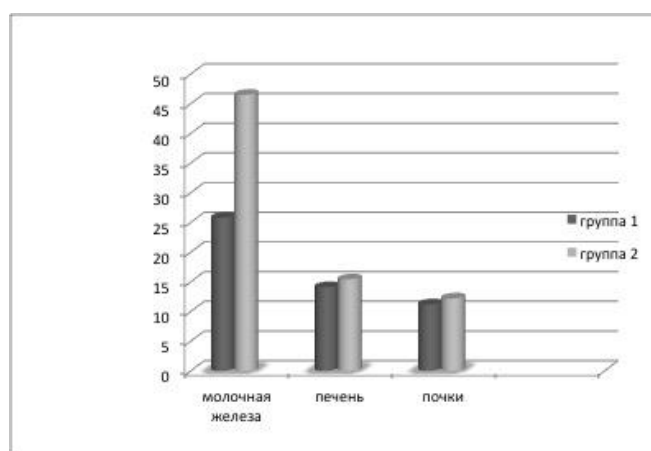


Рис. 1. Дезаминирование аденозина в гомогенатах молочной железы, тканей печени и почек (мкмоль NH_3 на 1г ткани). 1 – интактная группа, 2 – экспериментальная группа
*различия достоверны, $n=10$, $p < 0,05$.

Как было отмечено, данные о биохимических процессах во время опухолевого роста свидетельствует о том, что прогрессирование опухоли предполагает усиление процессов, ответственных за обеспечение дополнительной энергией злокачественно трансформированных клеток. В нашем случае об этом свидетельствует повышение концентрации лактата в опухолевой ткани (4,8 мкмоль в пробе), в тех же тканях интактных животных – 1,9 мкмоль. Увеличение концентрации лактата (в 2,5 раза) указывает на анаэробный распад глюкозы (рис. 2).

Изменения содержания лактата в тканях печени и почек при развитии опухолевых процессов в организме указывают на некоторую активацию гликолиза в тканях, не имеющих признаков злокачественной трансформации. В гомогенатах печени концентрация лактата выросла на 12 %, почек – на 10,3 % (рис. 2). Необоснованным кажется рост концентрации лактата в почечной ткани, так как действующая в почках пируваткарбоксилаза при ацидозе проявляет высокую активность, что предполагает активный процесс глюконеогенеза и, соответственно, не провоцирует накопление пирувата и превращение его в лактат.

Надо отметить, что в отличие от опухолевых тканей, в злокачественно не трансформированных тканях увеличение содержания лактата не сопровождается повышением активности АДА.

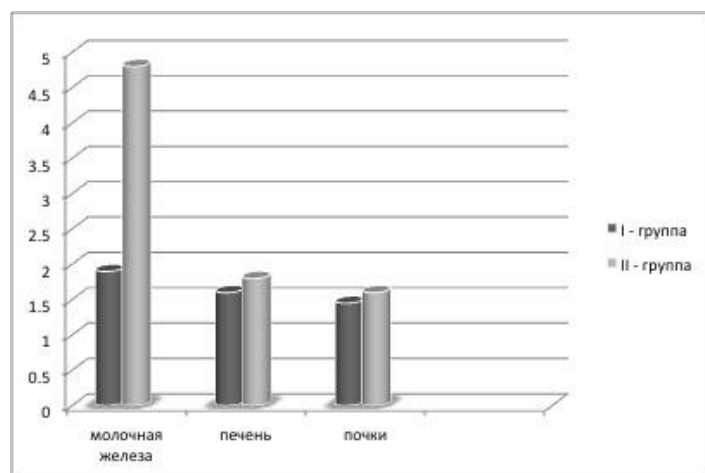


Рис. 2. Изменения концентрации лактата в гомогенатах молочной железы, тканей печени и почек.

1 – интактная группа, 2 – экспериментальная группа

*различия достоверны, $n=10$, $p<0,05$.

Анализируя полученные данные, можно заключить, что при опухолевом росте в очагах поражения отмечаются серьезные изменения как процессов углеводного, так и нуклеотидного обмена. Нелишне отметить, что установленная активация катаболизма аденозина в пораженной опухолью ткани может быть результатом изменения pH среды, обусловленным значительным повышением уровня лактата, и указывать на взаимосвязь данных показателей. Выявленное значительное повышение активности АДА, приводящее к снижению концентрации аденозина в опухолевых клетках, на фоне повышения концентрации лактата может быть результатом стимулирующего влияния лактата на активность АДА. С другой стороны, отмеченный рост активности аденозиндезаминазы может быть результатом увеличения субстрата аденозина в малигнизированной ткани.

Гельфильтрация гомогенатов опухолевой ткани выявила аденозиндезаминазную активность в 9-10-й фракциях, что соответствует высокомолекулярной изоформе АДА (АДА1), а также в 21-23-й фракциях, что соответствует низкомолекулярной изоформе (АДА2) (рис. 3, 4).

Обнаруженная в гомогенатах опухолевой ткани активность изоформ АДА превышает активность изоформ АДА в гомогенатах интактных тканей в 1,9 и 1,8 раза соответственно.

