

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
«Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр  
Сибирского отделения Российской академии наук»

*На правах рукописи*

Инжеваткин Евгений Владимирович

ЗАКОНОМЕРНОСТИ ИЗМЕНЕНИЙ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ  
ОБМЕННЫХ ПРОЦЕССОВ В УСЛОВИЯХ КАНЦЕРОГЕНЕЗА  
У МЫШЕЙ С АСЦИТНОЙ КАРЦИНОМОЙ ЭРЛИХА  
(экспериментальное исследование)

14.03.03 – патологическая физиология

Диссертация на соискание ученой степени  
доктора биологических наук

Научный консультант:  
доктор медицинских наук, профессор  
Савченко Андрей Анатольевич

Красноярск – 2018

## СОДЕРЖАНИЕ

	Стр.
ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	15
1.1. Особенности обменных процессов в опухолевой ткани как фактор патогенеза онкологических заболеваний	15
1.2. Механизмы иммуносупрессивного действия опухоли	27
1.3. Неспецифические механизмы адаптации организма и клетки	41
1.4. Кинетические характеристики опухолевого роста	49
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	53
2.1. Характеристика лабораторных животных и методы прививки опухоли	53
2.2. Выделение лимфоцитов из крови животных	54
2.3. Выделение опухолевых клеток из брюшной полости животных	54
2.4. Взятие образцов ткани солидной карциномы Эрлиха	55
2.5. Выделение перитонеальных макрофагов	56
2.6. Взятие образцов ткани печени	56
2.7. Билюминесцентный метод определения активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в клетках различных тканей животных	56
2.8. Билюминесцентный метод определения концентраций метаболитических субстратов и НАД <sup>+</sup> в клетках различных тканей животных	61
2.9. Хемилюминесцентный метод исследования образования активных форм кислорода в различных тканях животных	63
2.10. Определение содержания малонового диальдегида в различных тканях животных	63
2.11. Статистические методы исследования	64

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	66
3.1. Кинетика смертности животных после инокуляции клеток АКЭ	66
3.2. Особенности обмена веществ в лимфоцитах крови мышей с АКЭ после инокуляции $3 \times 10^6$ опухолевых клеток	68
3.3. Особенности обмена веществ в лимфоцитах крови мышей с АКЭ после инокуляции $1 \times 10^4$ опухолевых клеток	96
3.4. Особенности обмена веществ в макрофагах, инфильтрующей опухоль, у мышей с АКЭ в процессе роста опухоли	120
3.5. Особенности обмена веществ в клетках АКЭ у мышей в процессе роста опухоли после инокуляции $3 \times 10^6$ опухолевых клеток	128
3.6. Особенности обмена веществ в клетках солидной карциномы Эрлиха	151
3.7. Особенности обмена веществ в гепатоцитах у мышей с АКЭ в процессе роста опухоли после инокуляции $3 \times 10^6$ опухолевых клеток	158
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	169
ВЫВОДЫ	186
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	189
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	190

## ВВЕДЕНИЕ

### **Актуальность темы исследования**

В основе патогенеза онкологических заболеваний важное место занимают нарушения обменных процессов в клетках злокачественных опухолей. Возникающие в процессе малигнизации изменения затрагивают пути энергетического обмена, обмена белков, липидов и нуклеиновых кислот опухолевых клеток, что способствует их выживанию в анаэробных условиях и обеспечивает высокую пролиферативную активность опухолевой ткани (Fang J.S. et al., 2008; Ogino S. et al., 2011; Kurhanewicz J. et al., 2012).

Клетки опухоли захватывают у организма различные ресурсы, выделяют в его среду токсичные продукты своей жизнедеятельности. Развиваются гипоксия, ацидоз, возникает дефицит энергетических и пластических ресурсов, растет количество активных форм кислорода (АФК), нарушается гомеостаз организма. В результате возникают системные эффекты, среди которых находится и нарушение функций клеток иммунной системы (Fischer K. et al., 2007; Swietach P. et al., 2007; Martinez-Outschoorn U.E. et al., 2011). Учитывая ключевую роль иммунной системы в защите организма от злокачественных новообразований, можно утверждать, что действие опухоли на функции клеток иммунной системы является одним из главных факторов патогенеза онкологических заболеваний.

Нарушение функций клеток иммунной системы, при этом, может рассматриваться как результат срыва их адаптации в условиях действия факторов канцерогенеза. Интенсивность действия этих факторов закономерно увеличивается по мере роста опухоли, что приводит к постепенному изменению в функционировании клеток (Olinescu A. et al., 1983; Мальцева В.Н., Сафронова В.Г., 2009; Ozaslan M. et al., 2011). Однако известно, что неблагоприятные воздействия далеко не всегда приводят к фатальным последствиям для клеток. Это объясняется наличием в клетках эффективных защитных систем.

Среди них можно назвать индукцию белков теплового шока (БТШ), реакцию отклика неструктурированных белков (unfolded protein response, UPR), молекулярные механизмы защиты клеток от гипоксии с участием гипоксия-индуцируемого фактора HIF и др. (Birkenfeld A.L. et al., 2011; Brahim-Horn M.C. et al., 2011; Chakrabarti A.A. et al., 2011; Stankowski J.N. et al., 2011; Füst G. et al., 2012; Semenza G.L., 2012). Отдельное место в системе клеточной защиты занимают антиоксидантные ферменты и эндогенные антиоксиданты, защищающие клетку от действия активных форм кислорода (АФК), продукция которых значительно возрастает при попадании клетки в неблагоприятные условия (Zhao Y. et al., 2009; Kilburn L. et al., 2010; Carr W.J. et al., 2011; Sugadev R. et al., 2011; Ognjanović B.I. et al., 2012; Ray P.D. et al., 2012).

Возможность реализации любых механизмов клеточной адаптации напрямую зависит от особенностей протекающих в клетках обменных процессов, поскольку именно они обеспечивают клетку пластическими и энергетическими ресурсами, которые требуются для развития реакций адаптации (Fang J.S. et al., 2008; Wenger J.B. et al., 2011). При этом нарушения внутриклеточных обменных процессов являются одним из наиболее ранних результатов экстремального воздействия на клетку (Wellen K.E., Thompson C.B., 2010; DeBerardinis R.J., Thompson C.B., 2012).

Изменения в обмене веществ неизбежно будут влиять на функциональные возможности клеток. Так, именно с этим обстоятельством связывают развивающуюся в процессе опухолевого роста дисфункцию клеток иммунной системы (Viola A., Bronte V., 2007; Rabinovich G.A. et al., 2007; Козлов В.А. и др., 2009). Следовательно, изучение изменений обменных процессов в клетках иммунной системы, в процессе роста опухоли, имеет важное фундаментальное и прикладное значение.

Также нужно учесть, что адаптационные возможности клетки, как и любой биологической системы, уменьшаются по мере возрастания тяжести ее состояния (Нефедов В.П., 2000; Нефедов В.П. и др., 2002). В случае

онкологического заболевания тяжесть состояния определяется объемом опухоли, скорость роста которой зависит от природы опухоли и от особенностей организма.

Было показано, что у мышей с асцитной карциномой Эрлиха (АКЭ), уровень цитотоксичности Т-лимфоцитов возрастает после инокуляции опухолевых клеток, достигая максимального уровня к 5-м сут опухолевого роста, после чего снижается в течение всего последующего периода, достигая к 20-м сут 1/2 от нормального уровня (Olinescu et al., 1983). Также у мышей с АКЭ описано нарушение функционирования НК-клеток и макрофагов, снижение уровня клеточной пролиферации в костном мозге, коррелирующее с ростом опухоли (Ozaslan et al., 2011).

Учитывая значение иммунной системы в защите организма от злокачественных новообразований и роль обмена веществ в обеспечении клеток необходимыми ресурсами для их адаптации в условиях канцерогенеза, актуальным представляется изучение внутриклеточных обменных процессов, происходящих в клетках иммунной системы в процессе роста опухоли. Сравнение этих изменений с процессами, происходящими в то же время в клетках самой опухоли и в клетках нормальной не иммунной ткани организма, позволит сделать выводы о наличии или отсутствии общих, неспецифических по отношению к типу клеток закономерностей внутриклеточных обменных процессов. Это может быть полезным для разработки новых методов терапии онкологических заболеваний путем целевой коррекции обмена веществ в клетках иммунной системы.

Изучение кинетики онкологических процессов целесообразно проводить с использованием перевиваемых опухолей лабораторных животных, примером которых является асцитная карцинома Эрлиха (АКЭ). Такие эксперименты, в отличие от клинических наблюдений, позволяют контролировать условия возникновения опухоли (Эмануэль Н.М., 1977; Эмануэль Н.М., 2006).

### **Степень разработанности темы**

Было обнаружено, что у больных немелкоклеточным раком легкого в лимфоцитах крови уменьшается активность аэробных и анаэробных энергетических процессов, что коррелирует с увеличением размеров опухоли. В частности, происходит примерно двукратное уменьшение активности изоцитратдегидрогеназы, малатдегидрогеназы для НАД-зависимых реакций, малатдегидрогеназы и лактатдегидрогеназы для НАДН-зависимых реакций (Лапешин П.В. и др., 2005). В работе (Савченко А.А., Манчук В.Т., 2003) было показано, что адаптация организма человека к условиям Крайнего Севера сопровождается активацией аэробных энергетических процессов лимфоцитов с увеличением оттока субстратов от реакций пластического обмена к реакциям энергетического обмена. В дальнейшем, при переходе к долговременной адаптации, уровень энергетических процессов постепенно снижается. Однако, в случае срыва адаптации, наблюдается ингибирование энергетических процессов лимфоцитов и нарушаются взаимосвязи различных метаболических процессов в клетках, что сопровождается возникновением иммунодефицитного состояния. Похожие изменения выявлены и в метаболизме лимфоцитов крови у подростков с хроническими вирусными гепатитами (Соловьева И.А. и др., 2011).

В работе (Смирнова О.В. и др., 2007) приводятся сведения, что развернутая и терминальная стадии хронического миелолейкоза характеризуется снижением в лимфоцитах интенсивности гликолиза, ЦТК, митохондриального транспорта, катаболизма липидов, уровня антиоксидантной защиты по сравнению с лимфоцитами здоровых людей, что также сопровождается развитием иммунодефицитного состояния. Известно также, что опухолевые клетки способны активно перераспределять субстраты между различными метаболическими путями, что обеспечивает их адаптацию к изменяющимся условиям существования (Kroemer G., Pouyssegur J., 2008; DeBerardinis R.J. et al., 2008).

В то же время, в литературе отсутствуют системно изложенные сведения, раскрывающие неспецифическую составляющую механизмов адаптации и срыва адаптации клеток различных тканей в организме в условиях канцерогенеза.

**Цель работы** - установить закономерности изменений внутриклеточных обменных процессов в условиях канцерогенеза у мышей с асцитной карциномой Эрлиха для патогенетического обоснования разработки методов коррекции обмена веществ при онкологических заболеваниях.

**Задачи:**

1. Установить особенности обмена веществ в лимфоцитах крови у мышей с АКЭ в процессе роста опухоли после внутрибрюшинной прививки  $3 \times 10^6$  и  $1 \times 10^4$  опухолевых клеток.

2. Оценить особенности обменных процессов макрофагов, инфильтрующей опухоль, у мышей с АКЭ в процессе роста опухоли.

3. Исследовать особенности обмена веществ в клетках АКЭ у мышей в процессе роста опухоли после внутрибрюшинной прививки  $3 \times 10^6$  опухолевых клеток.

4. Выявить изменения обмена веществ, развивающиеся в гепатоцитах мышей в процессе роста АКЭ после внутрибрюшинной прививки  $3 \times 10^6$  опухолевых клеток.

5. Установить неспецифические механизмы и закономерности внутриклеточных обменных процессов в организме мышей с АКЭ, развивающиеся в ответ на действие патогенных факторов онкологического заболевания.

**Научная новизна:**

Впервые на модели экспериментального опухолевого роста у мышей с АКЭ установлено, что на стадии выраженных проявлений болезни в лимфоцитах крови увеличивается уровень взаимосвязей между показателями



энергетического и пластического обмена, возрастает интенсивность аэробного гликолиза, пентозо-фосфатного пути, возрастает мощность антиоксидантной защиты клеток. Эти изменения можно рассматривать в качестве механизмов клеточного стресса и адаптации к воздействию патогенетических факторов канцерогенеза.

В терминальном периоде заболевания в лимфоцитах крови у мышей с АКЭ снижается уровень аэробного обмена, ослабевает взаимосвязь энергетических и пластических путей обмена, челночных механизмов транспорта НАДН из цитозоля в митохондрии, уменьшается мощность антиоксидантной защиты, нарушаются механизмы регуляции внутриклеточного обмена веществ. Такие изменения можно трактовать как срыв адаптации клеток.

Впервые обнаружено, что рост АКЭ характеризуется изменениями внутриклеточных обменных процессов макрофагов, инфильтрующих опухоль. Полученные результаты свидетельствуют о развитии в макрофагах условий для снижения интенсивности энергетического обмена вследствие уменьшения активности ферментов ЦТК и гликолиза, замедления поступления в энергетический обмен субстратов белкового обмена, а также говорят о снижении уровня защиты клеток от действия активных форм кислорода.

В клетках АКЭ на стадии выраженных проявлений болезни возрастает интенсивность гликолиза, ЦТК, транспорта субстратов из цитозоля в митохондрии, усиливается взаимосвязь между различными путями обмена веществ. На терминальной стадии болезни в клетках АКЭ снижается интенсивность всех исследованных внутриклеточных обменных процессов. Впервые выявлена пространственная метаболическая неоднородность солидной формы карциномы Эрлиха.

Впервые обнаружено, что в гепатоцитах мышей после внутрибрюшинной прививки АКЭ в процессе роста опухоли увеличивается активность ферментов энергетического обмена, возрастает активность

глутаматдегидрогеназ, что обуславливает усиление интенсивности обмена веществ между реакциями ЦТК и аминокислотного обмена. Возрастает активность челночных механизмов транспорта НАДН из цитозоля в митохондрии, на фоне усиления процессов перекисного окисления липидов, о чем свидетельствует рост уровня МДА и люминол-зависимой хемилюминесценции.

Впервые обнаружено, что изменения обмена веществ в лимфоцитах крови, макрофагах, инфильтрующей опухоли, гепатоцитах и клетках опухоли у мышей с АКЭ в процессе роста опухоли являются неспецифическими по отношению к типу исследованных клеток и определяются интенсивностью воздействия факторов канцерогенеза. Скорость этих изменений определяется анатомо-физиологическими особенностями тканей. Наибольшая скорость изменений характерна для макрофагов, инфильтрующей опухоли, наименьшая – для клеток печени.

#### **Теоретическая и практическая значимость работы:**

На модели асцитной карциномы Эрлиха у мышей раскрыты новые механизмы патогенеза онкологического заболевания: на стадии выраженных проявлений болезни в лимфоцитах крови возрастает активность ферментов энергетического обмена, увеличивается интенсивность пластических процессов, повышается интенсивность обмена веществ между реакциями энергетического обмена и пластическими процессами, возникают условия для усиления антиоксидантной защиты клеток. В терминальном периоде заболевания снижается уровень аэробного обмена, активность ферментов, связывающих энергетические и пластические пути обмена веществ, челночных механизмов транспорта НАДН из цитозоля в митохондрии, уменьшается активность антиоксидантной защиты, нарушаются механизмы регуляции внутриклеточных обменных процессов. Аналогичные изменения наблюдаются в клетках АКЭ. Установлено, что в макрофагах, инфильтрующей опухоли, интенсивность процессов энергетического и пластического обмена снижается в начальном периоде заболевания, что

является следствием иммуносупрессивного действия опухолевого микроокружения. В гепатоцитах мышей с АКЭ в процессе роста опухоли, включая терминальную стадию, увеличивается интенсивность обмена веществ между реакциями ЦТК и аминокислотного обмена и активность челночных механизмов транспорта НАДН из цитозоля в митохондрии.

Полученные данные позволяют расширить знания о патологических изменениях в организме в процессе опухолевого роста. Результаты работы показали, что в макрофагах, инфильтрующей опухоль, патологические изменения развиваются наиболее скоротечно, что связано с максимальной интенсивностью действия факторов канцерогенеза. Интенсивность воздействия факторов канцерогенеза на гепатоциты мышей с АКЭ наименьшая среди исследованных клеток.

В ходе выполнения диссертационного исследования разработана методика биолюминесцентного определения концентрации субстратов НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ, а также концентрации НАД<sup>+</sup> в лимфоцитах и опухолевых клетках у мышей с АКЭ.

Полученные результаты могут быть использованы при создании новых методов диагностики, коррекции состояния организма и прогноза при онкологических заболеваниях, а также при разработке новых средств противоопухолевой терапии.

### **Методология и методы исследования**

Проведено экспериментальное исследование с использованием лабораторных животных – мышей, полученных в питомнике Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор» (Новосибирская область), содержащихся в стандартных условиях вивария. В качестве экспериментальной модели опухолевого роста использовалась карцинома Эрлиха в асцитном и солидном вариантах. В работе были использованы следующие основные методы исследований: биолюминесцентное определение активности ферментов и концентраций субстратов и коферментов в лимфоцитах крови, макрофагах,

инфильтрующих опухоль, гепатоцитах, опухолевых клетках мышей; хемилюминесцентный анализ активных форм кислорода; определение малонового диальдегида в тесте с тиобарбитуровой кислотой; непараметрические методы статистических исследований.

**На защиту выносятся следующие положения:**

1. В процессе роста опухоли у мышей с АКЭ в клетках различных тканей организма происходят направленные изменения обмена веществ, которые являются неспецифическими по отношению к типу ткани и зависят от интенсивности действующих на них патогенетических факторов опухолевого процесса.

2. В лимфоцитах крови у мышей с АКЭ на стадии выраженных проявлений болезни возникают условия для увеличения интенсивности энергетического обмена, процессов биосинтеза, повышается интенсивность субстратных потоков между реакциями энергетического и пластического обмена. В терминальном периоде снижается уровень всех исследованных внутриклеточных обменных процессов.

3. В макрофагах, инфильтрующих опухоль, у мышей с АКЭ возникают условия для снижения интенсивности субстратного потока в цикле трикарбоновых кислот, замедления окислительного дезаминирования глутамата, регенерации НАДФН и уменьшения мощности антиоксидантной защиты.

4. В клетках АКЭ в начальном периоде заболевания возрастает интенсивность гликолиза, ЦТК, активизируется транспорт субстратов в митохондрии, возрастает уровень процессов биосинтеза. В терминальном периоде в клетках АКЭ снижается интенсивность всех исследованных обменных процессов.

5. В процессе роста АКЭ в печени мышей возникают условия для увеличения активности реакций энергетического обмена, усиления взаимосвязи между реакциями энергетического и пластического обмена, при

усилении процессов перекисного окисления липидов и недостаточной мощности антиоксидантной защиты.

6. Интенсивность действия патогенетических факторов опухолевого процесса на клетки различных тканей у мышей с АКЭ в процессе роста опухоли определяется кинетическими характеристиками опухолевого роста и анатомо-физиологическими особенностями тканей.

### **Апробация работы**

Результаты работы были представлены на Всероссийской научно-практической конференции с международным участием “Метаболические механизмы иммунореактивности”, Красноярск, 2004; на XII Международном симпозиуме “Сложные системы в экстремальных условиях”, Саяны, 2004 г.; на Межрегиональной научно-практической конференции “Объединение субъектов Российской Федерации и проблемы природопользования в Приенисейской Сибири”, Красноярск, 2005 г.; на XIII Международном симпозиуме “Сложные системы в экстремальных условиях”, Красноярск, 2006 г.; на заседаниях Красноярского отделения Российского физиологического общества им. И.П. Павлова при РАН, Красноярск, 2003, 2004 гг.; на семинарах Международного научного центра исследований экстремальных состояний организма ФИЦ КНЦ СО РАН, Красноярск; на XX Съезде физиологического общества им. И.П.Павлова при РАН, Москва, 2007г.; на XIV Всероссийском симпозиуме с международным участием «Сложные системы в экстремальных условиях», природный парк «Ергаки», Красноярский край, 2008 г.; на Международной конференции «Идентификация систем и задачи управления» SICPRO`08, Москва, 2008 г., на XV Всероссийском симпозиуме с международным участием «Сложные системы в экстремальных условиях», Красноярск, 2010 г., на XVI Всероссийском симпозиуме с международным участием «Сложные системы в экстремальных условиях», Красноярск, 2012 г. и на XVII Всероссийском симпозиуме с международным участием «Сложные системы в экстремальных условиях», Шира, Хакасия, 2014 г.

### **Публикации**

По материалам диссертации опубликовано 44 работы, из них 16 статей в журналах, рекомендованных ВАК РФ для опубликования основных результатов диссертаций.

### **Личный вклад автора**

Автором лично проведен литературный поиск, самостоятельно сформулированы научные гипотезы, цель и задачи работы, спланированы эксперименты. Непосредственно автором, в том числе совместно с коллегами, проведены экспериментальные исследования и проанализированы полученные результаты. Публикации по результатам исследований были написаны совместно с коллегами, участвовавшими в проведении исследований. Все главы диссертации, включая выводы, были написаны автором самостоятельно.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена на 227 страницах, иллюстрирована 74 рисунками, 9 таблицами, и состоит из введения, обзора литературы, глав результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Список цитированной литературы включает 329 наименований, из них 51 – на русском и 278 на иностранном языках.

### **Благодарности**

Автор выражает искреннюю и глубокую признательность д.м.н., профессору А.А. Савченко, д.м.н. О.В. Смирновой, д.б.н., профессору Н.А.Сеткову, оказавшим незаменимую консультативную, методическую и организационную помощь при выполнении данной работы.

Часть исследований выполнена при поддержке Красноярского краевого фонда науки (гранты 12F986C, 13G068, 14G088, 16G124).

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Особенности обменных процессов в опухолевой ткани как фактор патогенеза онкологических заболеваний

Известно, что между опухолевой и нормальной тканями существуют значительные различия, которые проявляются на гистологическом и клеточно-молекулярном уровнях. Так, еще в двадцатых годах прошлого века Отто Варбургом была открыт феномен, названный затем его именем, суть которого заключается в поддержании опухолевыми клетками высокой интенсивности гликолиза в аэробных условиях, что отражается в повышенном уровне потребления глюкозы и продукции лактата (Warburg O. et al., 1924; Pedersen P.L., 2007; Sotgia F. et al., 2012; Burns J.S., Manda G., 2017). К настоящему времени установлено, что этот феномен характерен для большинства первичных опухолей и метастазов (Plathow C., Weber W.A., 2008; Martinez-Outschoorn U.E. et al., 2011; Busk M. et al., 2008).

По мнению самого Отто Варбурга, усиление гликолиза, наблюдаемое в опухолевой ткани, является способом компенсировать нехватку АТФ, возникающую вследствие нарушений процессов окислительного фосфорилирования в митохондриях. Таким образом, первичным процессом малигнизации, по Варбургу, является нарушение функции митохондрий, что приводит к усилению гликолиза и образованию опухоли (Warburg O., 1956). Это утверждение, однако, было опровергнуто фактами, свидетельствующими о возможности нормального функционирования митохондрий в клетках опухолей (Weinhouse S., 1956).

В настоящее время феномен Варбурга связывают с возникновением дефектов в системе окислительного фосфорилирования, что подтверждается данными о морфологии митохондрий опухолевых клеток. В частности, они часто имеют относительно малые размеры, небольшое количество крист и

уменьшенное количество b-F1 субъединиц АТФ-синтазы (Lopez-Rios F. et al., 2007; Toschi A. et al., 2010).

Также было показано, что усиление потребления глюкозы клетками опухоли и гипоксия не всегда коррелируют друг с другом *in vivo* (Gallagher et al., 2008). Несмотря на то, что глюкоза обычно является наиболее важным энергетическим субстратом для опухолевых клеток, повышение ее потребления опухолью не всегда бывает связывано с ролью этого вещества в энергетическом обмене, поскольку значительная часть потребляемой глюкозы используется опухолевыми клетками в качестве источника углерода для анаболических процессов (Kroemer G., Pouyssegur J., 2008).

Известно, что в ДНК митохондрий (мтДНК) многих опухолей встречаются мутации, результатом которых является нарушение, вплоть до полной потери функциональности, системы окислительного фосфорилирования, что в свою очередь, будет способствовать усилению гликолиза (Chatterjee A. et al., 2006; Gasparre G. et al., 2008). Однако эти мутации могут быть как следствием опухолевой прогрессии, так и напротив, фактором, способствующим опухолевой прогрессии (Brandon M. et al., 2006).

В частности, обнаружено, что экспрессия мутантной мтДНК, кодирующей субъединицу 2 НАДН-дегидрогеназы, ассоциирована с плоскоклеточной карциномой шей и головы. Наличие этой мутации стимулирует аэробный гликолиз, продукцию АФК и опухолевый рост (Zhou S. et al., 2007). Клетки, несущие мутацию генов мтДНК, кодирующих субъединицу 6 НАДН-дегидрогеназы, имеют дефектный дыхательный комплекс I и вследствие этого продуцируют АФК в повышенных количествах, что усиливает способность опухоли к инвазии и метастазированию (Ishikawa K. et al., 2008). В ряде опухолей были обнаружены и другие мутации мтДНК, связанные со снижением активности дыхательных комплексов I и III, снижением содержания АТФ и высоким уровнем продукции АФК (Gasparre G. et al., 2008).



МтДНК это кольцевая молекула, кодирующая все митохондриальные рРНК и тРНК, и некоторое количество белков электрон-транспортной цепи, которые входят в состав комплексов I, III и IV, а также АТФ-синтазу. В отличие от ядерной ДНК, мтДНК не содержит гистонов, что делает ее менее защищенной от воздействия свободных радикалов. Возможно, что повышенный уровень АФК в опухолевом узле может приводить к высокому уровню мутаций в мтДНК и уменьшать экспрессию полипептидов, кодируемых мтДНК (Ishikawa K. et al., 2008).

Таким образом, митохондрии представляют собой важную мишень для действия клеточных патогенных факторов в ходе опухолевого процесса. Вместе с тем, по-видимому, нет оснований для отведения митохондриям первичной роли в канцерогнезе, и в целом можно говорить о том, что увеличение интенсивности гликолиза в опухолевых клетках не является всегда прямым следствием уменьшением интенсивности окислительного фосфорилирования (Frezza C., Gottlieb E., 2009).

В то же время, активное течение гликолиза позволяет опухолевым клеткам обеспечивать себя энергией и выживать в состоянии флуктуирующего напряжения кислорода, которое возникает внутри опухоли и может быть губительным для клеток, у которых главным процессом генерации АТФ является окислительное фосфорилирование (Pouyssegur J. et al., 2006; Eyassu F., Angione C., 2017).

В результате высокой интенсивности гликолиза, клетки опухоли в значительных количествах продуцируют бикарбоновые кислоты и лактат. Эти кислоты, наряду с другими продуцируемыми опухолью интермедиатами, играют очень важную роль в формировании условий опухолевого микроокружения (Koukourakis M.I. et al., 2006; Martinez-Outschoorn U.E. et al., 2011), что облегчает опухолевую инвазию (Swietach P. et al., 2007), миграцию опухолевых клеток и метастазирование (Payen V.L. et al., 2017) и оказывает супрессирующее действие на клетки иммунной системы (Fischer K. et al., 2007).

При этом лактат, производимый опухолевыми клетками, может через монокарбоксилатные транспортеры МСТ 1 и МСТ 2 поглощаться нетрансформированными стромальными клетками и превращаться в пируват, который затем может выходить из них и возвращаться в клетки опухоли, направляясь далее в реакцию окислительного декарбоксилирования с дальнейшим участием в реакциях ЦТК и окислительного фосфорилирования, если у опухолевых клеток в тот момент будет возможность для его аэробной утилизации (Koukourakis M.I. et al., 2006). С высокой активностью МСТ 1 связывают повышенную инвазивность опухолей (Johnson J.M. et al., 2017).

Опухолевые клетки также могут метаболизировать глюкозу через пентозофосфатный путь, образуя НАДФН, который обеспечивает антиоксидантную защиту в условиях неблагоприятного микроокружения, и защиту от действия химиотерапевтических препаратов. Кроме того, НАДФН может использоваться для синтеза жирных кислот клетками опухоли, что является для них очень актуальным, если учесть высокий уровень пролиферации и необходимость обеспечения этого уровня пластическими ресурсами. Судьба рибозо-5-фосфата, оказывающегося на границе окислительного и неокислительного этапов ПФП, контролируется транскетолазной реакцией. Повышенная экспрессия изоформы 1 транскетолазы была обнаружена во многих опухолях (Földi M., et al., 2007; Fan T. et al., 2017).

Кроме того, важно отметить, что опухолевые клетки используют интермедиаты гликолиза в качестве субстратов для анаболических процессов. К примеру, глюкозо-6-фосфат используется для синтеза гликогена и, как только что упоминалось, рибозо-5-фосфата, диоксиацетонфосфат для синтеза триацилглицеридов и фосфолипидов, пируват для синтеза аланина и малата. При этом, образуемый в митохондриях Ацетил-КоА, через малонил-КоА, используется для синтеза жирных кислот (Fritz V., Fajas L., 2010) а также мевалоновой кислоты, играющей важную роль во взаимодействии

опухолевой ткани и клеток иммунной системы (Gruenbacher G, Thurnher M., 2017).

Эмбриональная изоформа пируваткиназы, пируваткиназа-M2, которая дефосфорилирует фосфоенолпируват до пирувата, активно экспрессируется в опухолях, хотя в норме отсутствует во взрослых тканях, за исключением адипоцитов (Shiroki T. et al., 2017; Zhu H. et al., 2017). Известно, что ее активность возрастает при существовании в тетрамерной форме и понижается при переходе в димерную форму (Christofk H.R. et al., 2008), а также ингибируется под действием АФК (Anastasiou D. et al., 2011). Это обеспечивает возможность для регулирования потока пирувата и использования его в качестве прекурсора для синтеза аминокислот, нуклеиновых кислот и липидов, в то время как продукция лактата приостанавливается (Kroemer G., Pouyssegur J., 2008). Т.е. частичное ингибирование пируваткиназы-M2 позволяет интермедиатам гликолиза уходить в направлении анаболических реакций и одновременно препятствует чрезмерной продукции пирувата.