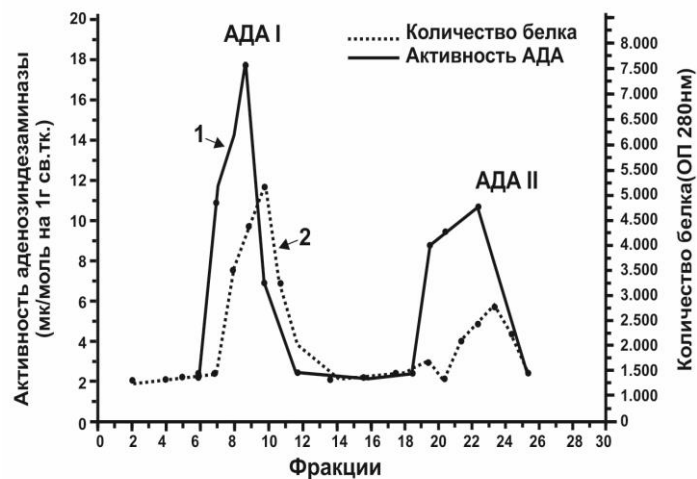


Рис. 3. Активность изоформ АДА после гельфильтрации в тканях молочной железы при физиологической норме. Профили элюатов: аденозиндезаминазная активность-1, выход белка-2.

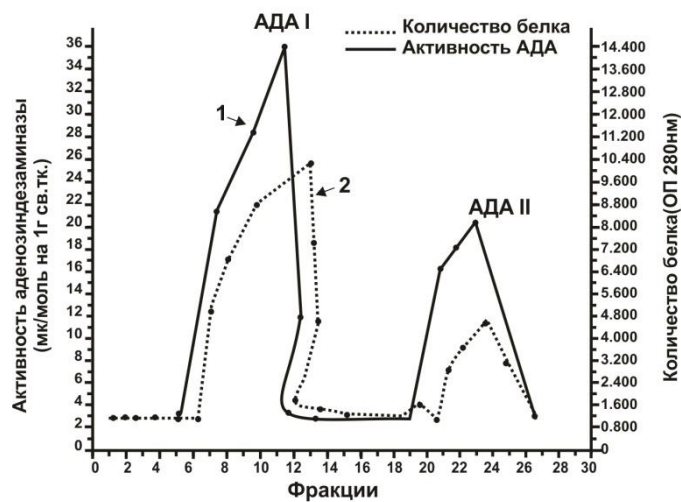


Рис. 4. Активность изоформ АДА после гельфильтрации в тканях молочной железы, пораженной опухолью. Профили элюатов: аденозиндезаминазная активность-1, выход белка-2.

Установлено, что повышенная активность АДА в малигнизированных тканях обеспечивается экспрессией обоих изоферментов АДА. Однако надо отметить, что соотношение активности изоферментов АДА1 и АДА2 как в опухолевых, так и в интактных тканях сохраняется на одном уровне, и основной вклад в общую аденозиндезаминазную активность вносит АДА1.

О том, что АДА2, являясь внеклеточной молекулой, обладает меньшей, по сравнению с АДА1, каталитической активностью и в нормальных для клетки условиях отмечается и в работах других авторов [4].

Повышение концентрации лактата в опухолевой ткани влияет на содержание аденозина, возможно, посредством индукции аденозиндезаминазы. Повышенная общая активность АДА результат экспрессии обоих изоферментов аденозиндезаминазы. В малигнизированных тканях активность изоформы АДА1 значительно превышает активность изоформы АДА2.а

ЛИТЕРАТУРА

1. Жулай Г.А., Олейник Е.К., Чуров А.В., Романов А.А., Кравченко П.Н., Олейник В.М. Роль Трег-клеток в аденозин-опосредованной иммунной супрессии при колоректальном раке, Медицинская иммунология, 19, 1, с. 89-94, 2017.
2. Кобзарь А.И., Прикладная математическая статистика, М., Физматлит, 816 с., 2006.
3. Bergmeyer H.U. Methods of Enzymatic Analysis, Basel, Verlag Chemie, 1, 7, 10, 701 p., 1984.
4. Gakis C. Adenosine deaminase (ADA) isoenzymes ADA1 and ADA2: diagnostic and biological role, Eur. Respir J., 9, p. 623-624, 1996.
5. Gatenby, R.A., Gawlinski E.T., Gmitro A.F., Kaylor B., Gillies R.J. Acid-mediated tumor invasion: a multidisciplinary study, Cancer Res., 66, p. 5216-5223, 2006.
6. Granja S., Tavares-Valente D., Queiros O., Baltazar F. Value of pH regulators in the diagnosis, prognosis and treatment of cancer, Semin Cancer Biol, 43, p. 17-34, 2017.
7. Kim C.H., Park J.E., Yoo S.S., Lee S.Y., Cha S.L., Park J.Y., Lee J. Usefulness of serum lactate dehydrogenase/pleural fluid adenosine deaminase ratio for differentiating *Mycoplasma pneumoniae* parapneumonic effusion and tuberculous pleural effusion, J. Infection, 75, 1, p. 581-583, 2017.
8. Martinek R.G. Micromethod for estimation of serum adenosine deaminase, Clin. Chem., p. 620-625, 1963.
9. Muller S., Muller L., Whiteside T.L. Immunoregulatory activity of adenosine and its role in human cancer progression, Expert Rev. Clin. Immunol., 10, p. 897-914, 2014.
10. Vaupel P., Multoff G. Accomplices of the hypoxic tumor microenvironment compromising antitumor immunity: adenosine, lactate, acidosis, vascular endothelial growth factor, potassium ions, and phosphatidylserine, Front. Immunol., 8, p. 1-6, 2017.
11. Vaupel P., Multoff G. Hypoxia/HIF-1 α -driven factors of the tumor microenvironment impeding antitumor immune responses and promoting malignant progression, Adv. Exp. Med. Biol., 1072, p. 171-175, 2018.
12. Zavialov A.V., Gracia E., Glaichenhaus N., Franco R., Lauvau G. Human adenosine deaminase 2 induces differentiation of monocytes into macrophages and stimulates proliferation of T helper cells and macrophages, J. Leukoc. Biol, 88, 2, p. 279-290, 2010.

Поступила 21.10.2019