В митохондриях пролиферирующих опухолевых клеток распад пирувата может также ограничиваться лишь реакцией его окислительного декарбоксилирования, без дальнейшего направления ацетил-КоА в ЦТК, в результате чего, ацетил-КоА экспортируется из митохондриального матрикса в цитозоль, и становится доступным в качестве субстрата для синтеза жирных кислот, холестерина и изопреноидов.

При этом синтаза жирных кислот, которая в присутствии НАДФН синтезирует длинноцепочечные жирные кислоты из ацетил-КоА и малонил-КоА, имеет повышенную активность во многих опухолях (Wang H.Q. et al., 2005; Menendez J.A., Lupu R., 2007), также как и холинкиназа, с помощью которой происходит фосфорилирование холина, и тем самым обеспечивается его вовлечение в дальнейшие анаболические реакции липидного обмена (Glunde K., Bhujwalla Z.M., 2007).

Увеличенная продукция белков опухолевыми клетками требует синтеза *de novo* заменимых аминокислот. Предшественниками для них являются глюкоза и глутамин, которые потребляются опухолевыми клетками в значительных количествах. Кроме того, два гликолитических интермедиата, 3-фосфоглицерат и пируват, используются в биосинтезе серина и аланина, при этом серин в дальнейшем превращается в глицин или цистеин. Вдобавок интермедиаты ЦТК используются для синтеза аспартата, аспарагина, глутамата, глутамина, пролина и аргинина.

Следовательно, ЦТК в опухолевых клетках в большой степени функционирует как источник субстратов для биосинтеза аминокислот и жирных кислот. При этом усиление субстратного потока в ЦТК в клетках опухолей происходит благодаря конвертации пирувата в оксалоацетат пируваткарбоксилазой либо превращения глутамина в  $\alpha$ -кетоглутарат (DeBerardinis R.J. et al., 2007; DeBerardinis R.J. et al., 2008; Vatrinet R. et al., 2017).

В то же время, было показано, что ЦТК в опухолевых клетках отнюдь не утрачивает своей функции в аэробном энергетическом обмене. Так, недавно было обнаружено, что ограничение интенсивности гликолиза или увеличение уровня пирувата, доступного для митохондрий, могут способствовать заметному усилению дыхания опухолевых клеток. В частности, ингибирование ЛДГ или активация пируватдегидрогеназы, через ингибирование киназы пируватдегидрогеназы, подталкивает опухолевые клетки к окислению пирувата в ЦТК и стимулированию митохондриального дыхания (Bonnet S.A. et al., 2007).

Что касается проблемы доступности кислорода для опухолевых клеток, то известно, что концентрация кислорода в нормальных тканях, в ситуациях от физиологической гипоксии до нормоксии, колеблется между 6 и 30 мкМ соответственно (Brahimi-Horn M.C., Pouyssegur J., 2007). При этом, концентрация кислорода в разных участках солидной опухоли, на разных расстояниях от кровеносных сосудов, различается, а многие участки опухоли

находятся в состоянии глубокой гипоксии, когда парциальное давление кислорода составляет 0 мм ртутного столба (Braun R.D. et al., 2001).

Таким образом, можно утверждать, что в больших регионах солидных опухолей окислительное фосфорилирование лимитировано именно уровнем содержания кислорода, и гликолиз оказывается главным энергетическим путем клетки, в соответствии с эффектом Пастера. А поскольку для фосфофруктокиназы, ключевого регуляторного фермента гликолиза, АТФ является ингибирующим регулятором, снижение уровня АТФ в связи с исчезновением кислорода и остановкой окислительного фосфорилирования приводит к возрастанию интенсивности гликолиза (Frezza C., Gottlieb E., 2009).

В ответ на пролонгированную гипоксию, клетки опухоли осуществляют метаболическую адаптацию, которая опосредуется изменениями в экспрессии генов. Эти процессы в значительной степени инициируются гипоксия индуцибельным фактором (HIF) (Fukuda R. et al., 2007; Brahimi-Horn M.C. et al., 2007; Brahimi-Horn M.C. et al., 2011; Semenza G.L., 2012), который представляет собой транскрипционный фактор, активируемый гипоксией, а также, активирующийся в условиях воспаления и окислительного стресса (Harris A.L., 2002; Taylor C.T., Pouyssegur J., 2007; Singh D. et al., 2017).

Стоит отметить, что одним из последствий активации HIF является увеличение уровня потребления клетками глюкозы и ее фосфорилирования. В частности, HIF-1 стимулирует конверсию глюкозы в пируват и лактат, увеличивая активность глюкозного транспортера GLUT 1, гексокиназы 1 и 2, лактатдегидрогеназы А, и монокарбоксилаттранспортера 4 (MCT 4), обеспечивающего экструдирование лактата из опухолевой клетки (Pouyssegur J. et al., 2006; Wu X.H. et al., 2013). При этом GLUT 1 может играть выжнюю роль в прогрессии опухоли, усиливая интенсивность гликолиза и клеточную пролиферацию ее клеток (Xiao H. et al., 2018).

Кроме того, HIF-1 способствует снижению интенсивности окислительного декарбоксилирования пирувата, ингибируя пируватдегидрогеназу. Для этого HIF-1 активирует ген, кодирующий киназу пируватдегидрогеназы, которая в свою очередь ингибирует пируватдегидрогеназу (Kim J.W. et al., 2006; Papandreou I. et al., 2006). Образующийся в результате окислительного декарбоксилирования пирувата Ацетил-СоА в норме направляется в ЦТК, обеспечивая воспроизводство НАДН и ФАДН<sub>2</sub>, которые передают свои электроны в дыхательную цепь через комплексы I и II соответственно.

Таким образом, путем ингибирования пируватдегидрогеназы, HIF-1 влияет на интенсивность окислительного фосфорилирования. HIF-1 также противодействует стимулирующему влиянию Мук на митохондриальный биогенез, тем самым уменьшая митохондриальную массу (Zhang H. et al., 2007).

Кроме снижения напряжения O<sub>2</sub>, HIF-1 может быть индуцирован в результате опухолегенной мутации двух ферментов ЦТК: фермента митохондриального матрикса фумаратгидратазы и белка внутренней мембраны митохондрий сукцинатдегидрогеназы. Здесь надо отметить, что сукцинатдегидрогеназа также является функциональный членом комплекса II дыхательной цепи. Потеря, в результате мутации, функций фумаратгидратазы или субъединиц сукцинатдегидрогеназы, индуцирует накопление интермедиатов ЦТК, таких как фумарат или сукцинат, которые конкурентно ингибируют  $\alpha$ -кетоглутарат-зависимую HIF-1 $\alpha$  пролилгидроксилазу, фермент, который обычно воздействует на HIF-1 $\alpha$ , приводя к его деструкции при наличии кислорода (Gottlieb E., Tomlinson I.P., 2005). Таким образом, через HIF-1, первичные нарушения обменных процессов в митохондриях могут приводить к онкогенным изменениям на уровне клетки (Keith B. et al., 2012).

Также было обнаружено, что кодируемые в клеточном ядре ферменты ЦТК - сукцинатдегидрогеназы и фумаратгидратазы, выполняют функции

опухолевых супрессоров. Мутации в генах, кодирующих В, С и D субъединицы сукцинатдегидрогеназы, приводят к возникновению предрасположенности у носителей данных мутаций к наследственной параганглиоме с феохромоцитомой, тогда как мутации ФГ вызывают наследственные лейомиоматозы и почечно-клеточный рак (King A. et al., 2006; Gottlieb E., Tomlinson I.P., et al., 2005).

Для объяснения аномальной стабильности HIF $\alpha$  при нормоксии были предложены две модели, связаны с мутациями сукцинатдегидрогеназы. Первая предполагает, что АФК, генерируемые поврежденным комплексом II, ингибируют гидроксилирование HIF $\alpha$  с помощью пролилгидроксилаз (Guzy R.D. et al., 2008; Selak M.A. et al., 2006). В другой модели сукцинат, уровень которого возрастает в дефицитных по сукцинатдегидрогеназе митохондриях, может выступать в качестве митохондриально-цитозольного мессенджера, который ингибирует активность пролилгидроксилаз (Selak M.A. et al., 2005).

Повышенные уровни фумарата в дефицитных по фумаратгидратазе опухолях также ингибируют активность пролилгидроксилазы, что в последствие приводит к деградации HIF $\alpha$  (Pollard P.J. et al., 2005; Isaacs J.S. et al., 2005). Эти две модели не являются взаимоисключающими, и возможно, что *in vivo*, и АФК и сукцинат совместно ингибируют активность пролилгидроксилазы в дефицитных по сукцинатдегидрогеназе опухолях (Guzy R.D. et al., 2008).

В настоящее время нет данных, говорящих об увеличении уровня АФК в клетках, дефицитных по фумаратгидратазе. Это согласуется с тем обстоятельством, что, в отличие от сукцинатдегидрогеназы, фумаратгидратаза не является частью электрон-транспортной цепи, и таким образом, мало связана с генерацией АФК. Однако накопление фумарата, связанное с мутациями фумаратгидратазы, способно также приводить к ингибированию активности сукцинатдегидрогеназы, приводя к увеличению уровней сукцината в дефицитных по фумаратгидратазе опухолях (Pollard P.J. et al., 2005).

Связь между сукцинатом и пролилгидроксилазой, по-видимому, не ограничивается регуляцией HIF $\alpha$  и может иметь значение также для апоптоза. Так, было показано, что ингибирование сукцинатом пролилгидроксилазы-3 блокирует апоптоз нейрональных клеток в ходе развития (Lee S. et al., 2005). На основании этого предполагается, что потеря способности к апоптозу, вызванная избытком сукцината, связанным с мутациями сукцинатдегидрогеназы, играет роль в патогенезе параганглиомы и феохромоцитомы. Эта модель подтверждается исследованиями на мышцах с отсутствием пролилгидроксилазы-3, у которых обнаруживались дефекты апоптоза симпатических нейронов (Bishop T. et al., 2008).

Стабилизация HIF $\alpha$  и нарушение способности к апоптозу предрасполагают клетки к злокачественной трансформации. Преодоление сукцинат и фумарат-связанного ингибирования пролилгидроксилазы может иметь значение для терапии опухолей с дефицитом сукцинатдегидрогеназы и фумаратгидратазы. Так, было показано, что сукцинат и фумарат ингибируют пролилгидроксилазу, влияя на связывание  $\alpha$ -кетоглутарата с ферментом (MacKenzie E.D. et al., 2007). Увеличение внутриклеточных уровней  $\alpha$ -кетоглутарата преодолевает ингибирующий эффект сукцината и фумарата (MacKenzie E.D. et al., 2007), что может иметь значение для терапии этих заболеваний.

Замечено однако, что стабилизация HIF может только частично ингибировать окислительное фосфорилирование, так как увеличение глутаминолиза, наблюдаемое в опухолях, способствует повышению концентрации  $\alpha$ -кетоглутарата, который может направляться в ЦТК, обеспечивая тем самым его функционирование и продукцию восстановительных эквивалентов НАДН и ФАДН<sub>2</sub> для электрон транспортной цепи (DeBerardinis R.J. et al., 2007; DeBerardinis R.J. et al., 2008).

При этом у ряда опухолей наблюдается высокая активность HIF даже в присутствии кислорода. Такое состояние, известное как псевдогипоксия, по



большой части доказано в опухолях с потерей одного из опухолевых супрессоров pVHL, сукцинатдегидрогеназы или фумаратгидратазы (King A. et al., 2006).

Следствием перестройки обмена веществ в опухолевых клетках являются такие свойства опухолей, как уклонение от апоптоза, потеря лимита репликации, опухолевый ангиогенез, тканевая инвазия и метастазирование, уход от иммунного надзора. Так, ингибирование дыхательной цепи может супрессировать активацию проапоптотических белков семейства Bcl-2 Bax и Bak (Tomiyama A. et al., 2006; Montero J., Letal A., 2018).

Дефекты окислительного фосфорилирования также уменьшают потенциал определенных ксенобиотиков вызывать генерацию АФК в митохондриях, тем самым отменяя их апоптотическую активность (Kroemer G. et al., 2007). Существует также корреляция между гиперполяризацией внутренней митохондриальной мембраны, которая часто наблюдается в раковых клетках (возможно вторично от дефекта  $F_1F_0$  АТФазы) и повышением уровня цитозольного  $K^+$  до уровня, который оказывает ингибирующий эффект на каспазы и апоптоз-индуцирующий фактор АИФ (Bonnet S.A. et al., 2007).

Вследствие гипоксии у многих опухолей повышается уровень экспрессии васкулярного эндотелиального фактора роста VEGF совместно с усилением экспрессии HIF-1 и c-Myc (Kim J.W. et al., 2007; Dang C.V., 2010, 2012; Peterson C.W., Ayer D.E., 2012). При этом, Myc может выступать в роли регулятора биогенеза рибосом и биосинтеза белка (van Riggelen J. et al., 2010).

Кроме этого, опухолевые клетки экспрессируют  $F_1F_0$ -АТФазу - белковый комплекс, который в норме располагается на внутренней мембране митохондрий, на клеточную поверхность, где он может экстрадировать протоны из цитозоля во внеклеточную среду и тем самым обеспечивать чистый экспорт протонов, что поддерживает внутриклеточную рН на

адекватном уровне и одновременно способствует закислению внеклеточного пространства, затрудняя деятельность иммунных эффекторов и облегчая процессы опухолевой инвазии (Kroemer G., Pouyssegur J., 2008).

Опухолевые клетки часто экспрессируют редкую HIF-индуцибельную карбоангидразу изоформ 9 и 12. Это трансмембранные ферменты, которые гидратируют внеклеточный  $\text{CO}_2$ , тем самым генерируя  $\text{H}^+$  и  $\text{HCO}_3^-$  (Morgan P.E. et al., 2007). Возникающее из-за этого экстраклеточное закисление поддерживает инвазию и метастазирование, возможно, путем pH-зависимой активации катепсинов и металлопротеиназ, которые в свою очередь вызывают деградацию экстрацеллюлярного матрикса и базальных мембран (Swietach P. et al., 2007).

В то же время активация HIF-1 $\alpha$  приводит к потере E-кадгерина (Esteban M.A. et al., 2006; Pouyssegur J. et al., 2006), изоформы кадгерина, которая требуется для поддержания межклеточных контактов в эпителии. Активация HIF-1 $\alpha$  также приводит к экспрессии met протоонкогена и TWIST, (Pennacchietti S. et al., 2003; Yang M.H. et al., 2008; Raz D.J., 2017) что приводит к индукции двух белков, играющих кардинальную роль в метастазировании, это хемокиновый рецептор CXCR4 (Igney F.H., Krammer P.H., 2002) и лизилоксидаза (Erler J.T. et al., 2006).

Таким образом, в основе патогенеза злокачественных новообразований лежат изменения обмена веществ в опухолевых клетках. Эти изменения способствуют усиленному росту опухоли и повышенной способности ее клеток выживать в условиях гипоксии. Отбирая у организма энергетические и пластические ресурсы, выделяя в среду организма токсичные продукты своей жизнедеятельности, опухоль способна оказывать влияние на функциональное состояние клеток различных органов и систем. Среди наиболее значимых последствий такого влияния – нарушение обмена веществ и функций клеток иммунной системы.

## 1.2. Механизмы иммуносупрессивного действия опухоли

Известно, что угнетение функций клеток иммунной системы в ходе онкологического заболевания происходит уже на раннем этапе развития раковой опухоли. И хотя выраженность системной иммуносупрессии различна при разных видах опухолей, можно с определенностью утверждать, что она характерна для всех онкозаболеваний. Различия связаны, в основном, со сроками снижения иммунитета.

Так, при исследовании функциональной активности периферических нейтрофилов у мышей с карциномой Льюиса было обнаружено, что на ранних этапах роста опухоли, а именно в течение 1-х – 7-х сут после инокуляции клеток опухоли в лапу мыши, нейтрофилы находились в состоянии гиперактивности и использовали свой цитотоксический потенциал для борьбы с опухолью. В более поздний период (8 – 15 сут) наряду с усилением адгезивных свойств клеток и продукции АФК наблюдалось изменение морфологии, функциональной активности клеток и ее регуляции, с модификацией регуляторной роли внутриклеточных протеинкиназ, исходя из чего авторами исследования делается вывод о необратимом воздействии в это время на нейтрофилы агентов, продуцируемых опухолевыми клетками. В дальнейшем (16 – 30 сут) на фоне резкого увеличения массы легких и гистологического выявления метастазов происходит снижение функциональной активности периферических нейтрофилов (Мальцева В.Н. и др. 2006; Мальцева В.Н., Сафронова В.Г., 2009).

Опухолевые клетки экспрессируют Fas лиганд, и благодаря этому могут уничтожать инфильтрующие опухоль лимфоидные клетки по механизму Fas-опосредуемого апоптоза как *in vitro*, так и *in vivo* (Crokerb V.A. et al., 2011; Kaufmann T. et al., 2012). Простагландины и лейкотриены могут модулировать пролиферацию опухолевых клеток, а также дифференцировку и апоптоз посредством различных аутокринных и паракринных регуляторных путей.

Так, было обнаружено, что при раке кишечника и раке легких простагландин E2 индуцирует пролиферацию малигнизированных клеток путем активации по меньшей мере двух сигнальных путей: Ras–Erk и киназы гликоген синтазы (GSK3 $\beta$ ). При раке груди, простагландин E2 может повышать уровень продукции ароматазы в стромальных жировых клетках и таким образом способствовать увеличению продукции эстрогена и стимулировать пролиферацию опухолевых клеток. Кроме того, простагландин E2 обеспечивает выживание клеток опухоли путем активации каскада PI3K–Akt–PPAR $\delta$ .

Простагландин E2 также повышает уровень BCL-2, выполняющего анти-апоптотическую роль, тем самым ингибируя апоптоз и усиливая рост опухоли. Также обнаружено, что в опухолевых клетках эндометрия простагландин F2 $\alpha$  индуцирует клеточную пролиферацию, усиливая действие фактора роста фибробластов 2 (FGF2) с рецептором FGFR1 (Wang D., DuBois R.N., 2010; Bhatt A.P. et al., 2012; Liu P. et al., 2011).

В литературе приводится большое количество доказательств местного и системного угнетения функций клеток иммунной системы при развитии онкозаболеваний (Serafini P. et al., 2006; Rabinovich G.A. et al., 2007; Shiao S.L. et al., 2011). Вследствие этого даже противоопухолевая вакцинация, приводящая к увеличению количества циркулирующих в крови опухоле-распознающих лимфоцитов, имеет ограниченное клиническое значение.

Несмотря на то, что Т-лимфоциты, активированные противоопухолевой вакцинацией, приобретают противоопухолевый антиген-специфический фенотип, их реальная способность атаковать и разрушать опухолевые клетки остается не высокой. Предполагают, что это связано либо с неспособностью значительного количества таких лимфоцитов войти в опухоль и достигать соответствующие опухолевые клетки, либо с иммуносупрессивным действием опухоли (Rabinovich G.A. et al., 2007; Serafini P. et al., 2006; Cremer I. et al., 2012).

В то же время на сегодняшний день не остается никаких сомнений, что в основе механизмов нормального функционирования клеток иммунной системы лежит адекватное протекание внутриклеточных обменных процессов (Козлов В.А. и др., 2009).

Так, в лимфоцитах, попавших под влияние опухолевого микроокружения, наблюдаются нарушения обмена арахидоновой кислоты, которая является прекурсором большого количества иммуноактивных липидов (Viola A., Bronte V., 2007). Посредством реакций, осуществляемых с участием ферментов 15-липоксигеназы, 5-липоксигеназы и циклооксигеназы (ЦОГ) на основе арахидоновой кислоты образуются соответственно липоксины, лейкотриены и простагландины.

ЦОГ имеет три изоформы, играющие различные роли в иммунитете. ЦОГ-1 экспрессируется в лимфоидных клетках в эмбриональном тимусе и стимулирует развитие Т-клеток. ЦОГ-3 обнаружена в макрофагах где, по-видимому, отвечает за продукцию основных противовоспалительных простаноидов, способных модулировать иммунную функцию (Kim J.W., 2012). Наиболее важной изоформой с точки зрения регуляции функций иммунной системы в организме с опухолью является ЦОГ-2.

Экспрессия ЦОГ-2 индуцируется факторами роста, цитокинами, опухолевыми промоторами. Рост экспрессии ЦОГ-2 обнаруживается при эпителиальной аденоме, при колоректальных опухолях человека и при многих опухолях кишечника у мышей, при нарушениях репликации в доброкачественных опухолях человека и при некоторых предраковых состояниях. Считается, что ЦОГ-2 усиливает ангиогенез, супрессирует апоптоз, способствует онкогенезу и, по-видимому, играет ключевую роль в супрессии противоопухолевого иммунитета (Holmes M.D. et al., 2011; Ji B. et al., 2012).

Так, в исследованиях на мышах показано, что ингибирование ЦОГ-2 ведет к заметной инфильтрации опухоли лимфоцитами и уменьшает опухолевый рост. При этом опухоли, в которых наблюдается повышенная

экспрессия ЦОГ-2, оказывают сильное влияние на дендритные клетки, заставляя их продуцировать ИЛ-10 и TGF- $\beta$ , ингибирующие функции Т-клеток. Простагландин E2, образующийся благодаря ЦОГ-2, может напрямую ингибировать функции лимфоцитов путем увеличения уровня цАМФ. Также было показано, что использование ингибиторов ЦОГ-2 способно отменять опухоль-индуцированную иммуносупрессию и индуцировать мобилизацию опухоль-инфильтрующих лимфоцитов *in vivo* (Baratelli F. et al., 2010; Mandapathil M., Whiteside T.L., 2011).

Липидные медиаторы могут осуществлять как аутокринную, так и паракринную регуляцию, и в зависимости от места действия и созревания клетки-мишени, один и тот же метаболит способен оказывать противоположные эффекты. К примеру, простагландин E2 может взаимодействовать с провоспалительными цитокинами, такими как TNF- $\alpha$ , ИЛ-1 и ИЛ-6, индуцируя созревание дендритных клеток через повышение экспрессии хемокинового рецептора CCR7, или напротив может ингибировать иммунную систему, заставляя дендритные клетки продуцировать ИЛ-10, ИЛ-12 и вызывая снижение экспрессии хемокинов CCL3 и CCL4 (Sivina M. et al., 2011; White K.L. et al., 2012).

Одним из веществ, чья роль в последнее время связывается с опухолевой супрессией иммунного ответа, является аминокислота триптофан. Триптофан метаболизируется двумя гемсодержащими ферментами, обеспечивающими окислительное расщепление 2,3 двойной связи в индольном кольце, это триптофан-2,3-диоксигеназа и индоламин-2,3-диоксигеназа (ИДО). Каждый из этих ферментов катализирует первую и лимитирующую реакцию в катаболизме триптофана по кинурениновому пути. Триптофан-2,3-диоксигеназа конститутивно экспрессируется в печени и не регулируется иммунными медиаторами, тогда как экспрессия ИДО индуцируется в антиген-представляющих клетках иммунной системы и подвержена сложной регуляции широким набором иммунологических сигналов (Sucher R. et al., 2010).

Клетки различных типов, включая моноцитарные макрофаги и дендритные клетки, фибробласты, эндотелиальные клетки и некоторые линии опухолевых клеток, экспрессируют ИДО после воздействия IFN- $\alpha$ , липополисахаридов и воспалительных цитокинов ИЛ-1 и ФНО. ИДО также отвечает за тяжесть течения некоторых экспериментальных аутоиммунных заболеваний. У мышей, плазмоцитоидные дендритные клетки которых продуцируют ИДО, наблюдается значительная супрессия Т-клеточного ответа *in vitro* и ослабление антиген-специфического Т-клеточного иммунитета *in vivo*. Тем не менее, у ИДО-/- мышей не происходит развитие спонтанных аутоиммунных или лимфопролиферативных заболеваний, что свидетельствует о том, что этот фермент не является критическим для сохранения системной толерантности к собственным антигенам.

При этом представляется, что повышение экспрессии ИДО может быть одним из главных иммуносупрессирующих механизмов, индуцируемых воспалением. Так, в условиях противоопухолевой терапии, регрессия опухолей была получена комбинацией цитотоксической терапии с ингибитором ИДО (Sorensen R.V. et al., 2011; Andersen M.H., 2012; Ferdinande I. et al., 2012).

Клетки, экспрессирующие ИДО, способны приводить к истощению экстрацеллюлярного уровня триптофана, тогда как избыток триптофана отменяет вызванное ИДО ингибирование Т-клеток. Так, в активированных *in vitro* человеческих и мышинных Т-клетках происходит арест клеточного цикла, если в культуральной среде отсутствует триптофан. Такие клетки также могут быть более чувствительными к апоптозу. При этом концентрация триптофана, необходимая для ингибирования Т-клеточной пролиферации ниже, чем нормальная концентрация триптофана в плазме (Sucher R. et al., 2010).

ИДО опосредует свою иммуносупрессивную активность также локальным накоплением токсических катаболитов (кинуренинов) которые приводят к аресту клеточного цикла Т-клеток в стадии G1, дефициту энергии

и клеточной гибели путем апоптоза (Puccetti P., Grohmann U., 2007; Mezrich J.D. et al., 2010).

Механизмы, с помощью которых эти метаболиты индуцируют апоптоз, в настоящее время неизвестны. Кроме того, повышенная экспрессия ИДО опухолевыми клетками причастна к ассоциированной с онкологическими заболеваниями анорексии и кахексии (Munn D.H., Mellor A.L., 2007).

Триптофан это не единственная аминокислота, обмен которой связывают с иммуносупрессирующим действием опухоли. Данные многочисленных публикаций говорят также о роли активации ферментов обмена аргинина в ходе роста и развития опухоли.

Важность аргинина в иммунном ответе была доказана ассоциацией между нарушением функций Т-клеток и снижением в сыворотке уровня аргинина, обнаруженного у пациентов и лабораторных животных после трансплантации или травмы печени. В частности было показано, что при низком уровне аргинина происходит блокирование пролиферации Т-клеток и снижение продукции цитокинов Т-клетками, а также нарушение функций дендритных клеток, причем функции Т-клеток восстанавливались при энтеральном или парентеральном введении аргинина (Norian L.A. et al., 2009).

Уровень аргинина *in vivo* восполняется эндогенным синтезом *de novo* из цитруллина, реакциями катаболизма белков и поступлением с пищей. Метаболизируется аргинин преимущественно ферментом аргиназой, что обеспечивает в дальнейшем образование мочевины и орнитина, а также синтазой оксида азота, которая превращает аргинин в оксид азота NO и цитруллин. В организме млекопитающих идентифицированы две различных изоформы аргиназы, аргиназа-1 и аргиназа-2. Несмотря на большое сходство последовательности и сходную ферментативную активность, они имеют различное распределение среди тканей. Оба фермента гидролизуют аргинин в мочевины и орнитин. Последний становится главным субстратом для продукции полиаминов путресцина, спермидина и спермина, которые



требуются для осуществления клеточного цикла. Аргиназа-1 конститутивно присутствует в печени как компонент цикла мочевины и индуцируется в различных мышечных миелоидных клетках под воздействием цитокинов ИЛ-4/ИЛ-13, TGF $\beta$ , ИЛ-10, гипоксии, простагландина E2 и cAMP. Аргиназа-2 экспрессируется клетками различных типов, включая клетки почек и энтероциты (Yan S. et al., 2011; Bronte V., Zanovello P., 2005).

Увеличение активности аргиназы детектируется у пациентов с раком кишечника, груди, легкого и простаты. Повышенная активность аргиназы в сыворотке крови рассматривается как маркер прогрессии заболевания при колоректальном раке и раке груди и даже предлагается в качестве средства мониторинга хода болезни (Mielczarek M. et al., 2006). Предполагается, что аргиназа способствует обеспечению опухоли полиаминами, которые необходимы ей в больших количествах для поддержания роста (Chang J.C. et al., 2001), и приводит к супрессии противоопухолевого иммунного ответа посредством негативного влияния на инфильтрующие опухоль лимфоциты (Bronte V. et al., 2005).

Важным ферментом в реакциях обмена азотсодержащих веществ является синтаза оксида азота (NOS). Известны три ее изоформы (Mocellin S. et al., 2007), однако с точки зрения канцерогенеза наиболее интересна индуцибельная изоформа (NOS2), которая экспрессируется различными клетками иммунной системы и транскрипция которой усиливается под действием провоспалительных цитокинов, например ИЛ-1, ИЛ-2 и ФНО- $\alpha$ , бактериальных липополисахаридов и гипоксии, тогда как ингибируется стероидами, противовоспалительными цитокинами (например TGF- $\beta$ , ИЛ-10) и оксидом азота (Bogdan C., 2001).

Повышенная экспрессия NOS2 в опухолевых клетках или в инфильтрующих опухоль лимфоцитах описана для рака молочной железы, кишечника, яичников, меланомы, пищевода, легких, простаты, мочевого пузыря и поджелудочной железы, опухолей мозга, саркомы Капоши,

мезотелиомы и при онкогематологических заболеваниях (Bronte V. et al., 2005; Mocellin S. et al., 2007).

При этом было обнаружено, что в случае культивирования небольших образцов опухоли простаты в среде, содержащей комбинацию специфических ингибиторов для аргиназы и NOS, лимфоциты восстанавливали свои функции с полной отменой иммуносупрессивного механизма, основанного на нарушении обмена аргинина при раке (Bronte V. et al., 2005).

Экспрессия аргиназы-1 и NOS2 в макрофагах мышей дифференциально регулируется цитокинами Th1 и Th2. Стимуляция мышинных макрофагов с помощью ИФ- $\gamma$  или ФНО- $\alpha$  повышает активность только iNOS, тогда как ИЛ-4, ИЛ-10, TGF- $\beta$  и ИЛ-13 индуцируют повышение активности аргиназы-1, при этом митохондриальная изоформа аргиназы-2 не подвержена выраженной модуляции цитокинами Th1 и Th2 (Godin-Ethier J. et al., 2009).

Возникает вопрос, насколько низким должен быть уровень аргинина, чтобы вызвать нарушение функции Т-клеток, и могут ли быть достигнуты эти уровни *in vivo*? Данные исследований *in vitro* показывают, что концентрации аргинина ниже 40 мкМ вызывают быстрое нарушение функций стимулированных Т-клеток. Этому соответствуют данные клинических наблюдений. Так, если нормальная концентрация аргинина в плазме находится в диапазоне от 50 до 150 мкМ, то у пациентов с почечно-клеточной карциномой, у которых наблюдается высокий уровень аргиназы-1, концентрация аргинина в плазме часто оказывается ниже 40 мкМ (Rodriguez P.C., Ochoa A.C., 2006).

При низкой концентрации аргинина редуктазный домен NOS2 генерирует супероксидный ион  $O_2^-$ . В результате взаимодействия супероксид-иона и оксида азота образуются пероксинитриты  $ONOO_2$ , которые нитрируют остатки тирозина в молекулах белков. Пероксинитриты могут индуцировать апоптоз Т-лимфоцитов, ингибируя фосфорилирование белков или нитрируя компоненты митохондриальных транзитных пор, что

приводит к высвобождению факторов, ведущих к смерти клетки, таких как цитохром С (Sivitz W.I., Yorek M.A., 2010, Peixoto P.M. et al., 2012).

Нехватка аминокислот, вызванная описанными процессами, приводит к накоплению свободных, деацилированных молекул тРНК, которые взаимодействуют с GCN2 киназой (Hao S. et al., 2005). Конформационные взаимодействия, вызванные таким связыванием, приводят к активации киназы и фосфорилированию сериновых остатков в эукариотическом факторе инициации eIF2 $\alpha$ , что ведет к прекращению синтеза белка (Kimball S.R. et al., 2005). Итогом этих событий является снижение уровня потребления аминокислот, следствием чего в свою очередь может являться временное ограничение жизненных функций клеток.

Понижение pH в опухолевом узле вследствие избыточной продукции опухолевыми клетками лактата и пирувата также оказывает ингибирующий эффект на функциональную активность клеток иммунной системы, как это было показано, в частности, на примере НК-клеток. При этом у пациентов с крупными опухолями повышается уровень лактата в сыворотке крови, что также может иметь системное иммуносупрессивное значение, поскольку лактат супрессирует пролиферацию, продукцию цитокинов и цитотоксическую активность Т-лимфоцитов. Предполагается, что внеклеточный лактат блокирует возможности Т-лимфоцитов выбрасывать свой внутриклеточный лактат с помощью монокарбоксилаттранспортера MCT1, в результате чего концентрация лактата в лимфоцитах повышается до уровней, несовместимых с нормальным функционированием этих клеток (Fischer K. et al., 2007; Cremer I. et al., 2012).

Одним из последствий патогенных воздействий на клетки является индукция активных форм кислорода (АФК), к которым относятся супероксидный анион-радикал ( $O_2^-$ ), гидроксильный радикал ( $HO\cdot$ ) и пероксид водорода ( $H_2O_2$ ) (Ognjanović B.I. et al., 2012; Zhao Y. et al., 2009; Kilburn L. et al., 2010; Carr W.J. et al., 2011; Sugadev R. et al., 2011).

Показано, что значительное, вплоть до десятикратного, повышение уровня АФК в клетке, может происходить при самых разных воздействиях, включая воздействия повышенной температуры (Banerjee Mustafi S. et al., 2009), ионизирующего и ультрафиолетового излучения (Cooper K.L. et al., 2009), различных ксенобиотиков (Kim J.H. et al., 2010; Chen L. et al., 2011), фактора некроза опухоли ФНО- $\alpha$  (Mariappan N. et al., 2009), при малигнизации (Afanas'ev I., 2011), гипогликемии и различных нарушениях внутриклеточного обмена веществ (Chang J.C. et al., 2010) и др. Совокупность происходящих в клетке процессов, связанных с появлением и действием АФК, в современных публикациях принято обозначать термином “окислительный стресс” (Frederiks W.M. et al., 2010; Patel V.P., Chu C.T., 2011; Cortes D.F. et al., 2011).

Развитие окислительного стресса, чаще всего, начинается с образования супероксидных радикалов, источниками которых в клетке являются митохондриальные цепи переноса электронов, а также некоторые флавиносодержащие оксидоредуктазы, локализованные в цитозоле, такие как ксантинооксидаза, альдегидоксидаза, дегидрооротатдегидрогеназа и др. В цитозоле  $O_2^-$  радикалы могут образовываться также в процессах автоокисления некоторых белков и низкомолекулярных метаболитов, таких как катехоламины, гидрохиноны и др. (Dröse S., Brandt U., 2012; Vamecq J. et al., 2012; Aggarwal N.T., Makielski J.C., 2013).

Кроме собственного цитопатогенного значения, образование  $O_2^-$  способствует появлению в клетке других, не менее опасных АФК и развитию цепной реакции их взаимопревращений. Так дисмутация двух молекул супероксидного радикала приводит к образованию перекиси водорода, взаимодействие которого с  $O_2^-$  приводит к появлению гидропероксидных радикалов, способных, в частности, продолжать цепь свободнорадикального окисления липидов в составе фосфолипидных клеточных мембран (Birben E. et al., 2012). Эти процессы лежат в основе нарушений барьерной функции

мембран, что сопровождается нарушением распределения веществ внутри клетки и между клеткой и окружающей средой.

Одним из наиболее тяжелых и рано наступающих последствий нарушения целостности границ клеточных компартментов и плазматической мембраны является увеличение внутриклеточной концентрации ионов кальция, вследствие их выхода из внутриклеточных депо, с одной стороны, и вследствие их проникновения в клетку из внеклеточной среды, с другой. Как известно,  $\text{Ca}^{2+}$  является одним из важнейших регуляторов клеточных функций. Его роль определяется способностью связываться с аллостерическими центрами многих ферментов и осуществлять, таким образом, изменение их активности. В результате тотального увеличения концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в гиалоплазме происходит патологическое изменение активности целого комплекса ферментных систем, в частности,  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемых эндонуклеаз, протеаз, фосфолипаз и фосфатаз, изменение активности систем трансмембранного, в том числе ионного, транспорта, активация ряда транскрипционных факторов (Zhou L. et al., 2011; Liao B. et al., 2011; Gusarova G.A. et al., 2011).

Также одним из наиболее ранних проявлений повреждения клеток является нарушение энергообразовательной функции митохондрий. Это нарушение также может быть связано с повреждением митохондриальных мембран вследствие активации процессов перекисного окисления входящих в их состав липидных молекул. Возникающее, вследствие этого, нарушение барьерной функции, в частности, внутренней мембраны митохондрий, приводит к разобщению процессов окислительного фосфорилирования и снижению эффективности ресинтеза АТФ. Кроме того, АФК оказывают и непосредственное воздействие на ферменты дыхательной цепи (Vamescq J. et al., 2012; Aggarwal N.T., Makielski J.C., 2013).

Морфологически повреждения митохондрий проявляются в виде их набухания, что является следствием проникновения в митохондриальный матрикс через частично поврежденную внутреннюю мембрану положительно

заряженных ионов, в частности, ионов  $K^+$ , после чего начинается проникновение в матрикс и анионов, в особенности, хлора и фосфата. Накопление в матриксе этих ионов индуцирует проникновение воды и набухание митохондрий. Такое набухание приводит к разрушению митохондрий, полному прекращению выполнения ими своих функций (Порядин Г.В., 2012; Новицкий В.В. и др., 2012).

Одно из наиболее грозных для клетки последствий развития окислительного стресса может быть связано с так называемыми митохондриальными транзитными порами. Эти поры располагаются на внутренней мембране митохондрий и в нормальном состоянии закрыты, однако под действием АФК, они способны открываться. Открытие митохондриальных транзитных пор приводит к полному прекращению ресинтеза АТФ митохондриями и неизбежной гибели клетки (Martin L.J. et al., 2009; Bernardi P., von Stockum S., 2012).

Еще одним из путей воздействия АФК на митохондрии, может быть повреждение ими митохондриальной ДНК, что в конечном итоге, способно приводить к нарушению функционирования электрон-транспортной цепи и снижению интенсивности ресинтеза АТФ (Fogg V.C. et al., 2011; Cosentino C. et al., 2011).

В свою очередь, снижение концентрации АТФ оказывает влияние на активность многих клеточных ферментов, в частности, протеинкиназ и фосфатаз, вызывает изменение конформации белковых молекул, для которых АТФ или АДФ являются аллостерическими регуляторами. С этим связано одно из наиболее тяжелых для клетки последствий действия экстремальных факторов, а именно, возникновение грубых нарушений в функциональной деятельности цитоскелета. Снижение концентрации АТФ вызывает деполимеризацию молекул актина, одного из основных компонентов цитоскелета. Это в свою очередь, приводит к фрагментации микрофиламентов и в последствии к дестабилизации плазматической мембраны и ее разрушению (Barry R., Gitai Z., 2011; Desouza M. et al., 2012).

Важным компонентом окислительного стресса является повреждение лизосом в результате перекисного окисления липидов их мембран. В результате, из поврежденных лизосом происходит выход гидролаз, которые интенсивно разрушают различные клеточные структуры (Almaguel F.G. et al., 2010; Lee J. et al., 2012).

Непосредственное воздействие активных форм кислорода на нуклеиновые кислоты индуцирует их окислительную модификацию, что в конечном итоге может приводить к возникновению мутаций (Caputo F. et al., 2012). Возможно также и непосредственное окисление молекул ферментов активными формами кислорода и их липидными производными, которое приводит к падению их активности (Vamecq J. et al., 2012; Sánchez-Valle V. et al., 2012; Aggarwal N.T., Makielski J.C., 2013).

В частности, в условиях воздействия индукторов окислительного стресса, обнаружено патологическое изменение активности глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (Schlisser A.E. et al., 2010), митохондриальной аспартатаминотрансферазы и  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназного комплекса (Zakharchenko M.V. et al., 2013), глутаматдегидрогеназы (Fitowska A. et al., 2012), лактатдегидрогеназы (Li W. et al., 2013), ключевых ферментов глиоксилатного цикла изоцитрат лиазы и малат синтазы, а также цитрат синтазы и малатдегидрогеназы (Popov, 1998), и глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы (Marczak A., Józwiak Z., 2009).

Снижение активности многих мембраносвязанных ферментов может происходить как вследствие полимеризации путем образования поперечных сшивок с участием  $\epsilon$ -аминогрупп лизина, N-концевых остатков аминокислот, а также сульфгидрильных групп, так и вследствие изменения вязкости липидной фракции мембраны, что влечет за собой различные негативные конформационные изменения ферментных молекул (Sánchez-Valle V. et al., 2012; Vamecq J. et al., 2012).

Важным последствием пребывания клетки в экстремальных условиях является также гиперпродукция оксида азота (NO). Активация синтазы

оксида азота происходит под воздействием ФНО- $\alpha$ , ФНО- $\gamma$  и ИЛ-1- $\beta$ , продукция которых резко увеличивается в клетке при попадании в экстремальные условия. NO способен блокировать энергетический обмен на уровне транспорта электронов. Кроме того, NO ингибирует  $\alpha$ -кетоглутарат дегидрогеназный комплекс в цикле Кребса путем нитрификации остатков тирозина всех субъединиц комплекса (Lima-Junior J.C. et al., 2012).

В результате, происходит не только снижение эффективности работы дыхательной цепи, но и нарушение работы ЦТК. Это, в свою очередь, индуцирует снижение в клетке концентрации НАДФН, что вызывает образование “порочного круга”, еще больше снижающего эффективность работы дыхательной цепи. Развитие такой ситуации в случае функциональной недостаточности противодействующих окислительным повреждениям защитных клеточных систем, может приводить к самым неблагоприятным для клетки последствиям, вплоть до ее гибели.

Среди важных последствий воздействия экстремальных факторов можно выделить и внутриклеточное увеличение соотношения НАД<sup>+</sup>/НАДН в условиях активации нежелательных окислительных повреждений, которое играет одну из ключевых ролей в регуляции обмена веществ (Hwang K. et al., 1999). Одновременно с этим, происходит снижение внутриклеточной концентрации восстановленного глутатиона, который является важным антиоксидантом и играет значительную роль в обеспечении выживаемости клетки, в том числе, и в экстремальных условиях (Ballatori N. et al., 2009; Marí M. et al., 2009). На примере гепатоцитов было показано, что снижение уровня восстановленного глутатиона в митохондриях при патогенном воздействии повышает чувствительности клеток к действию ФНО- $\alpha$ , поскольку последний индуцирует клеточное повреждение путем генерации окислительного стресса в митохондриях (Ryu K.Y. et al., 2012).

Таким образом, в процессе канцерогенеза в клетках организма может развиваться целый спектр повреждений различного характера. Эти повреждения могут затрагивать практически все жизненно важные



клеточные структуры, и приводить, в итоге, к нарушению функции и гибели клетки. Однако действие патогенных факторов далеко не всегда приводят к таким последствиям. Это объясняется наличием в клетках эффективных защитных систем.

### 1.3. Неспецифические механизмы адаптации организма и клетки

В тридцатых годах двадцатого века Ганс Селье после серии экспериментов на крысах пришел к выводу, что в ответ на различные по своей природе, но достаточно сильные раздражители, в организме подопытных животных происходят однотипные изменения, суть которых заключается в мобилизации организма, подготовке его к действию в необычных или экстремальных условиях. Селье назвал такие неспецифические реакции стрессом, а позже ввел понятие общего адаптационного синдрома (Selye H., 1950).

Представление о наличии в организме функциональных систем, осуществляющих неспецифическую реакцию адаптации, стало общепризнанным, и вошло во все учебники физиологии.

В конце 1960-х годов А.А. Ябровым было выдвинуто положение, в соответствии с которым «при определенных условиях в клетках возникает состояние, характеризующееся повышением неспецифической устойчивости к различным воздействиям». Для этого состояния был предложен термин «клеточный стресс». Развитие клеточного стресса связывалось с активацией биосинтетических процессов в клетках, и в частности, с усилением синтеза нуклеиновых кислот и белков (Ябров А.А., 1967; Ябров А.А., 1969).

В 1974 году Тиссиерес с соавторами идентифицировал белки, которые появлялись у личинок дрозофил в ответ на повышение температуры с +20 до +37° С, за что они были названы белками теплового шока (БТШ) (Tissieres A. et al., 1974).

Вскоре было обнаружено, что БТШ вырабатываются в клетках в ответ на самые разные экстремальные воздействия. Помимо гипотермии, усиленная выработка БТШ происходит при ишемии и гипоксии (Tarricone et

al., 2008), при воспалении (Kratochwill K. et al., 2011; Füst G. et al., 2012), при вирусном заражении клеток (Qin Z. et al., 2010), при бактериальной инфекции (Suliman H.B. et al., 2010), при гельминтозе (Kaul G., Thippeswamy H., 2011), воздействии некоторых лекарственных препаратов (Fujita R. et al., 2011), наркотических веществ (Kiyatkin E.A., Sharma H.S., 2011), при воздействии активных форм кислорода (Stankowski J.N. et al., 2011), при индукции дифференцировки клеток (Fan G.C., 2012), при помещении клетки в среду с экстремально пониженным, или напротив, повышенным осмотическим давлением, при попадании в организм тяжелых металлов, при воздействии ультрафиолетового излучения (Matsuda M. et al., 2010), радиации (Hurwitz M.D. et al., 2010), при трансплантации органов (Wood K.L. et al., 2010), при онкологических заболеваниях (Pawaria S. et al., 2011) и др.

Причем, обнаружены эти белки были в самых разных клетках - от клеток человека и всех животных до клеток растений, грибов и бактерий, а также в клетках опухолей. Функции БТШ, в общем, состоят в защите белковых молекул от повреждений под воздействием экстремального фактора. Синтез этих белков начинается очень быстро – появление мРНК БТШ отмечается в клетках уже через 5 мин после начала действия экстремального фактора, а через 15 минут в клетках уже обнаруживаются новые белки (Matsuda M. et al., 2010; Fujita R. et al., 2011; Kaul G., Thippeswamy H., 2011; Kiyatkin E.A., Sharma H.S., 2011; Kratochwill K. et al., 2011; Pawaria S. et al., 2011; Stankowski J.N. et al., 2011; Füst G. et al., 2012).

БТШ разделяют на 6 семейств: первое - высокомолекулярные БТШ с массой 100-110 кДа, второе - БТШ с массой 83-90 кДа, так называемое семейство БТШ 90, третье – семейство БТШ 70, в которое входят белки с массой от 66 до 78 кДа, четвертое – семейство БТШ 60, пятое – семейство БТШ 40 и, наконец, низкомолекулярные белки теплового шока с молекулярной массой в пределах 15 – 30 кДа (Fan G.C., 2012).

Функциональная роль БТШ сводится, главным образом, к энергозависимой защите и регуляции формирования нативной пространственной структуры разнообразных клеточных белков, в том числе

ферментов (Fan G.C., 2012). В частности, показано, что защитная роль человеческого БТШ 27 против  $H_2O_2$ -опосредованного окислительного стресса связана со способностью этого белка защищать Г6ФДГ, а также, в несколько меньшей степени, ГР и глутатионтрансферазу, от воздействия свободных радикалов. Это приводит к стабилизации в клетке уровня восстановленного глутатиона и повышению эффективности его использования в качестве антиоксиданта. Выявлено, что БТШ 25 способен защищать дыхательную цепь митохондрий, путем взаимодействия с комплексом I, который катализирует двухэлектронное окисление НАДН убихиноном, от окисления, при индукции окислительного стресса в условиях действия экстремальных факторов, в частности, гипертермии (Vamecq J. et al., 2012; Aggarwal N.T., Makielski J.C., 2013).

Одной из важнейших особенностей, связанных с БТШ, является исключительная быстрота, с которой осуществляется индукция их синтеза при действии на клетку какого либо экстремального фактора. Так, через 1-2 минуты после стрессорного (гипертермического) воздействия запускается транскрипция генов, кодирующих БТШ, в течение первых 10 минут синтезируется мРНК, которая исчезает только к 24 часу восстановительного периода. Спустя 10 - 15 мин после начала действия экстремального фактора можно зарегистрировать в клетках появление первых молекул новосинтезированных БТШ. Синтез БТШ достигает максимума к 3 - 6 и прекращается к 8 часу после начала действия экстремального фактора. Далее БТШ находятся в клетке примерно в течение 5 суток (Wang S. et al., 2009).

Период интенсивного образования БТШ сопровождается резким снижением синтеза остальных белков, в то числе и в клетках опухолей (Vamecq J. et al., 2012; Aggarwal N.T., Makielski J.C., 2013; Simar D. et al., 2012). Интенсивность общего белкового синтеза начинает восстанавливаться лишь спустя 7 - 8 часов после стрессорного воздействия и достигает первоначального уровня лишь к 24 часу (Corrêa R.R. et al., 2012).

При этом, в условиях, когда стрессовому воздействию подвергнут весь организм, синтез БТШ находится в корреляции с уровнем нейрогуморальных факторов (Stice J.P., Chen L., 2011; Kiyatkin E.A., Sharma H.S., 2011) и регулируется стресс-гормонами (Sirotkin A.V., Bauer M., 2011).

Важнейшим синтетическим аппаратом клетки, обеспечивающим фолдинг и посттрансляционную модификацию синтезируемых клеткой белков является эндоплазматический ретикулум (ЭПР). Количество белков, которое способно модифицироваться в ЭПР за единицу времени, запрограммировано особенностями данной клетки и модулируется ее физиологическим состоянием. С помощью специфических сигналов, которые обуславливаются физиологическим состоянием организма и клетки, количество таких белков может изменяться. При этом в ряде случаев возможно возникновение дисбаланса между количеством белков, которые синтезированы клеткой и нуждаются в посттрансляционной модификации в ЭПР, и возможностями самого ЭПР. Такая ситуация, которая получила наименование ЭПР-стресс, может быть следствием различных патологических состояний, например ишемии, вирусных инфекций и мутаций, которые нарушают ход реакций фолдинга белков. В случае ЭПР-стресса в клетке развиваются процессы, известные как *unfolded protein response*, которые состоят в повышении уровня транскрипции генов, кодирующих шапероны, ферменты и структурные компоненты ЭПР (Birkenfeld A.L. et al., 2011; Chakrabarti A.A. et al., 2011).

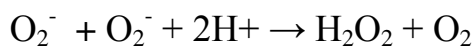
В последние несколько лет ЭПР-стресс активно изучается в связи с онкологическими заболеваниями. В частности показана индукция реакций ЭПР-стресса в опухолевых клетках, его связь с усилением устойчивости опухолевых клеток к противоопухолевой терапии, с усилением ангиогенеза опухолевой ткани (Wang G. et al., 2010).

Поскольку одним из наиболее распространенных последствий экстремальных воздействий является индукция окислительных повреждений

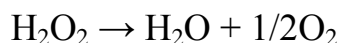
различных структур клетки, функционирование значительной части клеточных адаптационных систем направлено на борьбу с АФК.

Среди них, в первую очередь, следует указать работу ряда оксидоредуктаз, получивших наименование антиоксидантных ферментов. К ним относятся супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза, глутатион-S-трансфераза, которые катализируют превращения АФК (Ognjanović B.I. et al., 2012; Zhao Y. et al., 2009; Kilburn L. et al., 2010; Carr W.J. et al., 2011; Sugadev R. et al., 2011).

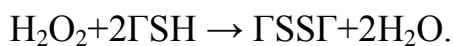
Супероксиддисмутаза катализирует дисмутацию двух супероксидных радикалов по схеме:



Образующаяся при этом перекись водорода разлагается либо каталазой:



либо восстанавливается глутатионпероксидазой с помощью восстановленного глутатиона:



Важным клеточным защитным ферментом, чья деятельность также связана с глутатионом, является глутатион-S-трансфераза. Индукция синтеза глутатион-S-трансферазы является одной из наиболее ранних реакций клетки на действие повреждающих факторов (Ognjanović B.I. et al., 2012; Zhao Y. et al., 2009; Kilburn L. et al., 2010; Carr W.J. et al., 2011; Sugadev R. et al., 2011). Этот цитоплазматический фермент катализирует конъюгацию глутатиона с различными патогенными электрофильными веществами как экзогенного, так и эндогенного происхождения, восстанавливая их и защищая, таким образом, разнообразные клеточные структуры от окисления. Например, глутатион-S-трансфераза способна восстанавливать гидроперекисные группы липидов (ЛООН), образующиеся в результате действия АФК по следующей схеме:



Таким образом, восстановленный глутатион является одним из важных компонентов антиоксидантной защиты клетки (Ognjanović B.I. et al., 2012; Zhao Y. et al., 2009; Kilburn L. et al., 2010; Carr W.J. et al., 2011; Sugadev R. et al., 2011). Восстановление окисленного глутатиона осуществляет глутатионредуктаза (Ballatori N. et al., 2009; Marí M. et al., 2009; Zhao Y. et al., 2009; Kilburn L. et al., 2010) по следующей схеме:



На практике, наибольшее значение для данной реакции имеет содержание в клетке НАДФН, поскольку ее скорость с использованием этого кофактора в 200 раз выше, чем с использованием НАДН. В этой связи, особое значение, в условиях действия экстремального фактора, приобретает работа пентозофосфатного пути (ПФП), являющегося основным клеточным поставщиком НАДФН. Было показано, что активизация ПФП происходит при ряде экстремальных воздействий, сопряженных с индукцией АФК. Такую активизацию рассматривают как один из важных компонентов адаптации клетки. Было показано, что увеличение активности Г6ФДГ – ключевого фермента пентозного пути (Stanton R.C., 2012), в условиях развития окислительного стресса приводит к восстановлению уровня восстановленного глутатиона в клетке (Xu Y. et al., 2010; Zhang Z. et al., 2010; Perl A. et al., 2011).

К тому же, кроме глутатионредуктазы, в наличии НАДФН нуждается и другой фермент, непосредственно связанный с антиоксидантной защитой клетки, цитозольная НАДФН-зависимая убихинон редуктаза, осуществляющая восстановление убихинона – важного эндогенного антиоксиданта. Обнаружено, что этот фермент регенерирует в гепатоцитах крыс более 80 % всего цитозольного убихинона (Albracht S.P., 2010; Morina K., 2011).

Причем, было показано, что экспрессия генов цитозольной НАДФН-зависимой убихинон редуктазы, находится под контролем регуляторных факторов, общих и для регуляции экспрессии генов глутатион-S-

трансферазы, что позволяет клетке повысить эффективность своего защитного ответа в условиях действия экстремального фактора (Xu J., Jaiswal A.K., 2012; Tew K.D., Townsend D.M., 2012).

Вообще одно из ключевых положений в антиоксидантной системе организма занимают так называемые эндогенные антиоксиданты. Кроме описанного выше убихинона, а точнее, его восстановленной, спиртовой формы, убихинола, к ним относятся жирорастворимые антиоксиданты –  $\alpha$ -токоферол,  $\beta$ -каротин, полифенолы, локализованные в липидных структурах клетки, и водорастворимые – аскорбиновая кислота, эрготионеин, действующие в водной фазе внутриклеточного пространства. Антиоксидантную роль могут выполнять также и неорганические вещества, в частности, селен. Причем, действуя одновременно, антиоксиданты способны увеличивать эффективность друг друга. Например, показано, что в присутствии  $\beta$ -каротина и селена, значительно повышается эффективность работы убихинол-зависимых защитных систем (Raghavamenon A. et al., 2009; Lü J.M. et al., 2010).

Кроме того, было показано, что в различных клетках эффективными антиоксидантами являются стероидные гормоны, в частности, эстрогены. Они способны защищать от окислительных повреждений липиды, белки и нуклеиновые кислоты клетки, способствуют усилению синтеза некоторых антиоксидантных ферментов, и защищают митохондрии в ситуации окислительного стресса (Simpkins W. et al., 2010).

Таким образом, клеточные механизмы неспецифической адаптации достаточно разнообразны и способны обеспечивать быструю и эффективную приспособляемость клетки к действию широкого спектра неблагоприятных факторов. В свою очередь, важным условием для осуществления нормальной работы этих механизмов, является адекватное течение внутриклеточного обмена веществ, поскольку именно от него зависит уровень энергетического и пластического обеспечения адаптационных реакций клетки.

В соответствии со схемой экстремальных состояний, предложенной профессором В.П. Нефедовым (рисунок 1.1.), адаптационные возможности организма уменьшаются по мере возрастания тяжести его состояния, которая в свою очередь зависит от интенсивности и продолжительности действия экстремального фактора (Нефедов В.П., 2000; Нефедов В.П. и др., 2002).

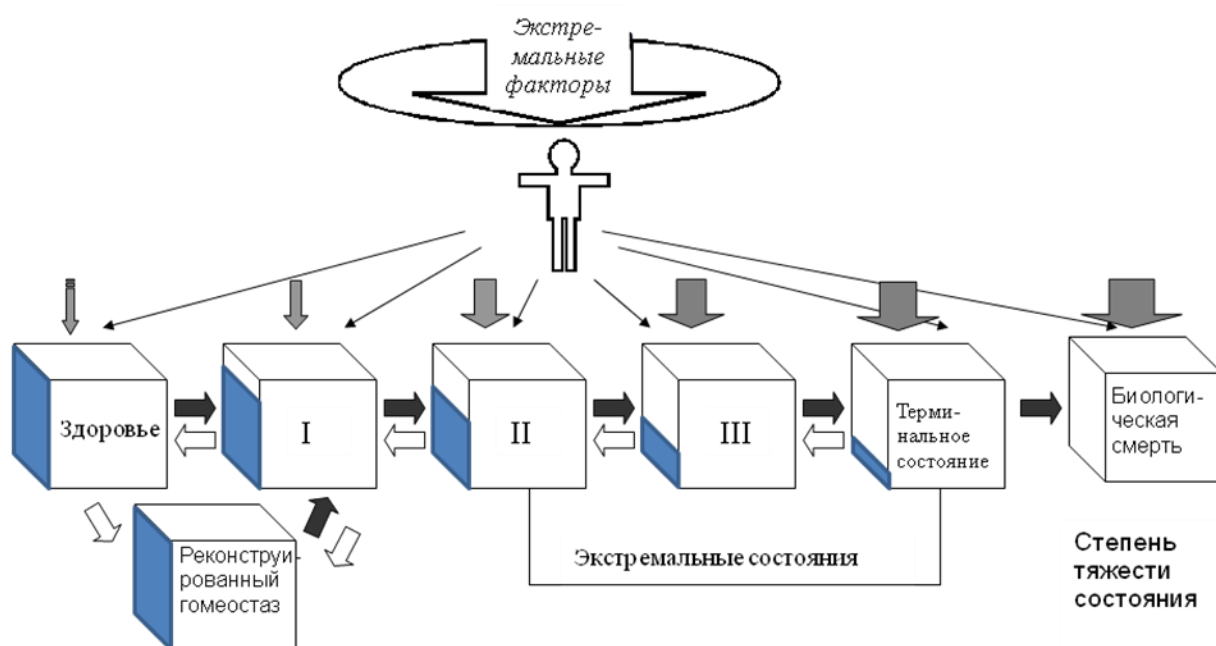


Рисунок 1.1 – Схема экстремальных состояний организма (по В.П.Нефедову)

Примечание – серые вертикальные стрелки – требуемый объем коррекции параметров организма; заштрихованная часть куба – адаптационные возможности; I – переходное состояние между нормой («здоровьем», ненарушенным гомеостазом) и болезнью; II-III – патологические состояния различной степени тяжести, включая экстремальные

По Ф.З. Меерсону, «индивидуальную адаптацию можно определить как развивающийся в ходе жизни процесс, в результате которого организм приобретает устойчивость к определенному фактору окружающей среды и, таким образом, получает возможность жить в условиях, ранее несовместимых с жизнью, и решать задачи, прежде не разрешимые» (Меерсон Ф.З., Пшенникова М.Г., 1988). В соответствии с представленными выше данными литературы, это утверждение вполне можно распространить и



на отдельные клетки в организме, оказавшиеся под воздействием неблагоприятных факторов его внутренней среды.

Таким образом, в условиях онкологического заболевания, по мере увеличения массы опухоли и интенсивности действия на организм факторов канцерогенеза, адаптационные возможности организма, а следовательно, и функциональные возможности его различных систем, будут уменьшаться пропорционально размеру опухоли. Следовательно, одной из важнейших характеристик опухолевого процесса является скорость роста опухоли, которая зависит от природы опухоли, от особенностей организма и характера лечения (Enderling H. et al., 2009; Enderling H. et al., 2010). В свою очередь, скорость роста опухоли определяет особенности течения заболевания.

#### 1.4. Кинетические характеристики опухолевого роста

Изучение кинетики онкологических процессов целесообразно проводить с использованием индуцированных или перевиваемых опухолей лабораторных животных, так как такие эксперименты, в отличие от клинических наблюдений, позволяют контролировать условия возникновения опухоли. Контроль начальных условий может достигать очень высокой точности. При этом существует минимальное пороговое количество инокулированных в здоровое животное клеток опухоли, при котором развития опухоли не произойдет. Так, для лейкоза L<sub>a</sub> у мышей пороговое число клеток составляет  $10^4$  и при введении меньшего количества клеток лейкоз не развивается. Такая же величина характерна для пороговой численности клеток эритромиелома Швеца у крыс. Величина порога и продолжительность латентного периода для одной и той же опухоли может меняться в зависимости от сопутствующих факторов. В частности, применение противоопухолевых препаратов может увеличить порог либо удлинить латентный период (Эмануэль Н.М., 1977; Эмануэль Н.М., 2006).

Существует множество индуцированных и перевиваемых опухолей лабораторных животных. Однако изучение кинетики различных опухолей лабораторных животных показало, что они могут быть описаны с помощью экспоненциальных, S-образных и степенных функций. Обычно на графиках отражают изменение количества опухолевых клеток в организме с течением времени от начала заболевания. Пример описания кинетики с помощью S-образных кривых приведен на рисунке 1.2.

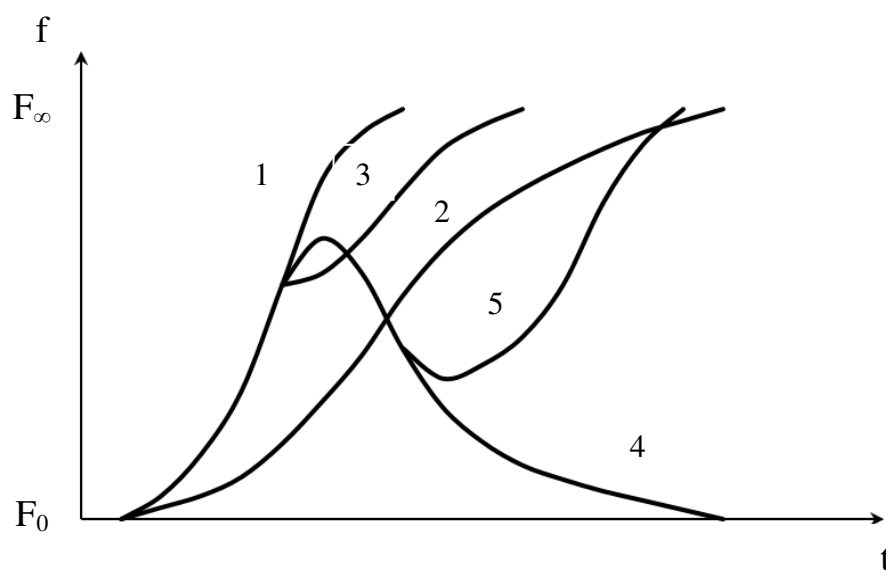


Рисунок 1.2 – Типы кинетических кривых опухолевого роста

Примечание – 1 – контроль; 2 – торможение при ранней терапии; 3-5 – воздействия на развившийся процесс с эффектами торможения (3), полной (4) и частичной (5) регрессией;  $F$  – размер опухоли ( $F_0$  – начальный,  $F_\infty$  – предельно достижимый) (цит. по Эмануэль Н.М., 1977).

Наряду с отображением количества опухолевых клеток в организме, возможно описание кинетики опухолевого роста с помощью изменений объема или массы опухоли. В ряде случаев интерес представляет отображение на графиках кривых смертности (или выживаемости) животных с привитыми опухолями в экспериментальных группах. Такие кривые также имеют S-образный характер.

В типичной кривой, отображающей опухолевый рост, можно выделить три участка: латентный период, или лаг-фаза, фаза экспоненциального роста и терминальная фаза, во время которой кривая роста опухоли выходит на плато. Для перевиваемых опухолей продолжительность лаг-фазы в значительной степени определяется количеством опухолевых клеток в инокуляте. Так, в случае прививаемой внутрибрюшинно карциномы Эрлиха, которая в настоящей работе была использована в качестве модельной опухоли, при введении  $4 \times 10^7$  клеток лаг-фаза не определяется, при малых инокулятах латентный период может достигать 15-20 суток (Шапот В.С., 1975). Фаза экспоненциального роста характеризуется появлением в организме большого количества опухолевых клеток, внутрибрюшинная опухоль начинает выявляться при внешнем осмотре животного.

Достигнув максимума, во время терминальной фазы, количество опухолевых клеток может оставаться примерно на одном уровне. В этот период начинает нарастать процент аномальных митозов и дегенерирующих клеток. Наступает равновесие между ослабленным процессом размножения и усиленной гибелью клеток опухоли. Иногда отмирание клеток преобладает и отмечается снижение общего числа опухолевых клеток (Гвичия А.Ш., 1983).

Изменение количества клеток в асцитной жидкости описывается уравнением:

$$\sqrt[3]{N} = \sqrt[3]{N_0} + b(t - t_0)$$

где  $N_0$  – количество инокулированных клеток;  $b$  – постоянный коэффициент;  $t_0$  – момент, когда  $\sqrt[3]{N} = \sqrt[3]{N_0}$ .

С увеличением инокулята от  $7,3 \times 10^5$  до  $1,75 \times 10^7$  коэффициент  $b$  возрастает от 3,8 до 4,8, и с дальнейшим увеличением  $N_0$  до  $4,0 \times 10^7$  снижается до 3,0. При этом отмечается отсутствие зависимости величины коэффициента  $b$  от «возраста» инокулята, а также пропорциональная зависимость между объемом асцитной жидкости и количеством содержащихся в ней опухолевых клеток, означающая постоянство удельного содержания клеток в опухоли (Эмануэль Н.М., 1977; Эмануэль Н.М., 2006).

## Заключение

Опухолевый рост способен оказывать неблагоприятное влияние на состояние внутренней среды организма и приводить к нарушениям обмена веществ и функций его клеток. Однако приведенные в обзоре литературы данные свидетельствуют о функционировании в клетках организма различных молекулярных механизмов адаптации к неблагоприятным условиям существования. Реализация этих механизмов требует адекватного ответа со стороны обменных процессов, так как именно от них зависит обеспечение клеток энергетическими и пластическими ресурсами, необходимыми для реализации адаптационных реакций. Следовательно, обменные процессы должны играть ключевую роль в реакции клеток на действие неблагоприятных условий.

Учитывая, что функционирование различных защитных систем клеток носит, по отношению к типу тканей, преимущественно неспецифический характер, можно сделать предположение о неспецифическом характере изменений внутриклеточных обменных процессов, которые развиваются в условиях адаптации клеток к воздействию неблагоприятных факторов канцерогенеза.

Интенсивность воздействия опухоли на организм в значительной степени определяется ее массой и, следовательно, меняется по мере ее роста. Очевидно, что кинетические особенности роста опухоли могут быть определяющим фактором для характера обменных процессов в клетках организма. Поэтому представляется актуальным исследовать особенности обменных процессов, происходящих в клетках организма, в процессе канцерогенеза от момента возникновения опухоли в организме и до исхода заболевания. Наиболее удобными экспериментальными моделями в этом случае являются перевиваемые опухоли лабораторных животных, поскольку позволяют контролировать начальные условия опухолевого роста.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Характеристика используемых лабораторных животных и методы прививки опухоли

В работе использовали мышей ICR с массой тела 22–24 г, и лабораторных нелинейных крыс массой 170 – 220 г, обоих полов в равном соотношении, полученных в питомнике Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «ВЕКТОР» (Новосибирская область), содержащихся в стандартных условиях вивария.

Суспензию клеток АКЭ для последующей перевивки во всех случаях получали у мышей-доноров на 9-е сут роста опухоли. Введение клеток АКЭ мышам осуществляли внутрибрюшинно или внутрикожно. При внутрибрюшинном введении инокуляцию опухолевых клеток в брюшную полость животных осуществляли в количестве  $3 \times 10^6$  и  $1 \times 10^4$  клеток на одно животное в 0,2 мл 0,9 % NaCl. Перед инокуляцией клетки трижды отмывались в физиологическом растворе от асцитической жидкости животного-донора путем чередования циклов центрифугирования - ресуспендирования.

В случае введения клеток АКЭ в количестве  $1 \times 10^4$  на 1 мышь, в ходе эксперимента выявлялись животные, у которых, несмотря на введение в организм клеток АКЭ, опухоль не развилась. Такие животные наблюдались в течение 120 сут, после чего исследовались на наличие опухоли в организме.

Внутрикожное введение клеток АКЭ осуществляли путем прокола кожи животного иглой шприца, на срезе которой находилась суспензия опухолевых клеток. Прививка осуществлялась в коже проксимальной области правого бедра.

Исследование проводилось в соответствии с принципами гуманного обращения с лабораторными животными и их рационального использования, определенными законодательством Российской Федерации и международными правовыми актами.

## 2.2. Выделение лимфоцитов из крови животных

Лимфоциты мышей выделяли из крови в градиенте фиколл-урографина ( $\rho=1,083$  г/мл) и отмывали от 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. Число лимфоцитов подсчитывали в камере Горяева и разводили средой 199 до концентрации  $1 \times 10^6$  кл/мл, затем замораживали. После размораживания суспензию гомогенизировали (Кочетов Г.А., 1980).

## 2.3. Выделение опухолевых клеток из брюшной полости животных

Суспензию опухолевых клеток брали из брюшной полости животных после проведения лапаротомии. Клетки АКЭ трижды отмывали от асцитической плазмы в охлажденном физиологическом растворе путем чередования циклов центрифугирования и последующего ресуспендирования. После третьего центрифугирования полученную суспензию клеток замораживали. После размораживания суспензию гомогенизировали (Кочетов Г.А., 1980).

В опытах с введением клеток АКЭ в количестве  $3 \times 10^6$  на 1 животное взятие суспензии клеток АКЭ осуществляли на 5, 7, 9, 11, 13 и 15 сут после инокуляции опухоли, считая день прививки первым днем роста опухоли, при этом к 15-м сут смертность мышей составляла 20 %.

В опытах с введением клеток АКЭ в количестве  $1 \times 10^4$  на 1 животное мыши были разделены на 5 групп:

1. Выжившие в ходе эксперимента;
2. Погибшие в течение 45 сут после инокуляции АКЭ;
3. Погибшие с 45 по 60 сут после инокуляции АКЭ;
4. Погибшие с 60 по 70 сут после инокуляции АКЭ;
5. Погибшие с 70 по 100 сут после инокуляции АКЭ.

## 2.4. Взятие образцов ткани солидной карциномы Эрлиха

На 67-е сут после прививки, мышей умерщвляли дислокацией шейных позвонков, после чего опухоль вырезали, далее проводился разрез в продольной плоскости, повторным разрезом отделяли пластинку ткани и делили ее на 20 равных частей. На рисунке 2.1. показана морфология опухоли и способ получения образцов ее ткани.

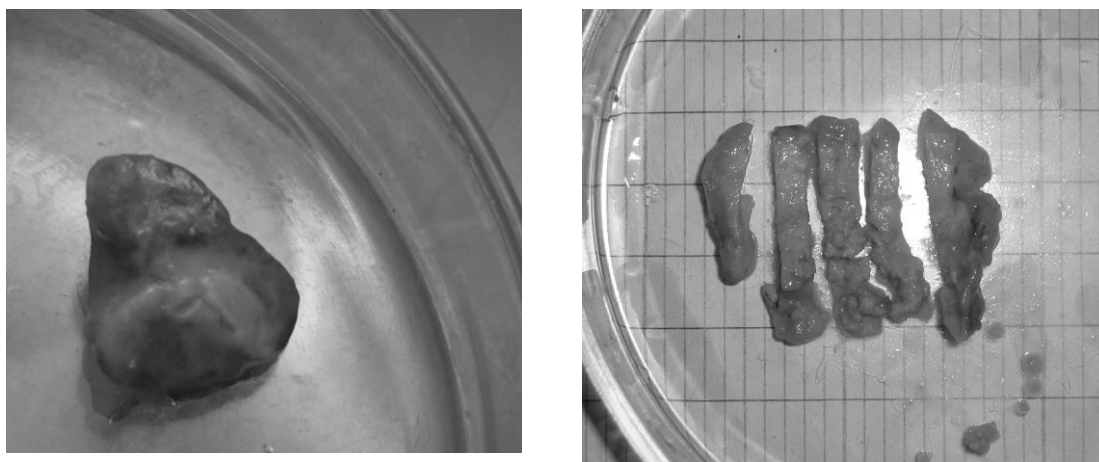


Рисунок 2.1 – Морфология опухоли и иллюстрация техники получения образцов опухолевой ткани.

Полученные образцы ткани нумеровались и замораживались. Перед определением активности ферментов, полученные образцы тканей размораживались и гомогенизировались. Гомогенизацию осуществляли ручным гомогенизатором в течении 10 мин с добавлением бидистиллированной воды, полученный гомогенат центрифугировали при 400 g в течении 10 мин. Супернатант пропусклся через марлевый фильтр, полученный гомогенат замораживался. Полученные образцы использовались для биolumинесцентного анализа.

## 2.5. Выделение перитонеальных макрофагов

Выделение макрофагов проводили по адгезивности к полистиролу (Клаус Дж., 1990). Для этого суспензию перитонеальных клеток суспендировали в культуральной среде, содержащей 0,2% бычьего сывороточного альбумина. Далее полученную клеточную взвесь вносили в полистироловую чашку Петри диаметром 45 мм. Инкубировали 1 час при +37 градусах Цельсия. Затем осторожно удаляли не прилипшие клетки.

Дно чашки обмывали фосфатным буфером, не содержащим ионы  $\text{Ca}^{2+}$  и заполнив ее этим же раствором, содержащим 5 мм глюкозы, оставляли при +37°C на 15 минут. В отсутствие ионов кальция часть макрофагов спонтанно отлипает от пластика. Клетки, еще сохранившие адгезивность, снимали с поверхности пластика пипетированием.

Контрольную группу составляли интактные мыши, из брюшной полости которых также выделяли макрофаги. В группы входило по 10 – 12 животных.

## 2.6. Взятие образцов ткани печени

Взятие ткани печени у животных с АКЭ осуществляли на 5, 7, 9, 11, 13 и 15 сут после инокуляции опухоли, считая день прививки первым днем роста опухоли. Перед взятием ткани животные умерщвлялись дислокацией шейных позвонков. Печеночную ткань промывали охлажденным физиологическим раствором, после чего замораживали.

## 2.7. Билюминесцентный метод определения активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в клетках различных тканей животных

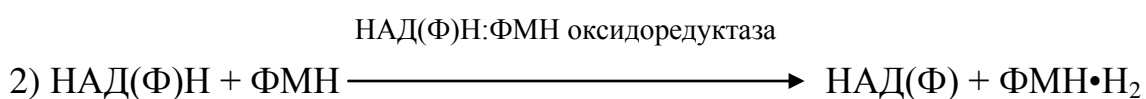
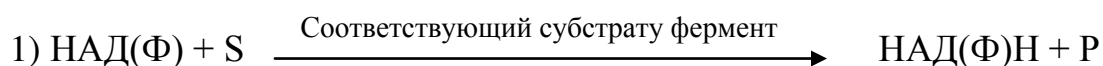
Билюминесцентным методом определяли активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ), глицерол-3-фосфатдегидрогеназы (ГЗФДГ), малик-фермента (НАДФМДГ), лактатдегидрогеназы для НАД- и НАДН-



зависимой реакции (НАДЛДГ и НАДНЛДГ, соответственно), малатдегидрогеназы для НАД- и НАДН-зависимой реакции (НАДМДГ и НАДНМДГ, соответственно), глутаматдегидрогеназы для НАДФ- и НАДФН-зависимой реакции (НАДФГДГ и НАДФНГДГ, соответственно), глутаматдегидрогеназы для НАД- и НАДН-зависимой реакции (НАДГДГ и НАДНГДГ, соответственно), НАД- и НАДФ-зависимых изоцитратдегидрогеназ (НАДИЦДГ и НАДФИЦДГ, соответственно) и глутатионредуктазы (ГР).

Биолюминесцентное определение активности дегидрогеназ лимфоцитов проводили по методике (Савченко А.А., Сунцова Л.Н., 1989; Савченко А.А., 1991), с использованием биолюминометров БЛМ-8801 и БЛМ-8802, сконструированных в Специальном конструкторско-технологическом бюро “Наука” Красноярского научного центра СО РАН.

Определение активности ферментов осуществляли с использованием сопряженной биолюминесцентной системы, содержащей люциферазу и НАД(Ф)Н оксидоредуктазу. Последняя восстанавливает ФМН до ФМН•Н<sub>2</sub>, который, в свою очередь, требуется для люциферазной реакции:



Где S –исследуемый субстрат, P – продукт реакции

При работе с выделенными лимфоцитами, суспензию клеток, содержащую  $1 \times 10^6$  клеток, после однократного замораживания - размораживания дополнительно разрушали путем осмотического лизиса добавлением дистиллированной воды (1:5 по объему) и 1,0-2,0 мМ дитиотреитола.

Получение гомогенатов тканей осуществляли по методике, описанной в работе Кочетова (Кочетов Г.А., 1980). Далее, в полученном экстракте определяли количество белка по методу Брэдфорда с использованием реактива кумасси бриллиантовый синий G-250 (Досон Р. и др., 1991).

В 600 мкл инкубационной смеси, содержащей соответствующий субстрат (малат, глутамат, 2-оксоглутарат, изоцитрат, глутатион окисленный (ICN Biomedicals Inc., США), лактат, (Sigma, Германия), глюкозо-6-фосфат,  $\alpha$ -глицерофосфат, пируват и оксалоацетат (Serva, Германия)) и кофактор (НАД и НАДФ (AppliChem GmbH, Германия), НАДН и НАДФН (ICN Biomedicals Inc., США), ФМН (Sigma, Германия), вносили 200 мкл суспензии разрушенных лимфоцитов или экстракта тканей.

Концентрации субстратов, кофакторов и показатели pH среды для определения активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах крови и экстрактах тканей представлены в таблице 2.1.

Необходимо отметить, что в инкубационную смесь для определения активности НАДФИЦДГ и ИЦДГ дополнительно добавляли АДФ в концентрации 2,15 мМ и 1,3 мМ соответственно. В среду инкубации для определения уровней НАДНГДГ и Обр. НАДФНГДГ дополнительно вносили  $\text{NH}_4\text{Cl}$  в концентрации 5,0 мМ.

После инкубации при  $+37^\circ\text{C}$  в течение 30 минут (для ферментативных реакций с восстановлением НАД(Ф)) или 5 минут (для реакции с окислением НАД(Ф)Н) 200 мкл инкубационной смеси добавляли в кювету биолюминометра, куда предварительно вносили 50 мкл ФМН в концентрации  $1.5 \times 10^{-5}\text{M}$ , 10 мкл ферментативной системы НАД(Ф)Н:ФМН оксидоредуктаза-люцифераза и 50 мкл 0,0005% альдегида  $\text{C}_{14}$  (все реактивы биолюминесцентной системы разведены в 0,1 М  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ -фосфатном буфере с

pH 7,0). Измеряли уровень биолюминесценции и при помощи калибровочной кривой определяли концентрацию НАД(Ф)Н в пробе. Ферментативная система НАД(Ф)Н:ФМНоксидоредуктаза-люцифераза изготовлена из очищенных методами ионнообменной хроматографии и гель-фильтрации люциферазы из *Photobacterium leiognathi* и оксидоредуктазы из *Vibrio fischeri* в Институте биофизики СО РАН (Тюлькова Н.А., 1991).

Таблица 2.1. – Концентрация субстратов, кофакторов и показатели pH среды для определения активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах крови и экстрактах тканей биолюминесцентным методом

Фермент	Субстрат – мМ	Кофактор – мМ	pH буфера
Г6ФДГ	Г6Ф – 1,5	НАДФ – 0,025	9,8
Г3ФДГ	Г3Ф – 0,5	НАД – 0,35	9,8
ЛДГ	Лактат – 2,0	НАД – 0,50	9,0
МДГ	Малат – 2,0	НАД – 2,50	9,8
НАДФМДГ	Малат – 7,5	НАДФ – 0,375	9,8
НАДФГДГ	Глутамат – 0,5	НАДФ – 1,65	9,8
ГДГ	Глутамат – 8,7	НАД – 8,10	9,8
ИЦДГ	Изоцитрат – 5,0	НАД – 5,0	7,8
НАДФИЦДГ	Изоцитрат – 1,375	НАДФ – 0,075	7,4
НАДНЛДГ	Пируват – 0,25	НАДН – 0,005	7,0
НАДНМДГ	Оксалоацетат – 0,5	НАДН – 0,005	7,0
ГР	GSH – 0,5	НАДФН – 0,0025	7,4
НАДНФГДГ	Оксоглутарат – 100	НАДФН – 0,0025	7,4
НАДНГДГ	Оксоглутарат – 100	НАДН – 0,0025	7,0

Примечание: среды с pH 9,0 и 9,8 готовили на Трис-НСl буфере (ICN Biomedicals Inc., США); с pH 7,0, 7,4 и 7,8 – на K<sup>+</sup>,Na<sup>+</sup>-фосфатном буфере (буфер готовили из K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> и NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Реахим, Россия)).

Учитывая, что в клетках обычно имеется некоторое количество субстратов для реакций обмена веществ, в числе прочего катализируемых и исследуемыми ферментами, определялись показатели, условно названные «фоны ферментов». Определение фонов ферментов проводили в тех же условиях, что и вышеперечисленных дегидрогеназ, но в инкубационный раствор вместо соответствующего субстрата вносили буфер.

Для построения графика зависимости интенсивности биолюминесценции от концентрации НАД(Ф)Н (калибровочный график) 200 мкл стандартного раствора НАД(Ф)Н в диапазоне концентраций  $10^{-9}$  –  $10^{-4}$  М вносили в кюветы биолюминометра, содержащие биолюминесцентные реактивы в концентрациях указанных выше, после чего проводилось измерение интенсивности биолюминесценции. В связи с широким диапазоном рН буферов, используемых для определения дегидрогеназной активности, а также зависимостью биолюминесценции ферментативной системы из светящихся бактерий от рН, калибровочные графики строились отдельно для каждой рН буфера.

Активность НАД(Ф) зависимых дегидрогеназ лимфоцитов выражали в ферментативных единицах на  $10^4$  клеток, где  $1Е=1\text{мкмоль/мин}$ .

Биолюминесцентное определение активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ клеток АКЭ и тканей проводилось аналогичным способом, за исключением того, что в биолюминесцентную кювету вносилась суспензия разрушенных клеток АКЭ или гомогенат тканей, в которой количество белка составляло 2 мкг/мл, что соответствует количеству белка в  $1 \times 10^4$  лимфоцитах. Соответственно активность ферментов в этих случаях относили на 1 мг белка. Определение концентрации белка в лимфоцитах и клетках АКЭ проводили по методу Бредфорда (Досон Р. и др., 1991). Активность НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ рассчитывали по формуле:

$$A = \frac{\Delta C * V * 10^{-6}}{T};$$

где  $\Delta[C]$  - разница концентраций НАД(Ф)Н<sub>2</sub> в пробах «фермент» и «фон фермента»; V - объем пробы в миллилитрах; T - время инкубации в минутах.

## 2.8. Биolumинесцентный метод определения концентраций метаболитических субстратов и НАД<sup>+</sup> в клетках различных тканей животных

Определение концентраций метаболитических субстратов и коферментов может дать важную информацию о характере биохимических процессов в клетках. Поскольку, как правило, концентрации субстратов и коферментов в клетках не велики, важным требованием к методике их определения является достаточная чувствительность. Этому требованию в полной мере отвечает биolumинесцентный метод. Концентрации субстратов определяли с использованием сопряженной биolumинесцентной системы, схема которой приведена в параграфе 2.8.

При этом важным было выявление оптимальных концентраций коферментов для исследования концентраций соответствующих субстратов. Для реакций, в которых в качестве исследуемого субстрата выступали малат, глутамат и лактат, исследование осуществляли следующим образом: 100 мкл суспензии разрушенных клеток вносили в 100 мкл инкубационного раствора, который содержал соответствующий фермент - малатдегидрогеназу (МДГ), глутаматдегидрогеназу (ГДГ) или лактатдегидрогеназу (ЛДГ) с уровнем активности 1,0 мкЕ. Инкубационный раствор содержал также НАД<sup>+</sup> в концентрации от  $1,0 \times 10^{-5}$  до  $7,5 \times 10^{-3}$  М.

Для реакции, в которой в качестве исследуемого субстрата выступал пируват, а в качестве кофермента – НАДН, 100 мкл суспензии разрушенных клеток вносили в 100 мкл инкубационного раствора, который содержал ЛДГ с уровнем активности 1,0 мкЕ и НАДН в диапазоне концентраций от  $1,0 \times 10^{-5}$  до  $1,0 \times 10^{-9}$  М. В том случае, когда исследуемым субстратом являлся НАД<sup>+</sup>, а кофактором для его определения выступал лактат, концентрацию последнего варьировали в диапазоне от  $1,0 \times 10^{-5}$  до  $7,5 \times 10^{-3}$  М (фермент – лактатдегидрогеназа).

Далее полученные реакционные пробы инкубировали при +37° С в течение 30 минут для ферментативных реакций с восстановлением НАД<sup>+</sup> или 15 минут для реакции с окислением НАДН. После чего добавляли 300 мкл

0,1 М  $K^+$ ,  $Na^+$  - фосфатного буфера (рН 7,0), 100 мкл раствора, содержащего ФМН в концентрации  $1,5 \times 10^{-5}$  М и альдегид (тетрадеканаль) в концентрации 0,0005 %, после чего вносили 50 мкл ферментативной системы НАД(Ф)Н:ФМНоксидоредуктаза-люцифераза (все реактивы биолюминесцентной системы разведены в 0,1 М  $K^+$ ,  $Na^+$  - фосфатном буфере рН 7,0).

Максимум интенсивности биолюминесценции определяли с использованием Биохемиллюминометра 3606 М, сконструированном в СКТБ «Наука» Красноярского научного центра СО РАН. При помощи калибровочной кривой определяли концентрацию НАДН в пробе.

В результате были найдены оптимальные значения концентраций коферментов для определения содержания пирувата, лактата, малата, глутамата и НАД<sup>+</sup> в клетках (таблица 2.2).

При данных дегидрогеназных реакциях превращение одной молекулы субстрата соответствует превращению одной молекулы кофермента. Таким образом, количество НАДН в пробе отражает концентрацию исследуемого субстрата. Учитывая, что в клетках имеется определенное эндогенное количество других ферментов, определялись показатели, условно названные «фоном» (Савченко А.А., Сунцова Л.Н., 1989; Савченко А.А., 1991).

Определение «фонов» проводили в тех же условиях, но в инкубационную смесь вместо соответствующего фермента вносили буфер. Таким образом, искомое содержание субстрата вычисляли как разницу между результатом, полученным с использованием соответствующего фермента, и «фоном».

Используя оптимальные концентрации субстратов и кофакторов, указанные в таблице 2.2, была проведена оценка воспроизводимости. Для этого, в течение 10 дней на одних и тех же пробах лимфоцитов и клеток АКЭ осуществлялось определение соответствующих метаболитов. Вариация уровней концентрации исследуемых показателей составляла не более 3%. Правильность определения уровней концентрации субстратов и кофакторов подтверждали с помощью спектрофотометрического метода.

Таблица 2.2. – Оптимальные концентрации коферментов для определения содержания пирувата, лактата, малата, глутамата и НАД<sup>+</sup> в клетках

Субстрат	Пируват	Лактат	Малат	Глутамат	НАД <sup>+</sup>
Кофермент	НАДН	НАД <sup>+</sup>	НАД <sup>+</sup>	НАД <sup>+</sup>	Лактат
Оптimum концентрации кофермента, М	$5 \times 10^{-4}$	$5 \times 10^{-4}$	$2,5 \times 10^{-3}$	$2,5 \times 10^{-3}$	$5 \times 10^{-4}$

Различия в уровнях концентрации исследуемых метаболитов, определенных с помощью биолюминесцентного и спектрофотометрического методов, и пересчитанное на единую концентрацию клеток составляли не более 5%.

#### 2.9. Хемилюминесцентный метод исследования образования активных форм кислорода в различных тканях животных

Для проведения хемилюминесцентного анализа в кювету набирали 100 мкл гомогената исследуемых тканей содержащего  $6 \times 10^6$  клеток в 1 мл, 200 мкл  $2,2 \times 10^{-4}$  М люминола в растворе Хенкса в качестве «люминесцентного зонда». Регистрацию продуктов АФК проводили в течении 90 мин при температуре + 37°C на аппаратно-программном комплексе «Хемилюминометр CL-3604-ПЭВМ», предназначенном для измерения сверхслабых свечений биологической и физико-химической природы. Оценку хемилюминесцентных кривых проводили по амплитуде максимальной активности хемилюминесцентной реакции (I<sub>max</sub>, имп/сек).

#### 2.10. Определение содержания малонового диальдегида в различных тканях животных

Для определения содержания малонового диальдегида (МДА) использовали метод, в основе которого лежит определение окрашенных продуктов, образующихся в результате взаимодействия МДА и

гидроперекисей с 2 - тиобарбитуровой кислотой при нагревании пробы в кислой среде, которые имеют максимум поглощения в красной области видимого спектра при  $\lambda=532$  нм и 600 нм (Андреева Л.И. и др., 1988).

В ходе определения концентрации МДА к 0,2 мл исследуемого образца добавляли 0,8 мл калий-фосфатного буфера рН=7,0 и 0,5 мл 30% тетрахлоруксусной кислоты, перемешивали и оставляли на льду 1 час. Затем центрифугировали пробы в течение 15 минут при 3000 об/мин.

1 мл супернатанта переносили в сухую пробирку, добавляли 0,075 мл 0,1 М раствора ЭДТА, 0,25 мл 1% раствора тиобарбитуровой кислоты, и ставили в кипящую водяную баню на 15 минут. Затем пробирки охлаждали до комнатной температуры и измеряли поглощение при  $\lambda=532$  нм и  $\lambda=600$  нм. Расчет концентрации МДА производили по формуле:

$$C = (D_{532} - D_{600}) \cdot f / \varepsilon$$

где  $D_{532}$ —оптическая плотность при  $\lambda=532$ ;  $D_{600}$ —оптическая плотность при  $\lambda=600$ ;  $f$ —коэффициент разведения;  $\varepsilon$ --коэффициент молярной экстинкции, равный  $1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ .

## 2.11. Статистические методы исследования

По результатам исследования в пакете электронных таблиц MS Excel была сформирована база данных, на основе которой производился статистический анализ. Для полученных данных определяли среднее арифметическое значение ( $X$ ), ошибку средней арифметической ( $m$ ). Для части результатов рассчитывали медиану ( $Me$ ) и интерквартильный размах в виде 25 и 75 перцентилей ( $C_{25}$  и  $C_{75}$ ). Проверку гипотезы о статистической достоверности различий выборок проводили с помощью критерия Манна-Уитни. Для исследования силы взаимосвязей показателей вычислялся коэффициент ранговой корреляции по Спирмену (Лакин Г.Ф., 1990; Улитина Е.В. и др., 2013).



Для решения задач системного анализа использовали нейросетевой предиктор. Нейросетевой предиктор является компьютерной программой, способной к самообучению и принятию на основе него решений (Горбань А.Н., 1990). Нейросеть представляет собой совокупность нейронов (максимальное число которых соответствует числу введенных показателей + 2) и матрицей синапсов (связи между нейронами). Входные данные подаются на входные нейроны. Выходные сигналы снимаются с выходных нейронов.

Обучение нейронной сети проводится методом обратного распространения ошибки (Горбань А.Н. и др., 1998). Входными данными при обучении программы является обучающая выборка, состоящая из отдельных примеров, каждый из которых представляет собой определенный набор исследуемых параметров одного животного.

Каждому примеру в обучающей выборке для нейросетевого предиктора соответствует заранее известное действительное число (например, один из исследуемых параметров), в отношении которого и проводится обучение. Следовательно, предиктор работает как система, самостоятельно находящая функцию зависимости отклика от нескольких обучающих параметров  $Y=f(X_1, X_2, \dots, X_n)$  (Kochenov D.A., Rossiev D.A., 1993). Степень обученности нейросети характеризуется значением функции оценки, которое в процессе обучения стремится к минимуму. В процессе обучения программа способна исключать из обучающей выборки примеры, которые не вписываются в заданную классификационную или предикторную модель, что позволяет создавать новый, уточненный вариант модели.

По окончании обучения программа вычисляет информативность обучающих параметров. Для этого включаются несколько циклов обучения нейронной сети с внесением в матрицу синапсов случайного вклада после прохождения каждого цикла (Горбань А.Н. и др., 1998). Результаты статистической обработки сведены в таблицах и использованы в рисунках.

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 3.1. Кинетика смертности животных после инокуляции клеток АКЭ

Пример кинетической кривой смертности мышей после внутрибрюшинной инокуляции клеток АКЭ в количестве  $3 \times 10^6$  опухолевых клеток на одно животное представлен на рисунке 3.1.

По нашим данным, если количество инокулированных клеток АКЭ составляло  $3 \times 10^6$  на одну мышь, то животные начинали умирать в среднем на 13-е сутки, к 15-м суткам смертность достигала 20 %, к 24-м суткам опухолевого роста – 100 %.

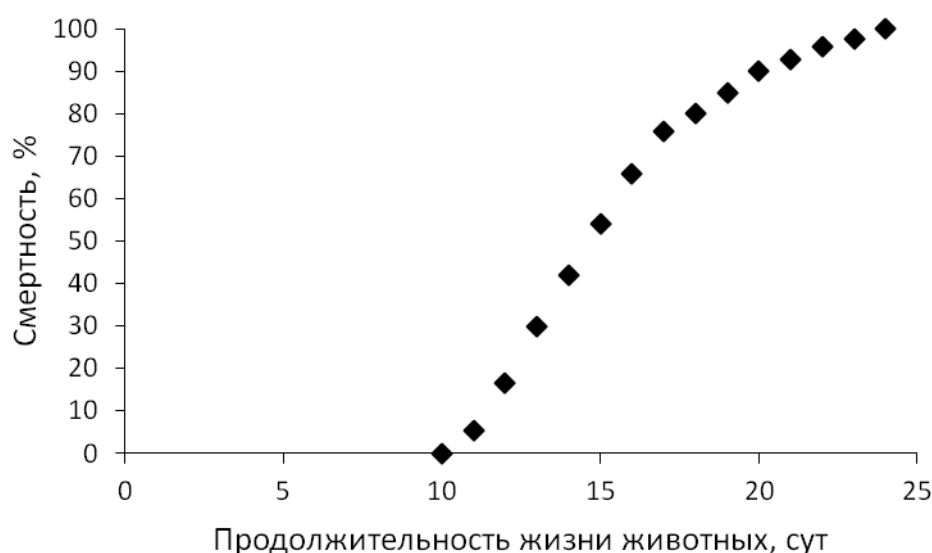


Рисунок 3.1 – Кинетическая кривая смертности мышей с АКЭ при внутрибрюшинном введении  $3 \times 10^6$  опухолевых клеток

Такое большое количество вводимых опухолевых клеток гарантировано обеспечивает развитие опухоли, что приводит к смерти лабораторного животного. В целях приближения условий эксперимента к условиям спонтанного возникновения опухоли в организме, были использованы меньшие количества клеток АКЭ (рисунок 3.2).

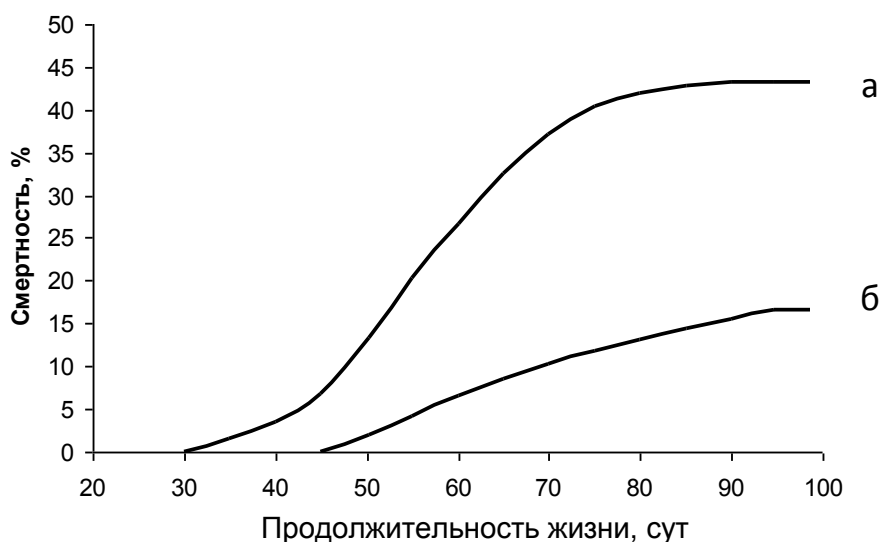


Рисунок 3.2 – Кинетическая кривая смертности мышей при введении  $1 \times 10^4$  (а) и  $4 \times 10^2$  (б) клеток АКЭ. Получено в соавт. с Е.В. Слеповым.

Как следует из данных, представленных на рисунке 3.2 а, при введении  $1 \times 10^4$  клеток АКЭ смертность животных с признаками опухоли в данном опыте составила 43 %, а период наибольшей смертности наблюдался с 45 по 70 сут после прививки опухоли. По истечении 100 сут после прививки опухоли оставшиеся животные выводились из эксперимента путем дислокации шейных позвонков, после чего проводилось их вскрытие для исследования на наличие опухоли в организме. У всех животных, доживших до 100 сут, опухоль отсутствовала.

При введении  $4 \times 10^2$  клеток АКЭ смертность животных в связи с ростом опухоли составила 17 %, первые случаи гибели животных наблюдались через 45 сут после инокуляции опухолевых клеток, кривая смертности носила сглаженный характер (рисунок 3.2 б).

Таким образом, было исследовано влияние различных количеств вводимых в организм подопытных животных опухолевых клеток, на динамику и уровень их смертности. Показано, что используя разные дозы вводимых клеток АКЭ, можно регулировать динамику и уровень смертности в группе подопытных животных, в целях создания различных кинетических моделей опухолевого роста.

### 3.2. Особенности обмена веществ в лимфоцитах крови мышей с АКЭ после инокуляции $3 \times 10^6$ опухолевых клеток

Лимфоциты играют ведущую роль в борьбе организма с раковой опухолью. При этом реализация клетками иммунной системы своих функциональных возможностей в большой степени зависит от характера протекания в них обменных процессов (Козлов В.А. и др., 2009; Савченко и др., 2011). В то же время, опухоль способна оказывать влияние на клетки многих тканей организма и в том числе, на клетки иммунной системы, причем интенсивность этого влияния может быть связана с размерами опухоли и, таким образом, со скоростью и продолжительностью ее роста (Viola, Bronte, 2007; Rabinovich G.A. et al., 2007). Большой интерес представляет решение вопроса о том, в какой степени лимфоциты крови, и в частности, протекающие в них процессы обмена веществ, оказываются подвержены влиянию со стороны опухоли.

Как следует из данных, представленных на рисунке 3.3, активность НАДИЦДГ лимфоцитов крови мышей с АКЭ не претерпевает сколько-нибудь значимых изменений в динамике опухолевого роста за исключением 13-х сут, когда активность фермента несколько повышается по отношению к 5-м, 7-м и 11-м сут.

Необходимо отметить, что реакция, катализируемая НАДИЦДГ, наряду с цитратсинтазой, относится к наиболее медленным этапам ЦТК и может лимитировать общую скорость потока метаболитов через цикл (Северин Е.С., 2011). Следовательно, результатом постоянства активности НАДИЦДГ на большем протяжении опухолевого роста может являться постоянство скорости прохождения субстратов через ЦТК по крайней мере на данном участке. В свою очередь, увеличение активности фермента на позднем этапе опухолевого процесса свидетельствует о возможности усиления интенсивности реакций ЦТК.

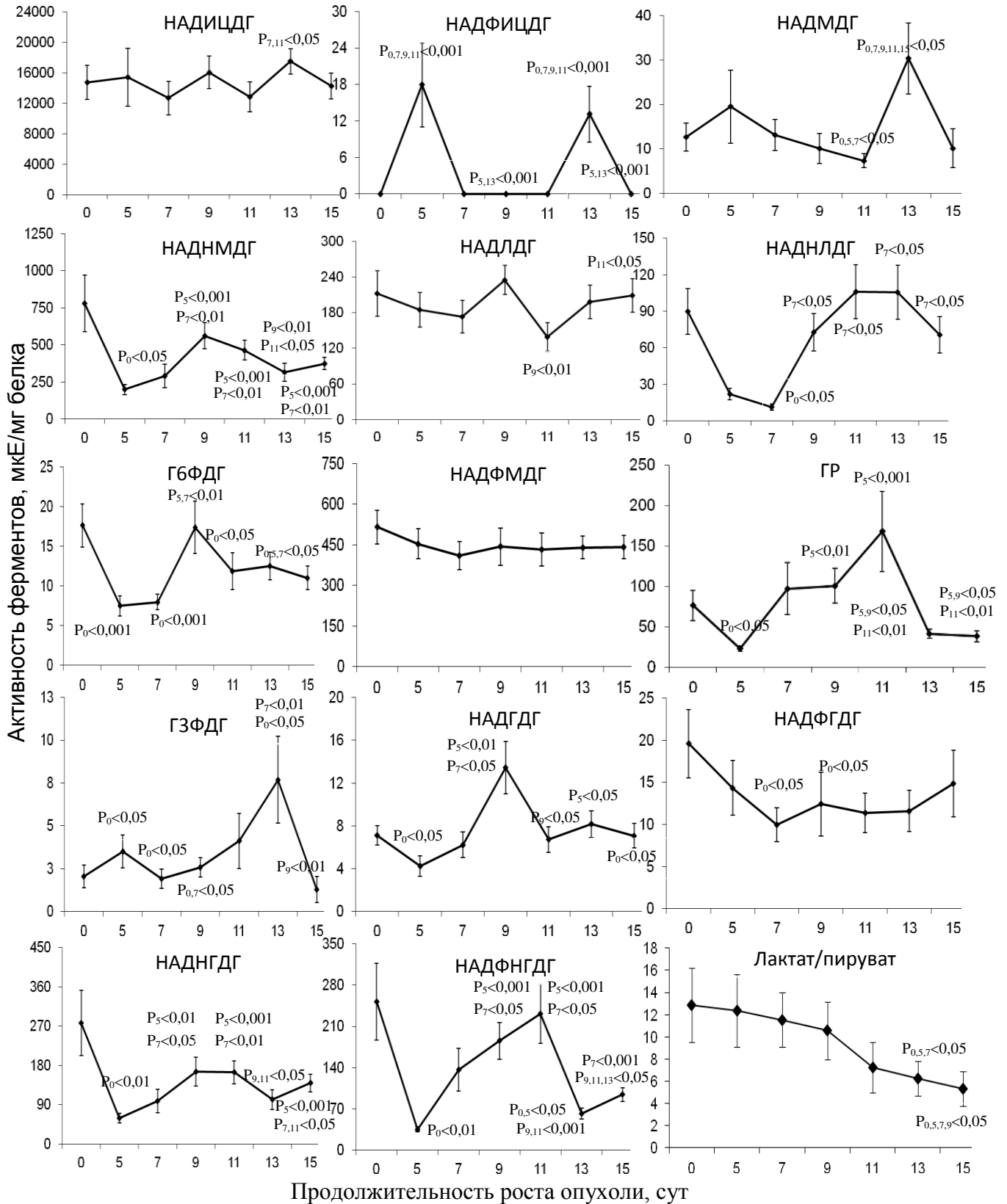


Рисунок 3.3 – Активность НАД(Ф) – зависимых дегидрогеназ и соотношение концентраций лактата и пирувата в лимфоцитах крови у мышей с АКЭ в процессе роста опухоли. Получено в соавт. с Е.Ю. Фоменко.

Из данных литературы следует, что важнейшим фактором регуляции скорости субстратного потока через ЦТК является внутримитохондриальное соотношение концентраций восстановленной и окисленной форм НАД. Это обстоятельство определяется сильным ингибирующим эффектом, которое оказывает НАДН на активность НАДИЦДГ (Chen J.Q. et al., 2009).

Рост концентрации окисленной формы НАД, наблюдаемый на позднем этапе опухолевого роста (рисунок 3.4), косвенно свидетельствует о понижении содержания в клетках восстановленной формы этого кофактора и таким образом выявляет одну из возможных причин увеличения активности НАДИЦДГ на 13-е сут роста АКЭ. Очевидно, что в случае снижения скорости дыхания лимфоцитов в митохондриях происходило бы накопление НАДН, что вызывало бы ингибирование фермента и скорей всего способствовало бы снижению концентрации окисленной формы никотинового кофактора.

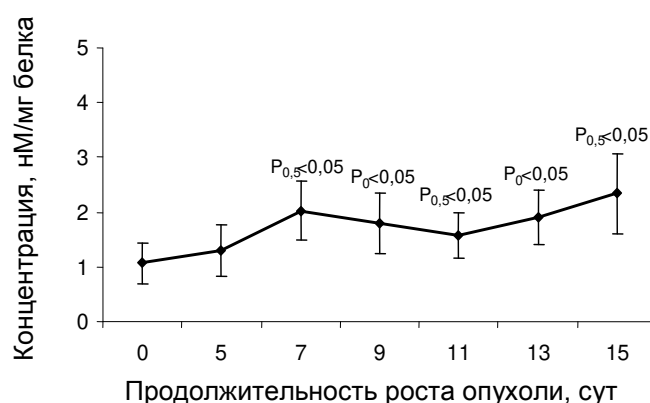


Рисунок 3.4 – Концентрация НАД<sup>+</sup> в лимфоцитах периферической крови мышей с АКЭ в процессе роста опухоли. Получено в соавт. с Е.Ю. Фоменко.

Когда речь идет о результатах определения активности фермента *in vitro*, в реакционной среде, во многом оптимизированной по химическому составу для конкретного фермента, действие обратимых внутриклеточных ингибиторов или активаторов в значительной мере ослаблено. Поэтому, очевидно, что важнейшим фактором, определяющим изменения ферментативной активности, регистрируемые в реакционной системе *in vitro*,

является количество фермента в клетке. В свою очередь, данный показатель зависит от соотношения скоростей синтеза и распада белковых молекул, от периода полужизни конкретного фермента или молекул соответствующих ему мРНК. Таким образом, можно предположить, что наблюдаемое нами в динамике опухолевого роста снижение активности того или иного фермента может быть обусловлено снижением общего белкового синтеза в клетке или уменьшением, вследствие воздействия экстремальных факторов опухолевого процесса, времени его жизни.

Помимо отдельного описания полученных экспериментальных данных важно выявить взаимосвязи между исследованными показателями обмена веществ. В частности, дополнительную информацию дают результаты корреляционного анализа, в который включены данные по активности исследованных нами ферментов и измеренные нами концентрации субстратов лимфоцитов в процессе роста АКЭ (рисунок 3.5).

Так, обращает на себя внимание то обстоятельство, что для активности НАДИЦДГ характерен минимум корреляций с другими исследованными ферментами. На протяжении почти всего периода роста АКЭ сохраняется прямая корреляция НАДИЦДГ с МДГ, что, очевидно, связано с ролью этих ферментов в ЦТК. При этом для НАД<sup>+</sup> наибольшее количество корреляций характерно на 15-е сут роста опухоли, т.е. в терминальный период болезни. Причем уровень НАД<sup>+</sup> в это время имеет прямые корреляции даже с активностью НАДФ-зависимых ферментов. По-видимому, в это время в клетках развиваются тяжелые нарушения окислительно-восстановительных процессов.

Как показывают результаты исследования, активность НАДФИЦДГ лимфоцитов периферической крови мышей с АКЭ характеризуется наличием двух пиков, наблюдаемых на 5-е и 13-е сут опухолевого роста. В остальное время использованная методика определения активности фермента не дала значимо отличных от нуля результатов (рисунок 3.6).

## Интактные животные

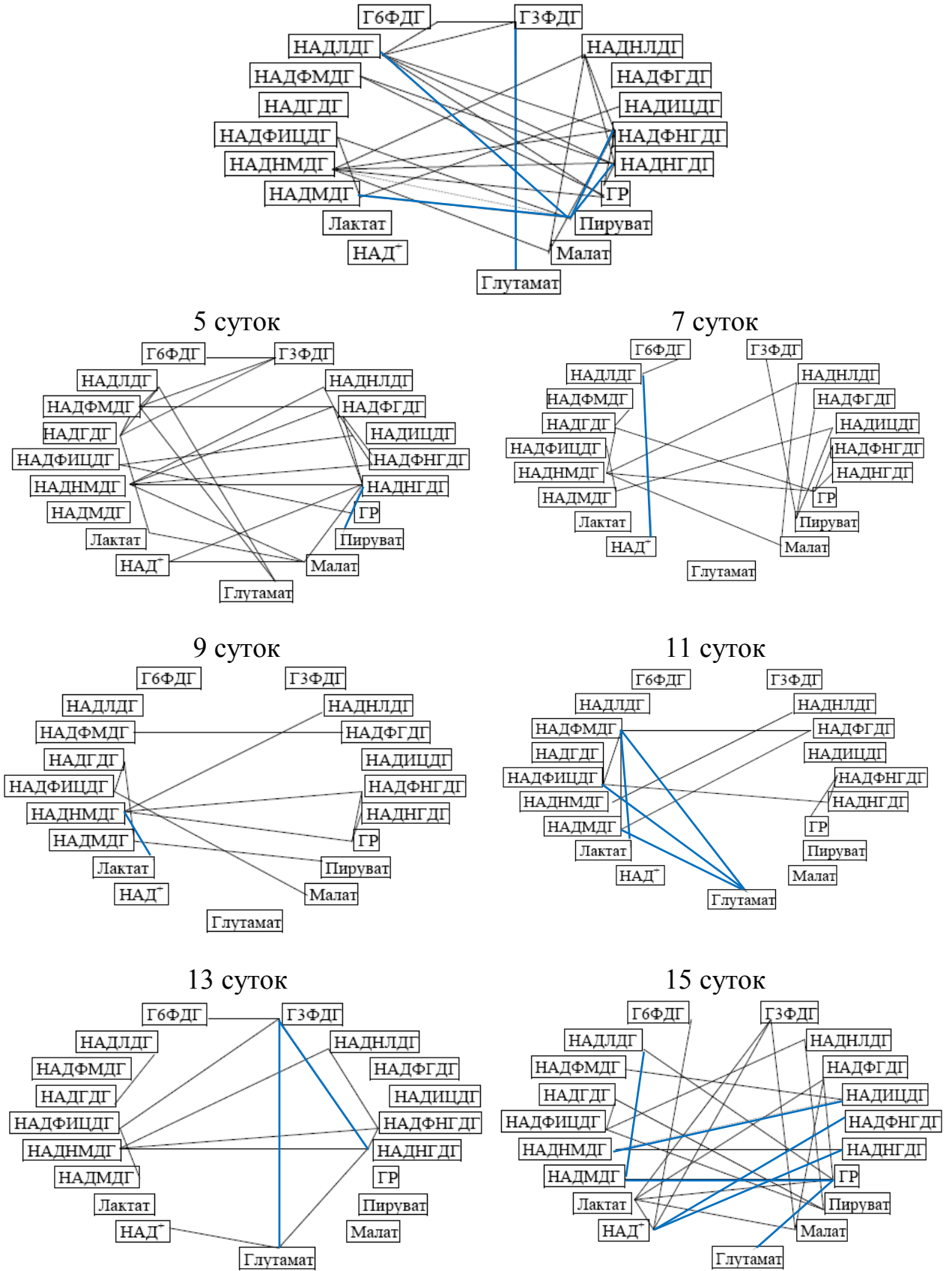


Рисунок 3.5 – Результаты корреляционного анализа, лимфоциты в процессе роста АКЭ. Примечание: черным обозначены положительные корреляции, голубым – отрицательные корреляции. Получено в соавт. с Е.Ю. Фоменко.



Известно, что в геноме всех эукариот содержится гены трех изоформ ИЦДГ. Ген ИЦДГ 3 кодирует митохондриальную НАД-зависимую изоцитратдегидрогеназу, НАДИЦДГ, о которой говорилось выше и которая принимает участие в ЦТК. Активность этого фермента возрастает под действием  $\text{Ca}^{2+}$ , АДФ и цитрата, тогда как ингибиторами активности выступают АТФ, НАДН и НАДФН (Denton R.M., 2009). Два других гена кодируют изоферменты ИЦДГ 1 и ИЦДГ 2, которые являются, соответственно, цитозольной и митохондриальной формами НАДФИЦДГ (Reitman Z.J., Yan H., 2010). При этом НАДИЦДГ необратимо декарбоксилирует изоцитрат в  $\alpha$ -кетоглутарат, тогда как НАДФИЦДГ осуществляют обратимую реакцию декарбоксилирования изоцитрата в  $\alpha$ -кетоглутарат с восстановлением НАДФ<sup>+</sup> до НАДФН, либо восстановительное карбоксилирование  $\alpha$ -кетоглутарата в изоцитрат с окислением НАДФН до НАДФ<sup>+</sup> (Smolkova K., Jezek P., 2012).

В силу своей, преимущественно немитохондриальной 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 НАДФИЦДГ может включаться в ЦТК в качестве вспомогательного фермента, катализирующего образование  $\alpha$ -кетоглутарата. Известно, что ингибиторами НАДФИЦДГ являются НАДФН, НАДН и АТФ (Chen J.Q. et al., 2009). Возможно, низкие значения активности фермента объясняются наличием в соответствующие периоды опухолевого роста в цитоплазме лимфоцитов повышенных концентраций некоторых из перечисленных ингибиторов. Тогда как резкий рост активности на 5-е и 13-е сут может быть связан как раз с необходимостью включения этого фермента в ЦТК. Это заключение, по крайней мере в отношении 13-х сут опухолевого роста, хорошо согласуется с представленными выше данными, касающимися концентрации НАД<sup>+</sup>, а также полностью подтверждается результатами корреляционного анализа, согласно которым на 5-е и 13-е -сут роста АКЭ

наблюдается прямая корреляция активности НАДФИЦДГ с активностью ферментов ЦТК, а именно, с НАДИЦДГ на 5-е сут ( $r=0,50$ ,  $p<0,05$ ) и с НАДМДГ 13-е сут роста АКЭ.

Как следует из полученных экспериментальных данных, активность другого фермента ЦТК, а именно МДГ, для НАД-зависимой реакции превращения малата в оксалоацетат, не претерпевала достоверных изменений до 11-х сут опухолевого роста включительно. Однако на 13-е сут происходило резкое увеличение активности фермента с последующим возвращением к прежним уровням активности на 15-е сут. В то же время активность НАДНМДГ снижается уже к 5-м сут роста опухоли, оставаясь на низком уровне и на 7-е сут. К 9-м сут активность фермента для реакции превращения оксалоацетата в малат увеличивается и затем вновь снижается к концу эксперимента (рисунок 3.3).

Поскольку МДГ является ферментом малат-аспартатного шунта, функция которого заключается в транспорте восстановленных никотинамидных коферментов в митохондрии, колебания активности МДГ должны приводить и к соответствующим колебаниям интенсивности транспорта восстановленных коферментов в митохондрии.

Концентрация малата в лимфоцитах возрастает на 9-е сут роста опухоли (рисунок 3.6). Начиная с интактных животных и до 7-х сут роста опухоли включительно, наблюдаются прямые корреляционные взаимосвязи уровня малата в лимфоцитах и активности НАДНМДГ ( $r=0,62$ ,  $p<0,01$ ;  $r=0,54$ ,  $p<0,05$ ;  $r=0,46$ ,  $p<0,05$  для контрольной группы, 5-х и 7-х сут соответственно), что свидетельствует об адекватном уровне вовлеченности данного субстрата в энергетический обмен клетки. К 9-м сут вместо корреляционной взаимосвязи малата с НАДНМДГ, возникает связь с НАДФИЦДГ. Начиная с 11-х сут корреляций содержания МДГ в клетках с активностью ферментов, так или иначе вовлеченных в ЦТК, не наблюдается, что, по-видимому, свидетельствует о развитии нарушений в функционировании цикла.

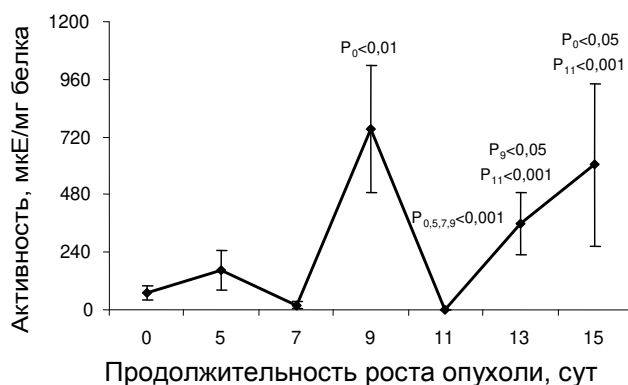


Рисунок 3.6 – Концентрация малата в лимфоцитах периферической крови мышей с АКЭ в процессе роста опухоли. Получено в соавт. с Е.Ю. Фоменко.

На 15-е сут роста АКЭ обращает на себя внимание возникновение прямой корреляционной связи малата и лактата ( $r=0,81$ ,  $p<0,001$ ). Причем для обоих этих субстратов также характерны прямые взаимосвязи с уровнем активности ГЗФДГ ( $r=0,89$ ,  $p<0,001$  для малата;  $r=0,62$ ,  $p<0,05$  для лактата) и НАДФГДГ ( $r=0,81$ ,  $p<0,001$  для малата;  $r=0,63$ ,  $p<0,05$  для лактата). По-видимому, в совокупности с общим возрастанием количества корреляций на 15-е сут роста АКЭ, это является свидетельством нарушения регуляции обмена веществ, что проявляется, в частности, в рассогласованности функционирования гликолиза и аэробного энергетического обмена, а также в нарушении баланса между катаболическими и анаболическими процессами в клетке.

Таким образом, данные по изменению активности НАДИЦДГ, НАДФИЦДГ и МДГ позволяют заключить, что факторы опухолевого процесса не оказывают ингибирующего влияния на функционирование ЦТК лимфоцитов периферической крови вплоть до терминального периода болезни, когда в клетках развиваются нарушения в регуляции метаболических процессов.

Дополняют картину об изменениях реакций, связанных с энергетическим обменом, данные по изменению активности ЛДГ (рисунок 3.3).

Они показывают, что активность фермента для прямой реакции снижается к 11-м сут роста опухоли, возвращаясь к исходным значениям к 15-м сут. В то же время изменения активности НАДНЛДГ весьма существенны. Так, к 7-м сут наблюдается снижение активности фермента, после чего к 9-м сут активность возрастает и сохраняется на высоких уровнях до 15 сут включительно.

Известно, что ЛДГ в основном функционирует в клетке в тетрамерной форме, обладающей большей активностью по сравнению с другими четвертичными формами фермента. В то же время, действие различных физических и химических факторов способствует диссоциации тетрамеров, в частности, на димеры. Димеры также обладают каталитической активностью, но по данным литературы, преимущественной функциональной ролью димерной формы ЛДГ является восстановление пирувата, в то время как для тетрамерной формы характерна в основном реакция окисления лактата (Артюхов В.Г. и др., 1997).

Исходя из этого можно сделать предположение что одним из факторов, обуславливающих смещение равновесия между окислительным и восстановительным направлениями работы фермента, является изменение соотношения тетрамерных и димерных форм ЛДГ, возникающее вследствие воздействия на клетки экстремальных факторов онкологического процесса. Кроме того, повышенные концентрации лактата и пирувата, а также НАДН, могут оказывать ингибирующее влияние на ЛДГ (Северин Е.С., 2011).

В этой связи интересной представляется оценка изменения концентраций лактата и пирувата в лимфоцитах в процессе роста АКЭ. Эти данные представлены на рисунке 3.7.

Как следует из полученных нами данных, концентрация лактата в лимфоцитах мышей снижается к 7 сут, возрастает к 9-м и вновь снижается после 11 сут, достигая минимальных значений на 15-е сут.

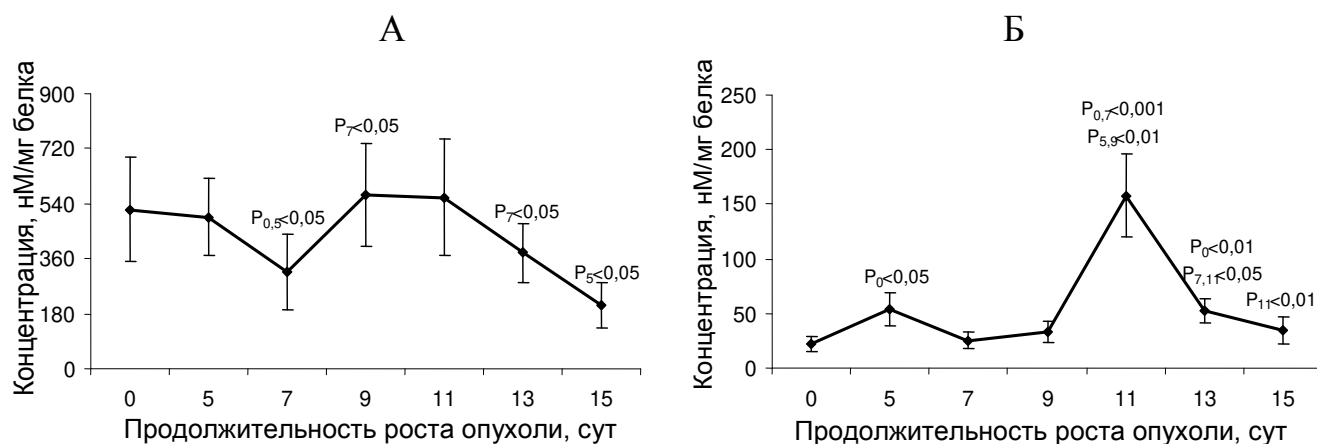


Рисунок 3.7 – Концентрация лактата (А) и пирувата (Б) в лимфоцитах периферической крови мышей с АКЭ в процессе роста опухоли.

Получено в соавт. с Е.Ю. Фоменко.

Снижение концентрации лактата в позднем периоде опухолевого роста по-видимому связано с активацией в это время аэробных путей энергетического обмена, что подтверждается приведенными выше нашими данными в отношении активности ферментов ЦТК, НАДФИЦДГ и концентрации НАД<sup>+</sup>. В этой связи не совсем понятным представляется резкий скачок концентрации пирувата на 11-е сут опухолевого роста. Правда, исходя из наших же данных, основной рост интенсивности аэробных реакций энергетического обмена наблюдается после 11-х сут роста АКЭ.

Соответствующие этому изменения в динамике опухолевого роста наблюдаются и для соотношения концентраций лактата и пирувата в лимфоцитах, показанных выше на рисунке 3.3.

По данным литературы, значение этого параметра зависит в основном от скорости НАДН-зависимой лактатдегидрогеназной реакции и может косвенно свидетельствовать о соотношении концентраций НАДН и НАД<sup>+</sup> в клетке (Kashiwagi A. et al., 1997). Как видно из представленных данных, его значение снижается в течение всего исследованного периода, что может свидетельствовать о высокой интенсивности утилизации НАДН клеткой, в частности, в аэробных реакциях энергетического обмена. Это заключение

находится в полном соответствии с представленными выше (рисунок 3.4) данными по содержанию окисленной формы НАД<sup>+</sup> в клетках.

Наибольшее количество корреляционных взаимосвязей ЛДГ, лактат и пируват образуют с другими исследованными нами ферментами и субстратами в лимфоцитах интактных животных, а также на 5-е сут опухолевого роста и, затем, на 15-е сут роста АКЭ. Причем характер взаимосвязей на 15-е сут роста АКЭ сильно отличается от корреляций в контрольной группе и на 5-е сут эксперимента. Если в лимфоцитах интактных животных преобладают корреляционные связи пирувата с ферментами энергетического обмена, такими как НАДЛДГ ( $r=-0,47$ ,  $p<0,05$ ), НАДМДГ ( $r=0,55$ ,  $p<0,01$ ), НАДНМДГ ( $r=-0,54$ ,  $p<0,05$ ) и НАДФИЦДГ ( $r=0,62$ ,  $p<0,01$ ), то на 15-е сут роста АКЭ пируват и лактат образуют корреляционные связи преимущественно с НАДФ-зависимыми ферментами пластического обмена. В частности, характерные для лактата корреляции с ГЗФДГ ( $r=0,62$ ,  $p<0,05$ ), НАДФГДГ ( $r=0,63$ ,  $p<0,05$ ) и ГР ( $r=0,54$ ,  $p<0,05$ ).

Такая динамика свидетельствует о выраженном изменении характера метаболизма лимфоцитов в терминальный период болезни по сравнению с лимфоцитами интактных животных и животных на более ранних стадиях роста АКЭ. В частности, можно говорить о возникновении условий для усиленного вовлечения субстратов энергетического обмена в пластический обмен клетки. Возможно, это явление имеет адаптационный характер, способствуя восстановлению утраченных пластических ресурсов клетки, но в то же время, имеет негативное значение для энергетических реакций, сокращая количество доступных для них метаболических ресурсов. В целом такая ситуация, по-видимому, должна приводить к разбалансировке между реакциями энергетического и пластического направлений обмена.

При этом наиболее значительное уменьшение числа корреляционных связей ЛДГ, пирувата, лактата и НАД<sup>+</sup> с другими исследованными ферментами и субстратами происходит на 9-е и 11-е сут роста АКЭ, что свидетельствует о критическом характере названного временного периода.

Полученные данные также показывают, что активность Г6ФДГ лимфоцитов снижается к 5 сут после инокуляции опухолевых клеток, увеличивается на 9 сут, и вновь снижается (рисунок 3.3).

Известно, что с изменением активности Г6ФДГ сопряжен ряд патологий (Nkhoma E.T. et al., 2009; Lee J.W. et al., 2011; Carrai G. et al., 2011). По данным литературы, Г6ФДГ является иницирующим ферментом ПФП и повышение его активности может свидетельствовать об активизации этого метаболического пути и перераспределении части глюкозы с энергетических нужд клетки на пластические процессы. В результате деятельности ферментов ПФП, в том числе Г6ФДГ, в больших количествах образуется НАДФН, необходимый для регенерации восстановленного глутатиона – важного эндогенного антиоксиданта (Stanton R.C., 2012).

Увеличение активности Г6ФДГ при ряде экстремальных воздействий, коррелирующее с повышением в клетке концентрации НАДФН и GSH, дает возможность сделать вывод об адапционном характере активизации ПФП в условиях действия экстремального фактора. Кроме того, так как одним из продуктов ПФП является рибозо-5-фосфат, активация ПФП увеличивает способность клетки к синтезу нуклеотидов и, возможно, нуклеиновых кислот, в частности, РНК, необходимой для активизации белкового синтеза (Tong X. et al., 2009; Xu Y. et al., 2010; Zhang Z. et al., 2010; Perl A. et al., 2011; Cosentino C. et al., 2011).

Обнаруженное нами снижение активности Г6ФДГ на начальном этапе опухолевого роста может свидетельствовать о возможном снижении эффективности антиоксидантной защиты клеток и об отсутствии в клетках предпосылок для активизации пластических процессов. Сходную с Г6ФДГ роль поставщика НАДФН выполняет и другой цитоплазматический фермент НАДФМДГ (Северин Е.С., 2011).

Как показали наши исследования активность этого фермента не претерпевала значимых изменений в ходе эксперимента (рисунок 3.3).

На рисунке 3.3 также представлена динамика изменений активности ГР. Как видно из представленных данных, на 5-е сут опухолевого процесса зафиксировано снижение активности фермента, после чего наступает фаза роста активности ГР, которая продолжается до 11 дня. На 13 день опухолевого роста отмечено значительное падение уровня активности фермента. На всем протяжении терминальной стадии уровень активности фермента остается на стабильно низком уровне.

Как известно, ГР катализирует регенерацию ГSH, важного эндогенного антиоксиданта (Ballatori N. et al., 2009; Marí M. et al., 2009; Zhao Y. et al., 2009; Kilburn L. et al., 2010). Глутатиону и ферментам метаболизма глутатиона принадлежит особая роль в обеспечении функционирования клеток иммунной системы (Dong W. et al., 2010; Fisher G. et al., 2011; Shah D. et al., 2011). Недостаток глутатиона в лимфоцитах приводит к нарушению их функциональных реакций, в частности, реакции бласттрансформации на митогенные лектины. Высокая значимость глутатиона для клеток связана с его участием в обеспечении нормальных процессов синтеза нуклеиновых кислот, реализации эффектов экзогенных тиолов (Dobis D.R. et al., 2008; Named Y.B. et al., 2012). Недостаток глутатиона, снижение активности ферментов его метаболизма, приводят к повышению уровня АФК и других реактивных метаболитов, воздействующих на клеточные макромолекулы (Oldenburg J. et al., 2007; Lee S.H. et al., 2010).

Для реакции восстановления окисленного глутатиона и функциональных реакций клетки важнейшее значение имеет активность Г6ФДГ. Так, у людей с врожденной ферментопатией Г6ФДГ, скорость реакции бласттрансформации значительно замедляется (Рагимов А.А., Байрамалибейли И.Э., 1985). Обнаружена прямая зависимость между геногеографией наследственного дефицита Г6ФДГ и распространенностью туберкулеза легких (Инсанов А.Б. и др., 1993). Обследование пациентов, инфицированных вирусом иммунодефицита человека, показало снижение активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ), НАДФ-оксидазы и



малатдегидрогеназы в лимфоцитах крови, а также увеличение уровня СДГ и Г6ФДГ (Пастушенков В.Л. и др., 1990; Митин Ю.А. и др., 1992).

Очевидно, что уменьшение активности ГР, обнаруженное в нашей работе, снижает способность клетки противостоять процессам свободнорадикального окисления биомакромолекул, развивающихся в результате экстремального воздействия. Это еще более увеличивает потребность клетки в развитии метаболических механизмов, способных содействовать восстановлению поврежденных клеточных структур.

Об изменениях в распределении субстратов между пластическим и энергетическим направлениями обмена говорит обнаруженное нами повышение активности ГЗФДГ, регистрируемое с 9 по 13-е сут эксперимента (рисунок 3.3). Так как ГЗФДГ катализирует превращение глицерол-3-фосфатата, предшественника, либо продукта распада триацилглицеролов, в диоксиацетонфосфат, тем самым, вовлекая его в гликолиз, данные по активности этого фермента позволяют определить характер взаимоотношений между липидным и энергетическим обменом.

Кроме того, ГЗФДГ является ферментом глицерофосфатного челночного механизма (Kelly T.J. et al., 2011). Необходимость в работе этого механизма определяется тем, что НАДН, образующийся в цитоплазме, самостоятельно не может проникать в митохондрии. Функция глицерофосфатного челночного механизма заключается в переносе водорода с образованного в цитоплазме НАДН на флавиновый кофермент, который, в свою очередь, на уровне КоQ вводит приобретенные им вместе с водородом электроны в дыхательную цепь (Северин Е.С., 2011; Mráček T. et al., 2013).

Исходя из полученных данных, с 9 по 13-е сут опухолевого роста вовлечение глицерол-3-фосфата в энергетический обмен клетки возрастает. Очевидно, это создает условия для повышения интенсивности энергетического обмена.

Также очевидно, что в результате повышения активности ГЗФДГ может повышаться и интенсивность работы глицерофосфатного челночного

механизма (Kelly T.J. et al., 2011), вследствие чего поток протонов от НАДН из цитоплазмы в митохондриальный компартмент возрастает. Последнее обстоятельство, по сути, является дополнительным подтверждением предположения о повышении в этот период интенсивности реакций энергетического обмена в клетке. Резкое падение активности ГЗФДГ наблюдается к 15-м сут опухолевого роста. По-видимому, к этому времени возможности для повышения интенсивности энергетического обмена в клетках за счет перетока субстратов от реакций липидного обмена исчерпываются.

Корреляционная связь между уровнем активности ГР и НАДФМДГ в лимфоцитах животных контрольной серии свидетельствует о важности НАДФМДГ как фермента, воспроизводящего НАДФН. Разрыв этой связи после появления в организме опухолевых клеток и отсутствие корреляций ГР с Г6ФДГ в течение всего периода развития заболевания свидетельствует об отсутствии зависимости активности ГР от НАДФН, воспроизводимого в ПФП.

Наличие положительных взаимосвязей ГЗФДГ с Г6ФДГ в контрольной группе и на 5-е и 13-е сут роста АКЭ ( $r=0,75$ ,  $p<0,001$ ,  $r=0,53$ ,  $p<0,05$ ,  $r=0,41$ ,  $p<0,05$  соответственно), на фоне роста активности ГЗФДГ на 5-е и 13-е сут, по-видимому, отражает роль ПФП как источника субстратов для реакций пластического обмена, в том числе и НАДФН как элемента защиты клеток от действия АФК, что позволяет клетке снизить поток субстратов на восстановление поврежденных липидов клеточных мембран и направить часть пластических ресурсов от синтетических реакций липидного обмена к реакциям энергетического обмена.

Наличие корреляции НАДФМДГ с ГЗФДГ на 7-е сут роста АКЭ ( $r=0,45$ ,  $p<0,05$ ) и НАД<sup>+</sup> с ГЗФДГ на 15-е сут ( $r=0,69$ ,  $p<0,01$ ) подтверждает это предположение, а связи НАДФМДГ с НАДЛДГ в лимфоцитах контрольной группы ( $r=0,63$ ,  $p<0,01$ ) и на 5-е сут роста АКЭ ( $r=0,57$ ,  $p<0,01$ )

характеризуют взаимодействие аэробного и анаэробного путей получения энергии.

На стыке между энергетическим и пластическим направлениями обмена находятся также НАДГДГ и НАДФГДГ, обеспечивающие поступление в ЦТК субстратов с аминокислотного обмена в виде  $\alpha$ -кетоглутарата. В ходе обратных реакций, катализируемых этими дегидрогеназами, из аммония и  $\alpha$ -кетоглутарата синтезируется глутаминовая кислота. Таким образом, оценивая активность данных ферментов для прямой и обратной реакций можно оценить интенсивность субстратного потока с ЦТК на аминокислотный обмен и обратно. Данные по активности этих ферментов также представлены на рисунке 3.3.

Из полученных данных следует, что к 5-м сут роста АКЭ происходит снижение активности НАД-зависимой ГДГ для прямой и обратной реакций после чего, к 9-м сут, наблюдается рост активности фермента для обоих направлений. Далее синхронность изменений активности нарушается. Активность ГДГ для НАД-зависимой реакции уменьшается к 11 сут, тогда как активность для НАДН-зависимой реакции остается неизменной. В дальнейшем, на 13 и 15 сут сут активность НАДГДГ не изменяется, а активность НАДНГДГ испытывает колебания, снижаясь к 13-м сут и затем несколько увеличиваясь к 15-м сут.

Активность НАДФГДГ снижается к 7-м сут роста опухоли и в дальнейшем не испытывает значимых изменений, тогда как активность фермента для НАДФН-зависимой реакции испытывает значительные по амплитуде колебания, сильно снижаясь к 5-м сут, возрастая до интактных значений на 11-е сут и вновь снижаясь к 13-м сут.

Таким образом, к 5-м – 7-м сут после инокуляции опухолевых клеток происходит общее снижение активности глутаматдегидрогеназ и как следствие возникают условия для замедления обмена глутаматом между реакциями белкового обмена и ЦТК. Это подтверждается результатами

исследования концентрации глутамата в лимфоцитах в процессе роста опухоли, представленных на рисунке 3.8.

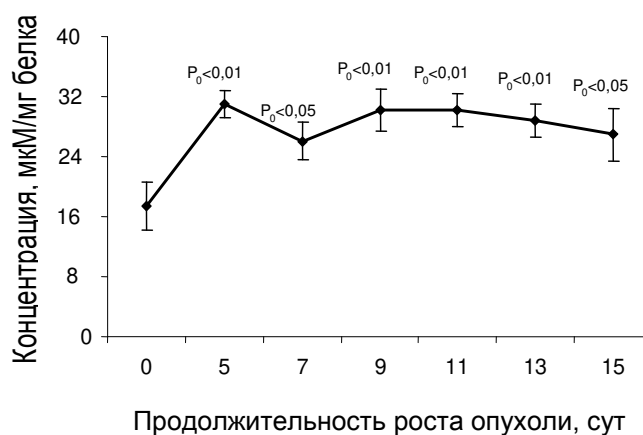


Рисунок 3.8 – Концентрация глутамата в лимфоцитах периферической крови мышей с АКЭ в процессе роста опухоли.

Получено в соавт. с Е.Ю. Фоменко.

Как видно из представленных данных, концентрация глутаминовой кислоты возрастает в лимфоцитах уже к 5-м сут роста АКЭ и остается на достигнутом уровне в течение всего исследованного периода. Очевидно, это свидетельствует о низкой востребованности этого субстрата реакциями ЦТК а возможно, и реакциями синтеза белков, что говорит об общем снижении интенсивности метаболизма лимфоцитов.

Это подтверждается и появлением отрицательных корреляционных связей между концентрацией глутамата и уровнем ферментов, вовлеченных в энергетический обмен, НАДФИЦДГ ( $r=-0,58$ ,  $p<0,01$ ) и МДГ ( $r=-0,70$ ,  $p<0,001$ ) на 13-е сут опухолевого роста, и прямые коррелции с уровнем НАДНГДГ( $r=0,43$ ,  $p<0,05$ ) и концентрацией НАД<sup>+</sup> ( $r=0,41$ ,  $p<0,05$ ) также на 13-е сут.

Будучи вовлеченными в важнейшие реакции клеточного метаболизма, все 4 фермента обмена глутамата образуют в процессе роста АКЭ значительное количество корреляционных взаимосвязей. Так, уровень НАДФГДГ коррелирует с НАДФМДГ лимфоцитов контрольной группы

( $r=0,53$ ,  $p<0,05$ ) и на 5-е ( $r=0,55$ ,  $p<0,05$ ), 9-е ( $r=0,50$ ,  $p<0,05$ ) и 11-е ( $r=0,63$ ,  $p<0,01$ ) сут роста АКЭ, а также с НАДМДГ на 11-е сут ( $r=0,74$ ,  $p<0,001$ ).

Активность НАДГДГ коррелирует с ГЗФДГ на 5-е сут роста опухоли ( $r=0,57$ ,  $p<0,01$ ); с ЛДГ на 5-е ( $r=0,50$ ,  $p<0,05$ ) и 13-е ( $r=0,53$ ,  $p<0,01$ ) сут; с НАДФМДГ на 5-е ( $r=0,56$ ,  $p<0,05$ ) и 7-е сут ( $r=0,53$ ,  $p<0,05$ ); с НАДФИЦДГ на 9-е ( $r=0,67$ ,  $p<0,01$ ), 11-е ( $r=0,67$ ,  $p<0,001$ ) и 15-е ( $r=0,64$ ,  $p<0,05$ ) сут; с МДГ на 9-е сут ( $r=0,64$ ,  $p<0,01$ ). Наличие данных связей, также как и в случаях описанных выше, может объясняться в той или иной степени вовлеченностью реакций описываемых ферментов в энергетический обмен лимфоцитов. Об этом говорит и наличие корреляции уровня НАДНЛДГ с НАДФГДГ на 5-е сут роста опухоли ( $r=0,74$ ,  $p<0,001$ ).

Обнаружена корреляционная взаимосвязь НАДГДГ с ГР на 7-е сут роста АКЭ ( $r=0,47$ ,  $p<0,05$ ), которая характеризует значимость антиоксидантных реакций для нормального осуществления потока субстратов между реакциями ЦТК и аминокислотного обмена, а также взаимосвязь содержания глутамата с ГР на 15 день опухолевого процесса ( $r=-0,55$ ,  $p<0,05$ ).

Большое количество корреляционных связей, образуемых ферментами обмена глутамата, свидетельствуют о важности субстратного взаимодействия реакций энергетического обмена и обмена аминокислот. Очевидно, что в экстремальных условиях существования клеток на первое место встает вопрос обеспечения ресурсами различных метаболических путей клетки, и возможность вовлечения одних и тех же ресурсов, как в энергетический обмен, так и в синтетические реакции, может обуславливать появление конкуренции за ресурсы между различными направлениями обмена.

Выявленные нами многочисленные корреляционные связи концентраций субстратов и активности ферментов на разных этапах роста АКЭ отражают сложность взаимосвязей различных субстратных потоков внутри клетки. Очевидно, что любые изменения интенсивности работы тех

или иных метаболических путей оказывают влияние на характер протекания всех других биохимических процессов в клетке. Вместе с тем, в соответствии с концепцией корреляционной адаптометрии, возможно выделение нескольких интегральных характеристик, таких, например, как количество корреляционных связей, точнее, изменение их количества, по мере развития патологии (Захарова Л.Б. и др., 1989).

Анализ лейкоцитарной формулы крови мышей показал значительное снижение процентного содержания лимфоцитов крови при симметричном росте процентного содержания сегментоядерных нейтрофилов, что показано на рисунке 3.9.

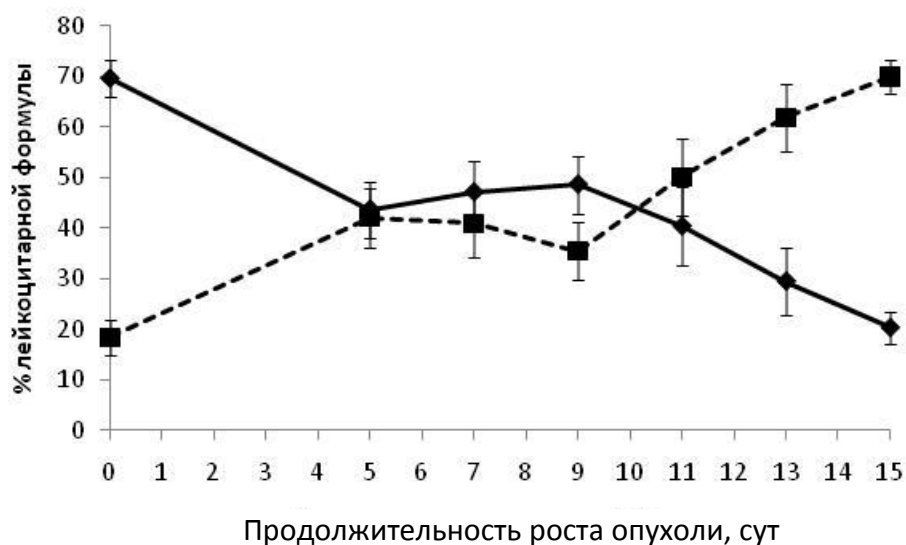


Рисунок 3.9 – Содержание лимфоцитов (сплошная линия) и сегментоядерных нейтрофилов (пунктирная линия) в процентах лейкоцитарной формулы в периферической крови мышей с АКЭ в процессе роста опухоли.

Наблюдаемый перекрест лейкоцитарной формулы свидетельствует о развитии системных эффектов опухоли, которые усиливаются в течение всего исследованного периода. Следовательно, выявленные метаболические изменения в лимфоцитах происходят на фоне изменений морфологической картины крови.

Вместе с этим, как следует из данных, представленных на рисунке 3.10, в процессе роста опухоли, в крови увеличивается содержание МДА, что является свидетельством усиления в организме интенсивности процессов перекисного окисления липидов. Периоды роста уровня МДА в крови совпадают с началом фазы логарифмического роста АКЭ (5-е – 7-е сут) и с терминальной стадией болезни (13-е – 15-е сут).

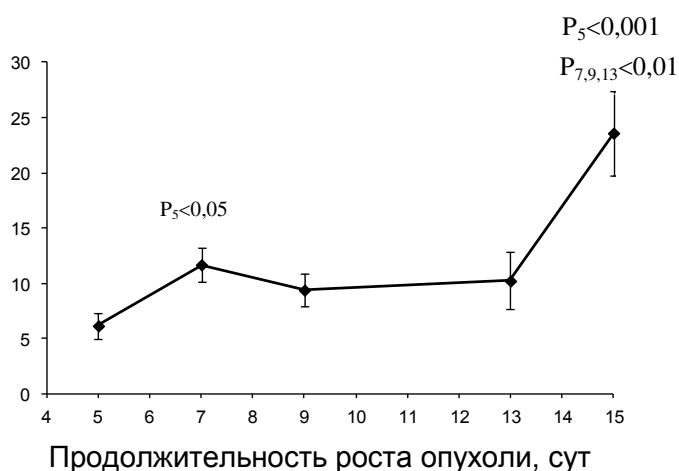


Рисунок 3.10 – Содержание МДА в периферической крови мышей с АКЭ в процессе роста опухоли.

Очевидно, что в эти временные периоды происходит усиление перекисных процессов в организме и проявляется функциональная недостаточность систем антиоксидантной защиты клеток. Это соответствует и данным по снижению активности ГР и Г6ФДГ лимфоцитов в те же периоды, представленным выше.

Корреляционный анализ позволяет расширить понимание полученных результатов, однако причинно-следственные характеристики взаимоотношений между исследованными параметрами остаются не выявленным. Вместе с тем, в последнее время стало достаточно популярным использование нейросетевого анализа, позволяющего среди множества факторов выявлять наиболее значимые, давая им при этом количественную оценку (Горбань А.Н., Россиев Д.А., 1996). В частности, используя методы нейросетевой предикции можно выявить ферменты, изменение активности

которых приводит к изменению концентрации пирувата, субстрата, являющегося связующим звеном множества метаболических путей. Проводя данные исследования в процессе роста опухоли можно дать более точную оценку происходящим в лимфоцитах метаболическим изменениям на различных стадиях опухолевого роста.

Так, на рисунке 3.11 представлена средняя информативность исследуемых метаболических параметров в процессе роста АКЭ. Обучение нейросетевого классификатора осуществляли на 3-х нейронах, после чего подсчитывали информативность показателей. Было вывлнено, что вариабельность введенных параметров приводит к вариациям величин информативности, в связи с чем рассчитывали среднюю величину информативности при обучении 10 нейросетей для каждой модели.

Было обнаружено, что в лимфоцитах мышей контрольной группы наиболее значимыми являются уровни НАДФИЦДГ, ЛДГ и НАДНГДГ (рисунок 3.11 А), что, очевидно, связано с адекватным распределением метаболитов, энергетических и пластических ресурсов в клетках. На 5-е сут роста опухоли (рисунок 3.11 Б) наиболее информативны уровни активности ферментов энергетического обмена - НАДФИЦДГ, НАДИЦДГ, НАДНЛДГ, что может быть связано с возрастанием потребности клеток в энергии и изменениями во взаимодействии аэробного и анаэробного путей получения энергии.

На 7-е сут опухолевого роста наиболее информативными показателями становятся ЛДГ, НАДНМДГ и ГР (рисунок 3.11 В), что может быть связано с дальнейшим усилением потребности лимфоцитов в энергии и защите от действия АФК. На 9-е сут роста АКЭ наибольшей информативностью обладают МДГ, Г6ФДГ, НАДИЦДГ (рисунок 3.11 Г), на 11-е сут – НАДМДГ, НАДНЛДГ, Г6ФДГ (рисунок 3.11 Д), что отражает сохранение наибольшей значимости в этот период реакций энергетического обмена, а также ПФП.



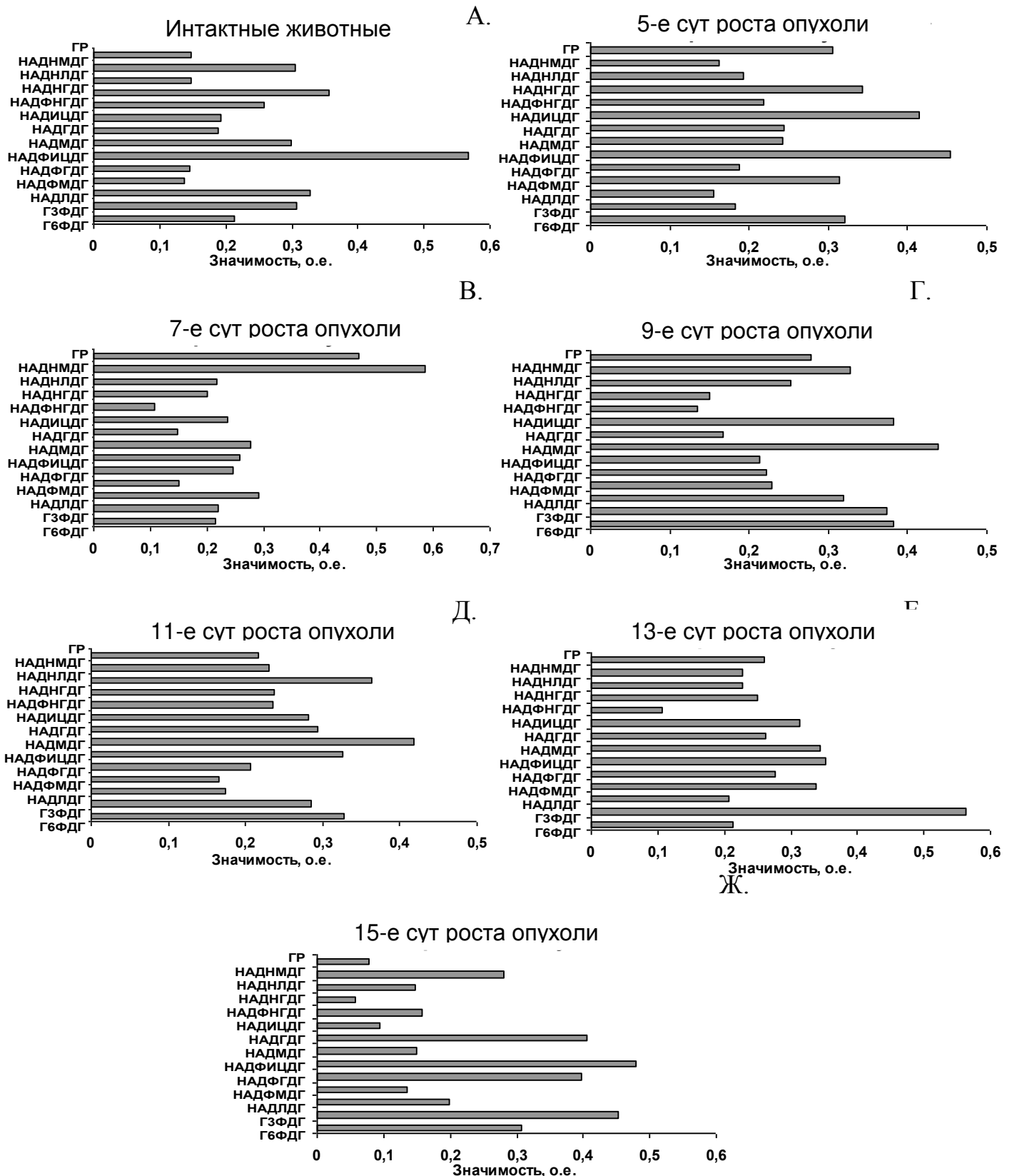


Рисунок 3.11 – Значимость НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ лимфоцитов мышей в модели нейросетевого предиктора уровня пирувата в динамике опухолевого процесса. Получено в соавт. с Е.Ю. Фоменко.

Возможно, что повышенная значимость ПФП связана с его функцией поставщика НАДФН для восстановительных защитных реакций.

Из данных рисунка 3.11 Е следует, что на 13-е сут опухолевого роста наиболее значимыми показателями, отражающими изменения содержания пирувата, становятся НАДФИЦДГ, НАДМДГ и ГЗФДГ, что, в свою очередь, отражает как значение реакций энергетического обмена, так и реакций метаболизма липидов.

На 15-е сут роста АКЭ наиболее информативными становятся НАДФИЦДГ, ГЗФДГ и ГДГ (рисунок 3.11 Ж). Как известно, НАДФИЦДГ является вспомогательным для ЦТК, выполняющим ту же функцию, что и НАДИЦДГ. Причем в нормальных условиях его роль, в качестве участника ЦТК, сравнительно мала. То обстоятельство, что среди всех исследованных нами ферментов энергетического обмена, наиболее значимым для реакций метаболизма лимфоцитов оказался НАДФИЦДГ, говорит, очевидно, о том, что в условиях роста опухоли в организме животного, для лимфоцитов наиболее важной является возможность усиления роли аэробного метаболизма за счет мобилизации всех подходящих для этого ресурсов, включая работу вспомогательных ферментов.

Выше было описано, что активность НАДИЦДГ практически не меняется на протяжении всего исследованного периода. Нет явно выраженного направления изменений активности НАДМДГ, которое бы прослеживалось на протяжении всего времени эксперимента. При этом рост активности НАДФИЦДГ происходил только на 5-е и 13-е сут роста опухоли при минимальной активности фермента в другие периоды. Исходя из этого, можно заключить, что повышенная информативность НАДФИЦДГ связана как с низким уровнем активности самого фермента на большем протяжении роста АКЭ, так и с большой потребностью клетки в энергии и, соответственно, с необходимостью вовлечения в реакции энергетического обмена вспомогательных механизмов.

Таким образом, динамика значимости отдельных ферментов характеризуется высоким уровнем информативности в лимфоцитах контрольной группы мышей ЛДГ и фермента периаминирования НАДНГДГ, далее, в фазе логарифмического роста опухоли более значимыми становятся ферменты ЦТК НАД- и НАДФ-зависимые ИЦДГ, МДГ, а также Г6ФДГ, фермент ПФП, что, по-видимому, связано с повышением интенсивности метаболизма и перераспределением субстратных потоков при адаптации к действию негативных факторов опухолевого процесса. В терминальной стадии сохраняется высокая информативностью ферментов ЦТК и Г3ФДГ, что может быть связано с потерей организмом глюкозы, в результате чего Г3ФДГ метаболизирует ТАГ до ДА-3-Ф, который, в свою очередь, может направляться в гликолиз, и, следовательно, влиять на концентрацию пирувата.

Несмотря на то, что нейросетевой предиктор выявлял уровни значимости ферментов по отношению к уровню пирувата, активность НАДЛДГ и НАДНЛДГ на обладает высокой информативностью, хотя пируват и является метаболитом данного фермента. Можно предполагать, это объясняется тем, что для уровня пирувата в данном случае наиболее значимым является интенсивность его расходования в метаболических процессах клетки, а не уровень его образования и, соответственно, интенсивности функционирования гликолиза.

Подитоживая все вышесказанное, можно отметить, что в течение лаг-фазы роста опухоли возникают условия для значительного снижения интенсивности ПФП. В свою очередь, это должно отражаться на пластических процессах и реакциях защиты клетки от действия АФК, в которых в качестве кофермента используется НАДФН, а также на уровне синтеза нуклеозидов и нуклеотидов как следствие снижения синтеза рибозы в ПФП. При этом аэробный гликолиз в лимфоцитах играет ведущую роль в энергетическом обмене, вовлекая в реакции образования АТФ субстраты липидного обмена, в частности Г3Ф.

Интенсивность ЦТК, согласно полученным данным, на протяжении всей лаг-фазы сохраняется на неизменном уровне. При этом наблюдается снижение активности глутаматдегидрогеназ, и следовательно, происходит ослабление связи между реакциями ЦТК и обмена аминокислот. Снижение интенсивности малатаспартатного шунта, которое, нашим данным, может происходить в это время вследствие уменьшения уровня активности МДГ, до некоторой степени компенсируется за счет увеличения уровня транспорта НАДН в глицерофосфатном челночном механизме, судя по росту на 5-е сут активности ГЗФДГ.

Период с 9-х по 11-е сут, т.е. период окончания фазы экспоненциального роста клеточной популяции АКЭ, характеризуется значительными изменениями метаболизма лимфоцитов. Возрастает интенсивность ПФП, усиливается поступление в гликолиз ДОАФ. Активность исследованных ферментов ЦТК в лимфоцитах остается на уровне, соответствующем уровню у интактных мышей однако, поток субстратов из ЦТК в аминокислотный обмен происходит более интенсивно, чем во время лаг-фазы. Вследствие роста активности МДГ и ГЗФДГ и, таким образом, создания условий для увеличения активности малат-аспартного и глицерофосфатного челночных механизмов, растет при этом интенсивность транспорта НАДН на внутреннюю мембрану митохондрий. Максимальный уровень активности ГР наблюдается на 11-е сут после прививки АКЭ, что позволяет говорить о возникновении в лимфоцитах в это время условий для усиления защиты от действия АФК, тогда как высокие уровни значимости Г6ФДГ в модели нейросетевого предиктора на 11-е и 13-е сут роста АКЭ свидетельствуют о возросшей потребности клеток в НАДФН.

В терминальную стадию болезни в лимфоцитах наблюдается возникновение условий для повышения роли анаэробного метаболизма, при увеличении потока в гликолиз ГЗФ от реакций липидного обмена, снижение уровня защиты клеток от АФК вследствие снижения активности Г6ФДГ и ГР. Однако стабилизация, и рост на 15-е сут, количества корреляционных

связей, говорит о сохранении систем регуляции клеточного метаболизма в функциональном состоянии. Полученные результаты можно систематизировать в виде схемы, представленной в таблице 3.1.

Таблица 3.1. – Метаболические механизмы патогенетических изменений лимфоцитов в процессе роста опухоли у мышей после инокуляции  $3 \times 10^6$  клеток АКЭ

Фаза роста АКЭ	Метаболические особенности	Патогенетическое значение
Лаг-фаза	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ гликолиз</li> <li>↑ ЦТК</li> <li>↑ Поток ГЗФ в гликолиз</li> <li>↑ Глицерофосфатный челночный механизм</li> <li>↓ ПФП</li> <li>↓ Активность глутаматдегидрогеназ</li> <li>↓ ГР</li> </ul>	<p>Возникновение условий для усиления воспроизводства энергии.</p> <p>Адаптация клеток к действию факторов канцерогенеза небольшой интенсивности.</p>
Лог-фаза	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ гликолиз</li> <li>↑ Поток ГЗФ в гликолиз</li> <li>↑ Глицерофосфатный челночный механизм</li> <li>↑ ПФП</li> <li>↑ ГР</li> <li>↑ Активность глутаматдегидрогеназ</li> </ul>	<p>Увеличение интенсивности энергетических и пластических процессов</p> <p>Повышение уровня защиты клеток от АФК.</p> <p>Адаптация клеток к усилению действия факторов канцерогенеза.</p>
Терминальная фаза	<ul style="list-style-type: none"> <li>↓ ПФП</li> <li>↓ ЦТК</li> <li>↓ ГР</li> <li>↑ Поток ГЗФ в гликолиз (исключая 15-е сут)</li> <li>↓ Глицерофосфатный челночный механизм</li> <li>↑ Анаэробный гликолиз</li> </ul>	<p>Ослабление роли аэробного метаболизма и усиление роли анаэробного метаболизма.</p> <p>Снижение уровня защиты клеток от АФК.</p> <p>Срыв адаптации клеток.</p>

Получено в соавт. с Е.Ю. Фоменко.

Необходимо отметить, что подобные изменения метаболизма, связанные с развитием адаптационных и дезадаптационных процессов в лимфоцитах, были отмечены и в других исследованиях.

Так, у больных немелкоклеточным раком легкого в лимфоцитах крови происходит уменьшение активности анаэробных и аэробных энергетических процессов, коррелирующее с увеличением размеров опухоли. В частности, происходит примерно двукратное уменьшение активности НАДИЦДГ, НАДМДГ, НАДНМДГ, в несколько раз снижается активность НАДНЛДГ (Лапешин П.В. и др., 2005).

Также было обнаружено, что при развитии метастазов рака шейки матки, в лимфоцитах циркулирующего пула обнаружено снижение активности ферментов ЦТК и гликолиза по сравнению с такими же показателями у больных без метастазов. Проведение антиметастатической химиотерапии, в этом случае, способствует увеличению активности сукцинатдегидрогеназы и эффективности функционирования ЦТК (Калабанова Е.А. и др., 2011).

Развернутая и терминальная стадии хронического миелолейкоза характеризуется снижением в лимфоцитах интенсивности гликолиза, ЦТК, митохондриального транспорта, катаболизма липидов, уровня антиоксидантной защиты по сравнению с лимфоцитами здоровых людей, что также сопровождается развитием иммунодефицитного состояния (Смирнова О.В. и др., 2007).

В работе (Савченко А.А., Манчук В.Т., 2003) было показано, что адаптация организма человека к условиям Крайнего Севера сопровождается активацией аэробных энергетических процессов лимфоцитов. В дальнейшем, при переходе к долговременной адаптации, уровень энергетических процессов в клетках постепенно снижается. Однако, в случае срыва адаптации, наблюдается ингибирование энергетических процессов лимфоцитов и нарушаются взаимосвязи различных метаболических процессов в клетках, что сопровождается возникновением

иммунодефицитного состояния. Похожие изменения выявлены и в метаболизме лимфоцитов крови у подростков с хроническими вирусными гепатитами (Соловьева И.А. и др., 2011).

Исследование активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ и концентраций ключевых субстратов лимфоцитов крови больных истинной аллергией и псевдоаллергией показало рост интенсивности реакций ПФП, гликолиза и ЦТК. Было установлено, что в лимфоцитах обеих групп обследуемых концентрация АТФ зависит, прежде всего, от уровня интенсивности реакций ЦТК. При этом у больных истинной аллергией изменение уровня АТФ в лимфоцитах крови определяется, преимущественно, НАД-зависимыми дегидрогеназами ЦТК, тогда как у лиц с псевдоаллергией, вспомогательными и шунтирующими реакциями (Савченко А.А., Смирнова О.В., 2001; Савченко А.А. и др., 2002).

Обнаружено, что врожденный дефицит ферментов пуринового обмена аденозиндезаминазы, пуриннуклеозидфосфорилазы и 5'-нуклеотидазы, проявляется в виде первичного комбинированного иммунодефицита, поражающего Т- и В-лимфоциты. При этом лимфоциты больных не поддаются стимуляции митогенами или антигенами *in vitro* (Савченко А.А., Борисов А.Г., 2012).

В литературе также существуют данные, согласно которым биогенез митохондрий и следовательно, усиление аэробных процессов в клетках, а также усиление защиты клеток от повреждений АФК, является условием выживания клеток при воздействии неблагоприятных факторов (Calabrese V. et al., 2010; Tew K.D., Townsend D.M., 2012).

Увеличение активности Г6ФДГ в условиях развития окислительного стресса рассматривается как защитная клеточная реакция, так как способствует возрастанию уровня НАДФН и как следствие, приводит к увеличению уровня восстановленного глутатиона в клетке (Xu Y. et al., 2010; Stanton R.C., 2012).

Таким образом, исходя из анализа приведенных данных, обнаруженные нами особенности метаболизма лимфоцитов крови мышей, показанные в таблице 3.1, можно рассматривать в качестве закономерностей неспецифических изменений обмена веществ в условиях развития патологических процессов и адаптации (либо срыва адаптации) при воздействии неблагоприятных факторов.

### 3.3. Особенности обмена веществ в лимфоцитах крови мышей с АКЭ после инокуляции $1 \times 10^4$ опухолевых клеток

Экспериментальные исследования в области онкологии сопряжены с рядом трудностей, одной из которых является подбор адекватной модели опухолевого роста *in vivo*. В классической экспериментальной модели в случае перевиваемых опухолей в организм животных вводится значительное количество (порядка  $1 \times 10^6$  и более) клеток опухоли, в результате чего заболеваемость составляет 100 %, а опухолевый рост характеризуется большой скоростью (Эмануэль Н.М., 1977; Эмануэль Н.М., 2006). При этом невозможно получить адекватного представления о ранних стадиях опухолевого роста, поскольку в организме сразу оказывается большое количество опухолевых клеток, что не происходит в реальных условиях канцерогенеза.

В данном исследовании мы вводили в организм животного значительно меньшие количества клеток опухоли. При этом смертность составила 43 %, а продолжительность жизни заболевших животных была значительно больше, чем в классической модели. Это позволило приблизить условия проводимого нами эксперимента к тем условиям, которые соответствуют спонтанному возникновению опухоли в организме. В таблице 3.2. представлены результаты исследований активности ферментов лимфоцитов животных, погибших, при наличии опухолевой суспензии в брюшной полости, в интервале от 30-х до 45-х суток после введения клеток АКЭ.



Таблица 3.2. – Активность НАД- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ лимфоцитов погибших до 45-х сут мышей с АКЭ в процессе роста опухоли при дозе вводимой опухоли  $1 \times 10^4$  клеток на 1 животное

Фермент	Активность до инокуляции клеток АКЭ N=60 Me (C25; C75)	Активность через 30 суток после инокуляции клеток АКЭ N=57 Me (C25; C75)	Достоверность различий
НАДИЦДГ	3,675 (0,215; 4,001)	3,01 (0,001; 3,563)	
НАДФИЦДГ	0,649 (0,619; 0,805)	9,023 (4,682; 15,211)	p<0,001
НАДМДГ	4,064 (3,427; 5,112)	20,744 (7,128; 38,512)	p<0,01
НАДНМДГ	132,694 (78,786; 213,51)	0,001 (0; 0,401)	p<0,001
НАДЛДГ	0,492 (0,001; 0,495)	3,242 (2,51; 6,111)	p<0,05
НАДНЛДГ	44,684 (0,001; 87,518)	0,001 (0; 0,004)	p<0,001
Г6ФДГ	0,49 (0,20; 0,52)	10,11 (7,61; 20,05)	p<0,01
НАДФМДГ	1,722 (0,882; 3,015)	5,36 (4,77; 11,01)	
ГР	8,467 (0,001; 12,567)	35,782 (26,631; 72,018)	p<0,05
ГЗФДГ	0,244 (0,001; 0,251)	1,032 (0,001; 1,086)	p<0,01
НАДГДГ	10,448 (8,821; 11,021)	35,348 (23,152; 73,447)	p<0,05
НАДНГДГ	23,118 (2,69; 41,018)	0,001 (0; 0,002)	p<0,001
НАДФГДГ	2,232 (0,001; 2,803)	2,632 (0,003; 2,97)	
НАДФНГДГ	290,4 (261,2; 535,2)	56,072 (48,401; 63,015)	p<0,01

Получено в соавт. с Е.В. Слеповым.

Как следует из представленных данных, в лимфоцитах животных этой группы к 30-м сут снижается активность НАДНМДГ, НАДНГДГ, НАДНЛДГ, и НАДФНГДГ. Активность НАДИЦДГ, НАДФГДГ и НАДФМДГ к 30-м сут не изменяется. Активность ГЗФДГ, НАДЛДГ, НАДМДГ, Г6ФДГ, ГР, НАДФИЦДГ и НАДГДГ к этому времени повышается.

Учитывая роль данных ферментов в метаболизме клеток можно предположить, что к 30-м сут после инокуляции клеток АКЭ в лимфоцитах мышей возникают условия для увеличения активности гликолиза и антиоксидантной системы, с перераспределением части субстратного потока от реакций липидного и аминокислотного обмена в реакции анаэробного обмена углеводов, включая пентозо-фосфатный путь. Очевидно, что такое перераспределение не обеспечивает адекватного сочетания интенсивности энергетических и пластических процессов, приводя к расходованию ресурсов в низкоэффективном анаэробном энергетическом обмене. По-видимому, это обстоятельство способно определять пониженную функциональность лимфоцитов и как следствие, пониженную выживаемость животных.

Другую группу составили животные, которые умерли с признаками развившейся опухоли с 45 по 60 сут после инокуляции клеток АКЭ. Так, на рисунке 3.12 показаны изменения активности НАДИЦДГ и НАДФИЦДГ в динамике указанного периода.

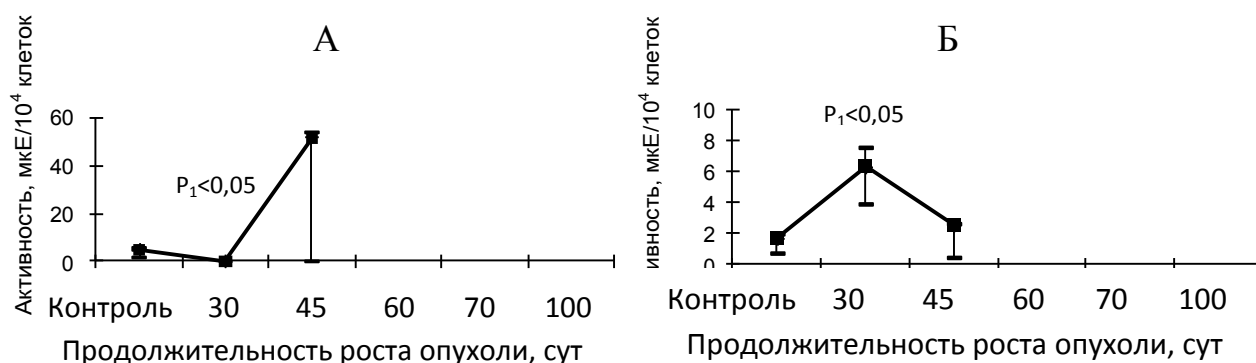


Рисунок 3.12 – Активность НАДИЦДГ (А) и НАДФИЦДГ (Б) в лимфоцитах крови мышей, погибших с 45-х до 60-е сут после инокуляции клеток АКЭ при дозе вводимой опухоли  $1 \times 10^4$  клеток на 1 животное.

Получено в соавт. с Е.В. Слеповым.

Как следует из представленных данных, активность НАДИЦДГ возрастает к 45-м сут, т.е. при приближении к времени гибели животных. Учитывая лимитирующую роль данного фермента в ЦТК можно сделать вывод о возникновении к этому времени в лимфоцитах условий для активизации субстратного потока по циклу. При этом активность НАДФИЦДГ, несколько возрастая к 30-м сут, ко времени гибели животных снижается до исходных значений. Таким образом, данный фермент в это время не играет вспомогательной роли в реакциях ЦТК.

На рисунке 3.13 показаны данные по изменению активности НАДМДГ и НАДНМДГ в лимфоцитах крови мышей, погибших с 45 по 60 сут после инокуляции клеток АКЭ. Как видно из данных рисунков, активность НАДМДГ значительно не изменяется в динамике исследованного периода и, таким образом, не оказывает влияния на интенсивность субстратного потока через ЦТК на уровне данного фермента. В тоже время активность фермента для НАДН-зависимой реакции значительно снижается по сравнению с интактным периодом данных животных.

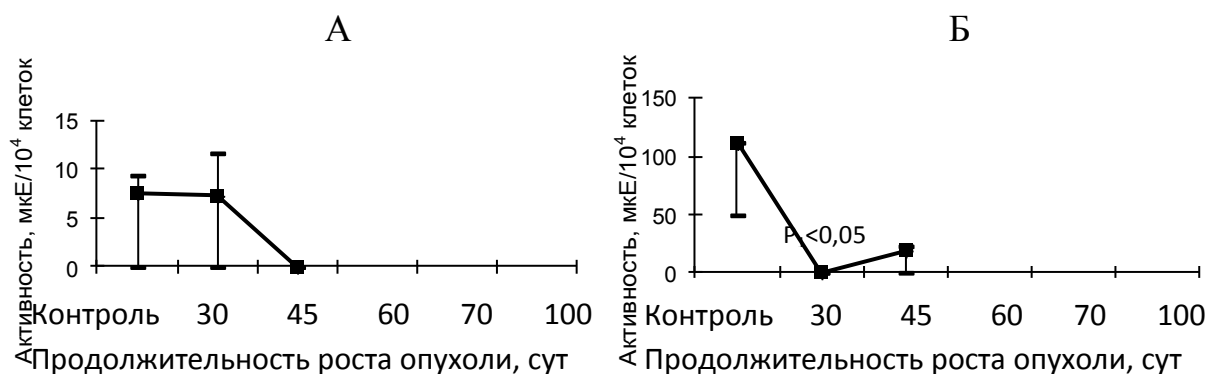


Рисунок 3.13 – Активность НАДМДГ (А) и НАДНМДГ (Б) в лимфоцитах крови мышей, погибших с 45-х до 60-е сут после инокуляции клеток АКЭ при дозе вводимой опухоли  $1 \times 10^4$  клеток на 1 животное.

Получено в соавт. с Е.В. Слеповым.

Поскольку МДГ является одним из важнейших ферментов ЦТК и участвует в регуляции субстратного потока по циклу (Северин Е.С., 2011),

повышение активности МДГ для обратной реакции, т.е. для превращения оксалоацетата в малат, при неизменной активности МДГ для прямой реакции будет смещать равновесие в сторону образования малата, что вызовет замедление субстратного потока по ЦТК.

Важную информацию могут дать данные по активности лактатдегидрогеназы, терминального фермента гликолиза, который по сути определяет соотношение интенсивности анаэробного и аэробного катаболизма глюкозы. Как следует из данных, представленных на рисунке 3.14 активность фермента для реакции превращения лактата в пируват возрастает к 30-м сут и сохраняется на достигнутом уровне до 45-х сут, т.е. до периода гибели животных.

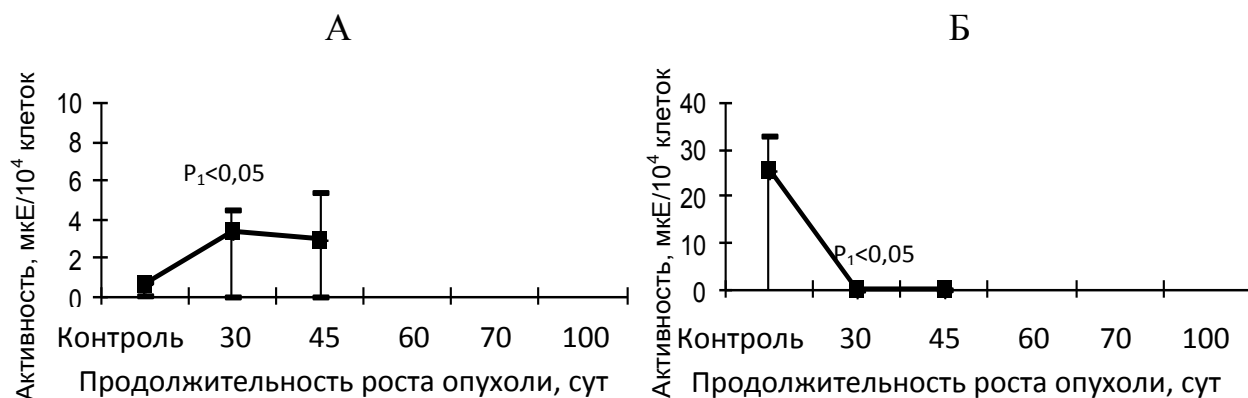


Рисунок 3.14 – Активность НАДЛДГ (А) и НАДНЛДГ (Б) в лимфоцитах крови мышей, погибших с 45-х до 60-е сут после инокуляции клеток АКЭ при дозе вводимой опухоли  $1 \times 10^4$  клеток на 1 животное.

Получено в соавт. с Е.В. Слеповым.

При этом динамика активности фермента для обратной реакции имеет противоположный вид, его активность снижается от уровня лимфоцитов интактных животных к 30-м сут и сохраняется на почти нулевом уровне до 45-х сут исследуемого периода.

Сопоставляя эти результаты с описанными ранее результатами по динамике активности ферментов ЦТК ИЦДГ и МДГ можно сделать вывод, что рост активности НАДЛДГ к 30-м сут не сопровождается ростом

возможностей ЦТК по использованию пирувата, а точнее продукта его окислительного декарбоксилирования ацетил-КоА, что может приводить к накоплению пирувата и необходимости затраты дополнительных ресурсов на его утилизацию. Правда, Ацетил-КоА может быть использован в реакциях биосинтеза жирных кислот (Северин Е.С., 2011), что могло бы быть благоприятным фактором для клеток в условиях окислительного повреждения липидов (Vamesq J. et al., 2012; Aggarwal N.T., Makielski J.C., 2013) или при реализации ими своих функциональных реакций.

Очевидно, что данное обстоятельство не реализуется в лимфоцитах животных данной группы, так как происходящие в лимфоцитах метаболические изменения не способны обеспечить повышенный уровень защиты от факторов опухолевого процесса, о чем свидетельствует гибель данных животных в качестве исхода заболевания.

Вместе с тем, как следует из данных, представленных на рисунке 3.15, активность Г6ФДГ несколько снижается к 30-м сут эксперимента, не возрастая достоверно к 45-м сут.

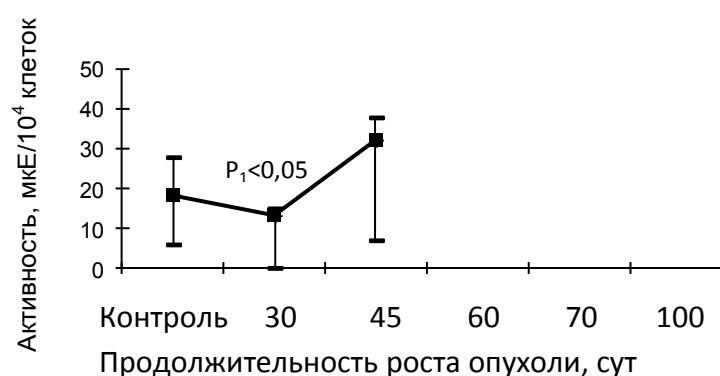


Рисунок 3.15 – Активность Г6ФДГ в лимфоцитах крови мышей, погибших с 45-х до 60-е сут после инокуляции клеток АКЭ при дозе вводимой опухоли  $1 \times 10^4$  клеток на 1 животное. Получено в соавт. с Е.В. Слеповым.

Учитывая роль Г6ФДГ как инициирующего фермента ПФП, понижение его активности, наблюдаемое нами, может свидетельствовать о

замедлении потока субстратов по этому метаболическому пути, и следовательно, об уменьшении интенсивности потока глюкозы с энергетических клеточных процессов на пластические процессы.

Поскольку в результате деятельности Г6ФДГ, в больших количествах образуется НАДФН, необходимый для регенерации восстановленного глутатиона – важного эндогенного антиоксиданта, уменьшение активности Г6ФДГ также будет приводить и к снижению скорости восстановления в клетке НАДФ (Stanton R.C., 2012). Показано, что повышение в клетке концентрации НАДФН и GSH вследствие деятельности ПФП, имеет адаптационный характер в условиях действия экстремального фактора (Xu Y. et al., 2010; Zhang Z. et al., 2010; Perl A. et al., 2011).

В этом контексте снижение уровня активности Г6ФДГ также будет иметь неблагоприятные последствия для клетки. Кроме того, так как одним из продуктов ПФП является рибозо-5-фосфат, ингибирование ПФП снижает способность клетки к синтезу нуклеотидов и нуклеиновых кислот, необходимых для активизации белкового синтеза (Cosentino C. et al., 2011).

На рисунке 3.16 в динамике описываемого периода показана активность другого цитоплазматического фермента, НАДФМДГ, который выполняет сходную с Г6ФДГ роль поставщика НАДФН (Северин Е.С., 2011).

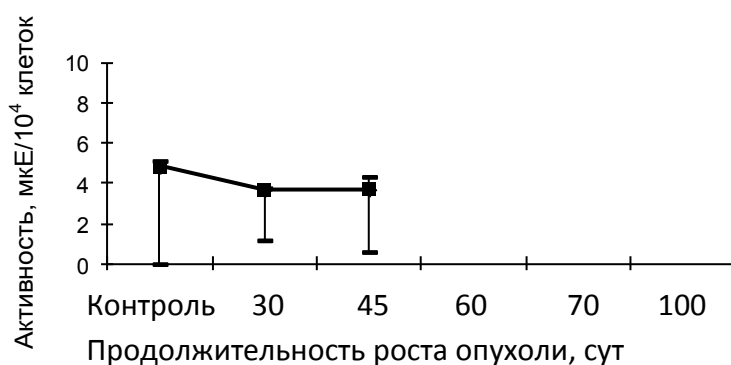


Рисунок 3.16 – Активность НАДФМДГ в лимфоцитах крови мышей, погибших с 45-х до 60-е сут после инокуляции клеток АКЭ при дозе вводимой опухоли  $1 \times 10^4$  клеток на 1 животное.

Получено в соавт. с Е.В. Слеповым.

Как видно из рисунка, в ходе исследованного периода активность этого фермента значимо не изменялась. Говоря о ферментах, деятельность которых имеет адаптационное значение для клеток, пребывающих в условиях действия экстремальных факторов, к каким несомненно относятся и факторы опухолевого процесса, нельзя не упомянуть о ГР, данные по активности которого представлены на рисунке 3.17.

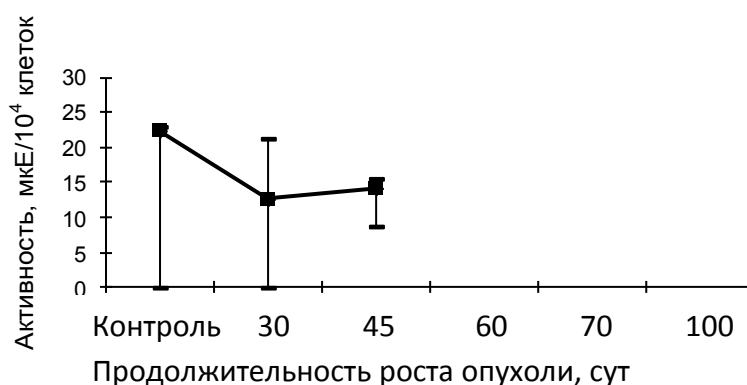


Рисунок 3.17 – Активность ГР в лимфоцитах крови мышей, погибших с 45-х до 60-е сут после инокуляции клеток АКЭ при дозе вводимой опухоли  $1 \times 10^4$  клеток на 1 животное. Получено в соавт. с Е.В. Слеповым.

Как видно из представленных на рисунке данных, уровень активности этого фермента достоверно не изменяется в лимфоцитах животных описываемой группы к 30-м и 45-м сут после инокуляции клеток АКЭ. Таким образом, можно утверждать, что в лимфоцитах животных данной группы ГР не способствует повышению адаптационных возможностей, связанных с обеспечением антиоксидантной защиты клетки.

Между тем, как было описано в обзоре литературы, окислительные процессы могут играть очень значимую роль в патогенезе опухолевого процесса, оказывая влияние на опухолевое микроокружение, и в том числе, нарушая функции клеток иммунной системы. Активность ГЗФДГ при этом снижается к 30-м сут после инокуляции клеток и остается на пониженном уровне до 45-х сут (рисунок 3.18).

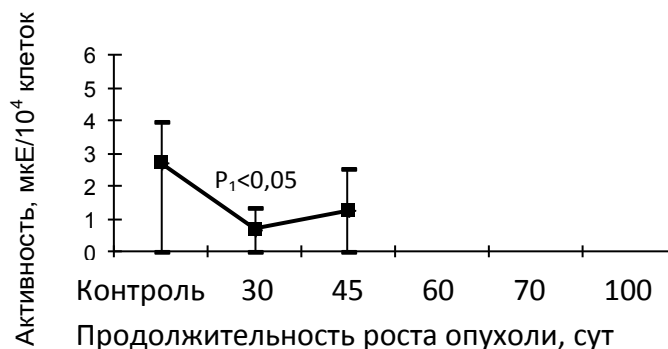


Рисунок 3.18 – Активность ГЗФДГ в лимфоцитах крови мышей, погибших с 45-х до 60-е сут после инокуляции клеток АКЭ при дозе вводимой опухоли  $1 \times 10^4$  клеток на 1 животное. Получено в соавт. с Е.В. Слеповым.

На рисунке 3.19 представлены изменения активности НАД- и НАДФ-зависимых ГДГ лимфоцитов крови мышей погибших с 45 по 60 сут после инокуляции клеток АКЭ при дозе вводимой опухоли  $1 \times 10^4$  клеток на 1 животное. Как следует из представленных данных, активность ферментов для всех исследованных реакций снижается к 30-м сут после инокуляции клеток АКЭ. При этом к 45-м сут активность НАДГДГ и НАДФГДГ возвращается к прежнему уровню, характерному для интактных животных, тогда как активность НАДНГДГ и НАДФНГДГ соответственно остается на прежнем низком уровне или еще более снижается.

Исходя из представлений о роли данных ферментов в метаболизме клетки, а именно из того что они функционируют на стыке между энергетическим и пластическим направлениями обмена, обеспечивая поступление в ЦТК субстратов с аминокислотного обмена в виде  $\alpha$ -кетоглутарата в ходе прямых НАД и НАДФ - зависимых реакций, и образуя из аммония и  $\alpha$ -кетоглутарата глутаминовую кислоту в ходе обратных НАДН и НАДФН – зависимых реакций, можно сделать вывод о том, что к 30-м сут обмен аминокислот между реакциями белкового обмена и ЦТК замедляется, тогда как к 45-м сут возникают условия для усиления потока субстратов от реакций белкового обмена к реакциям ЦТК.



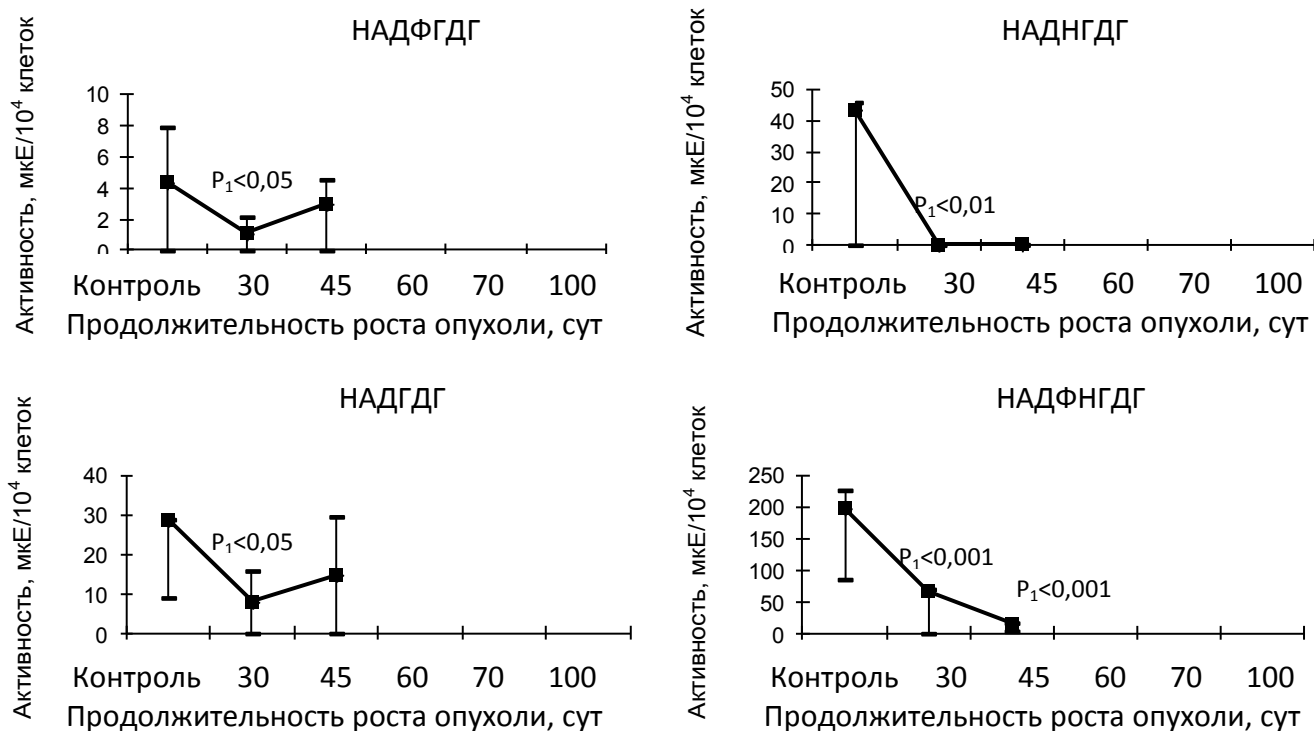


Рисунок 3.19 – Активность НАД- и НАДФ-зависимых ГДГ лимфоцитов крови мышей погибших с 45-х до 60-е сут после инокуляции клеток АКЭ в процессе роста опухоли при дозе вводимой опухоли  $1 \times 10^4$  клеток на 1 животное. Получено в соавт. с Е.В. Слеповым.

Сопоставляя эти данные с данными по активности НАДИЦДГ, описанными выше, можно заключить, что к 45-м сут в лимфоцитах возникают условия для активизации работы ЦТК. Рост активности НАДЛДГ к 45-м сут, описанный выше, и тенденция к росту, хотя и не достоверная статистически, активности ГЗФДГ, представленная на рисунке 3.18, позволяют сделать вывод о слаженной деятельности различных метаболических путей клетки с целью активизации аэробного энергетического обмена. По-видимому, эти события представляют собой адаптационную реакцию клеток, которая должна повысить энерговооруженность лимфоцитов и их возможности противостоять экстремальным воздействиям, связанным с ростом опухоли в организме, и обеспечить их адекватное функционирование.

На рисунке 3.20 показаны данные по изменению активности НАДИЦДГ и НАДФИЦДГ в лимфоцитах крови мышей, погибших с 60-х по 70-е сут после инокуляции клеток АКЭ.

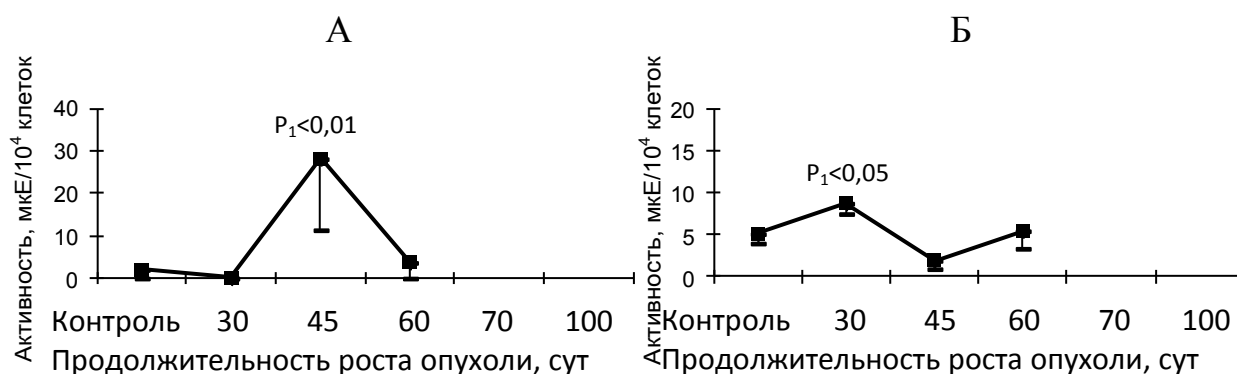


Рисунок 3.20 – Активность НАДИЦДГ (А) и НАДФИЦДГ (Б) в лимфоцитах крови мышей, погибших с 60-х по 70-е сут после инокуляции клеток АКЭ при дозе вводимой опухоли  $1 \times 10^4$  клеток на 1 животное.

Получено в соавт. с Е.В. Слеповым.

Как следует из представленных данных, активность НАДИЦДГ возрастает к 45-м сут с последующим снижением к прежним значениям к 60-м сут (рисунок 3.20 А). Учитывая лимитирующую роль этого фермента в ЦТК можно говорить о возникновении к 45-м сут роста АКЭ условий для повышения интенсивности работы этого пути в лимфоцитах.

Надо отметить, что рост активности данного фермента к 45-м сут наблюдался и в лимфоцитах мышей, погибших с 45 по 60 сут после инокуляции клеток АКЭ при дозе вводимой опухоли  $1 \times 10^4$  клеток на 1 животное. Таким образом, можно предполагать, что повышение активности НАДИЦДГ в это время является общей закономерностью для лимфоцитов животных с растущей опухолью.

Похожим образом, если провести сравнение с активностью в лимфоцитах мышей, погибших с 45 по 60 сут после инокуляции клеток АКЭ, ведет себя и активность НАДФИЦДГ, несколько возрастая к 30-м сут и возвращаясь к первоначальным значениям к 45-сут. В случае лимфоцитов

животных, погибших с 60 по 70 сут после инокуляции клеток АКЭ эта картина дополняется небольшим ростом активности фермента к 60-м сут (рисунок 3.20 Б).

На рисунке 3.21 показаны данные по изменению активности НАДМДГ и НАДНМДГ в лимфоцитах крови мышей, погибших с 60-х по 70-е сут после инокуляции клеток АКЭ.

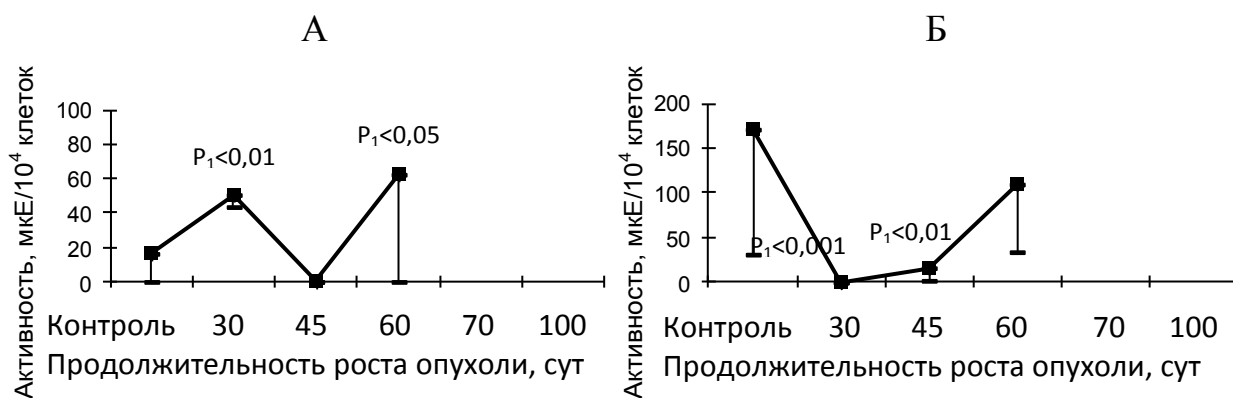


Рисунок 3.21 – Активность НАДМДГ (А) и НАДНМДГ (Б) в лимфоцитах крови мышей, погибших с 60-х по 70-е сут после инокуляции клеток АКЭ при дозе вводимой опухоли  $1 \times 10^4$  клеток на 1 животное.

Получено в соавт. с Е.В. Слеповым.

Как показано на рисунке, активность НАДМДГ подвержена скачкообразным колебаниям (рисунок 3.21 А, с минимальным значением, достигаемым к 45-м сут роста АКЭ, и максимальным достигаемым к 60-м сут. Эти сутки соответствуют и минимальным значениям активности фермента в лимфоцитах крови мышей, погибших с 45 по 60 сут после инокуляции клеток АКЭ.

В свою очередь активность НАДНМДГ снижается к 30-м сут с небольшим ростом к 45-м сут (рисунок 3.21 Б), что полностью соответствует изменениям активности данного фермента в лимфоцитах крови мышей, погибших с 45 по 60 сут после инокуляции клеток АКЭ (см. рисунок 3.13). Далее, к 60-м сут, в лимфоцитах крови мышей, погибших с 60 по 70 сут после инокуляции клеток АКЭ активность фермента резко увеличивается.

Таким образом, к 60-м сут активность МДГ как для НАД- так и для НАДФ-зависимой реакции возрастает, что может говорить об усилении роли этого фермента в метаболизме клетки. Однако, поскольку активность НАДИЦДГ к этому времени сильно снижается, рост активности МДГ не может быть связан с усилением субстратного потока по ЦТК в целом.

Однако, изменение активности отдельных реакций любого метаболического пути само по себе может иметь большое значение для клетки, поскольку их продукты могут играть роль субстратов для реакций, не входящих в данный метаболический путь. Кроме того, довольно значимой может быть роль таких реакций и в утилизации продуктов предыдущих реакций.

Активность НАДЛДГ, как показано на рисунке 3.22 А, не изменяется в течение исследованного периода, тогда как уровень НАДНЛДГ (рисунок 3.3.20 Б) резко падает к 30-м сут роста АКЭ, немного увеличиваясь к 45-м сут и затем вновь снижаясь практически до нулевых значений к 60-м сут.

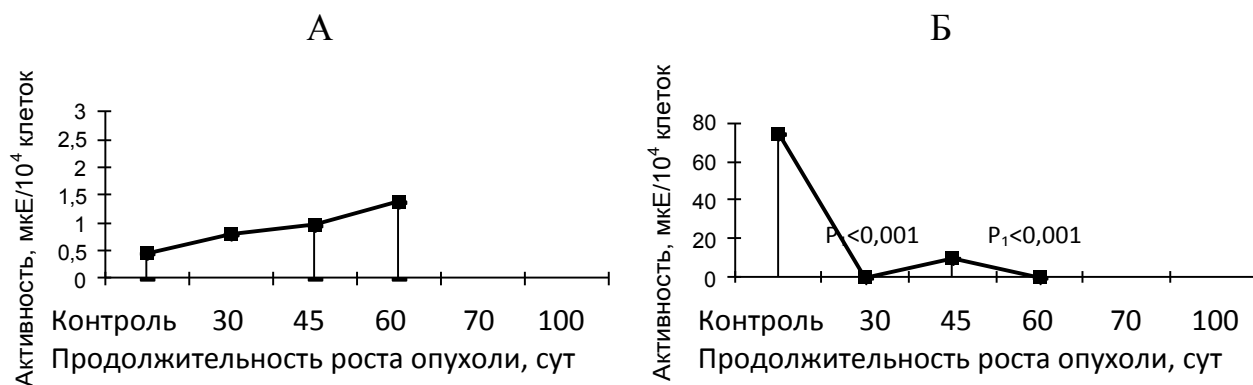


Рисунок 3.22 – Активность НАДЛДГ (А) и НАДНЛДГ (Б) в лимфоцитах крови мышей, погибших с 60-х по 70-е сут после инокуляции клеток АКЭ при дозе вводимой опухоли  $1 \times 10^4$  клеток на 1 животное.

Получено в соавт. с Е.В. Слеповым.

Здесь также весьма важным представляется сравнение с динамикой активности фермента в лимфоцитах крови мышей, погибших с 45 по 60 сут после инокуляции клеток АКЭ (см. рисунок 3.14). Как следует из такого

сравнения, в обоих случаях активность фермента падает от уровня интактных животных практически до нулевых значений.

В лимфоцитах мышей, погибших с 60 по 70 сут активность НАДНЛДГ несколько увеличивается к 45-м сут, но затем, ко времени гибели животных, снова принимает практически нулевые значения. Таким образом, для данной группы животных падение активности НАДНЛДГ можно рассматривать в качестве неблагоприятного прогностического фактора в отношении выживаемости.

Активность Г6ФДГ в лимфоцитах крови мышей, погибших с 60 по 70 сут после инокуляции клеток АКЭ снижается к 30-м сут роста АКЭ, после чего немного увеличивается и сохраняется на достигнутом уровне до 60-х сут (рисунок 3.23).

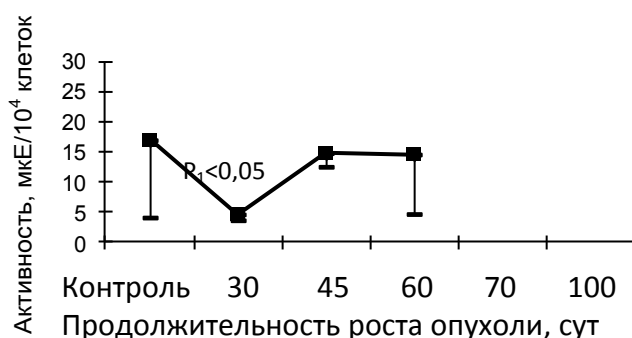


Рисунок 3.23 – Активность Г6ФДГ в лимфоцитах крови мышей, погибших с 60-х по 70-е сут после инокуляции клеток АКЭ при дозе вводимой опухоли  $1 \times 10^4$  клеток на 1 животное. Получено в соавт. с Е.В. Слеповым.

Если сравнивать поведение уровня фермента до 45-х сут включительно в лимфоцитах данной группы животных с лимфоцитами мышей, погибших с 45 по 60 сут после инокуляции клеток АКЭ (см. рисунок 3.15), можно выявить черты значительного сходства.

В обоих случаях уровень активности фермента снижается к 30-м сут и растет к 45-м сут, так что гибель животных происходит на фоне несколько повышенного уровня данного фермента.

Активность НАДФМДГ немного увеличивается к 30-м сут роста АКЭ, после чего снижается до прежнего уровня, на котором и сохраняется до 60-х сут (рисунок 3.24). В целом динамика активности этого фермента в лимфоцитах данной группы животных напоминает его поведение в лимфоцитах крови мышей, погибших с 45 по 60 сут после инокуляции клеток АКЭ (см. рисунок 3.16) за исключением отличий 30-х сут.

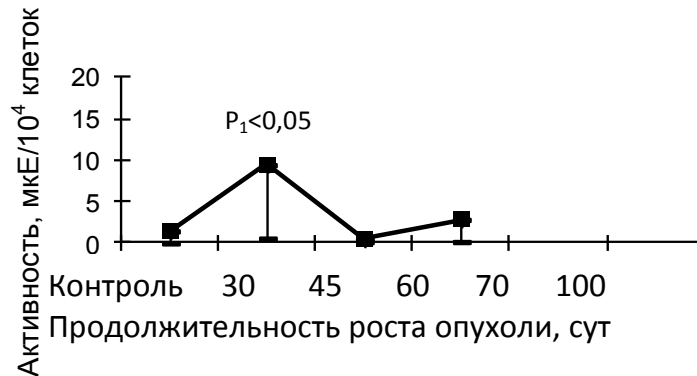


Рисунок 3.24 – Активность НАДФМДГ в лимфоцитах крови мышей, погибших с 60-х по 70-е сут после инокуляции клеток АКЭ при дозе вводимой опухоли  $1 \times 10^4$  клеток на 1 животное.

Получено в соавт. с Е.В. Слеповым.

Зато явные отличия наблюдаются в случае с ГР, активность которой предатсалена на рисунке 3.25.

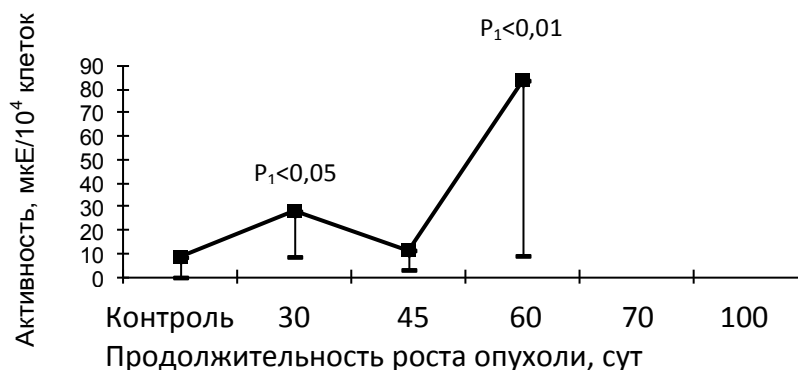


Рисунок 3.25 – Активность ГР в лимфоцитах крови мышей, погибших с 60-х по 70-е сут после инокуляции клеток АКЭ при дозе вводимой опухоли  $1 \times 10^4$  клеток на 1 животное. Получено в соавт. с Е.В. Слеповым.

Так, если уровень активности этого фермента достоверно не изменяется в лимфоцитах животных погибших с 45 по 60 сут после инокуляции клеток АКЭ (см. рисунок 3.17), то в данном случае его уровень возрастает к 30-м сут, затем снижается к 45-м сут и вновь и еще сильнее увеличивается к 60-м сут роста АКЭ.

Очевидно, что рост активности ГР может способствовать повышению интенсивности защиты клетки от действия АФК, что, по-видимому, становится актуальным для лимфоцитов в описываемый период.

Активность ГЗФДГ при этом увеличивается к 30-м сут роста АКЭ, после чего, к 45-м сут, снижается и остается на пониженном уровне до 60-х сут (рисунок 3.26). Надо также отметить, что понижение активности данного фермента при приближении времени гибели животных было характерно и для мышей, погибших с 45 по 60 сут после инокуляции клеток АКЭ (см. рисунок 3.18).

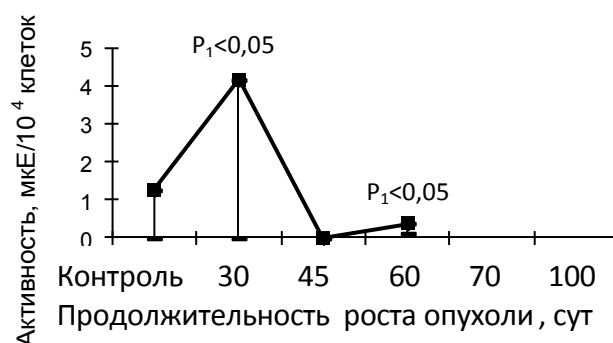


Рисунок 3.26 – Активность ГЗФДГ в лимфоцитах крови мышей, погибших с 60-х по 70-е сут после инокуляции клеток АКЭ при дозе вводимой опухоли  $1 \times 10^4$  клеток на 1 животное. Получено в соавт. с Е.В. Слеповым.

На рисунке 3.27 представлены изменения активности НАД- и НАДФ-зависимых ГДГ лимфоцитов крови мышей погибших с 60 по 70 сут после инокуляции клеток АКЭ при дозе вводимой опухоли  $1 \times 10^4$  клеток на 1 животное

Как следует из представленных данных, активность ферментов для всех исследованных реакций, за исключением НАДФГДГ снижается к 30-м

сут после инокуляции клеток АКЭ и либо продолжает снижаться, либо остается на достигнутом пониженном уровне. К 60-м сут активность ферментов, за исключением НАДФГДГ, возрастает.

Если рассматривать поведение уровней активности ферментов данных реакций вплоть до 45-х сут в сравнении с активностью НАД- и НАДФ-зависимых ГДГ лимфоцитов крови мышей погибших с 45-х до 60-х сут после инокуляции клеток АКЭ (рисунок 3.19), то можно обнаружить выраженные черты сходства изменений активности, за некоторым исключением со стороны НАДФГДГ. Очевидно, такое сходство объясняется общностью механизмов, регулирующих направление и интенсивность субстратных потоков в клетках.

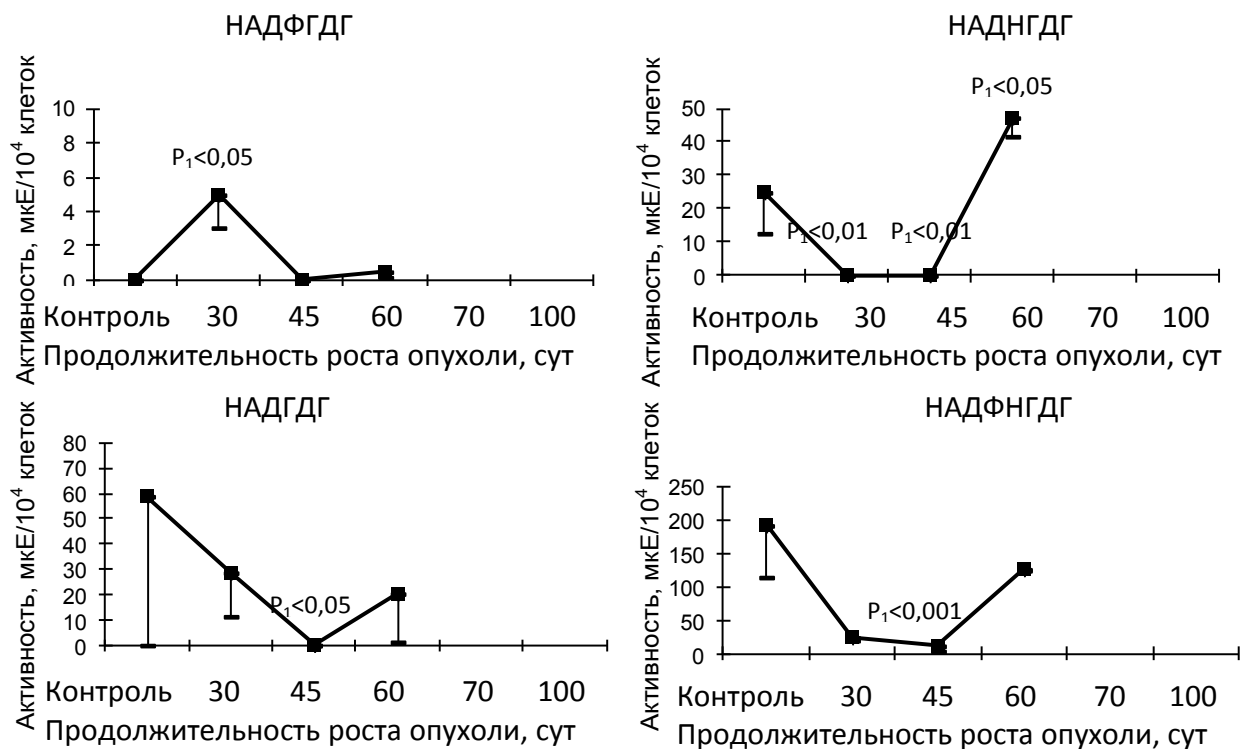


Рисунок 3.27 – Активность НАД- и НАДФ-зависимых ГДГ лимфоцитов мышей погибших с 60-х по 70-е сут после инокуляции клеток АКЭ в процессе роста опухоли при дозе вводимой опухоли  $1 \times 10^4$  клеток на 1 животное. Получено в соавт. с Е.В. Слеповым.



В то же время, рост активности НАДФНГДГ при снижении активности НАДФГДГ может свидетельствовать о возникновении в клетке условий для преимущественного перераспределения субстратов от реакций ЦТК к реакциям белкового синтеза, что наряду со снижением активности НАДИЦДГ может обуславливать общее снижение эффективности ЦТК как пути энергетического обмена.

Таким образом, сопоставление результатов определения активности исследованных нами ферментов в лимфоцитах мышей погибших с 60 по 70 сут после инокуляции клеток АКЭ и погибших с 45 по 60 сут позволяет говорить о наличии общих закономерностей в регуляции уровней активности ферментов в лимфоцитах. Очевидно, направление деятельности этих механизмов определяется одинаковым действием на клетки факторов опухолевого процесса.

Далее мы исследовали изменения активности дегидрогеназ лимфоцитов мышей после инокуляции клеток АКЭ, погибших с признаками развившейся опухоли с 70 по 100 сут.

Так, активность НАДИЦДГ характеризуется значительными колебаниями, имея максимумы в лимфоцитах интактных мышей и на 45-е сут роста АКЭ, и минимальные значения на 60-е и 70-е сут (рисунок 3.28).

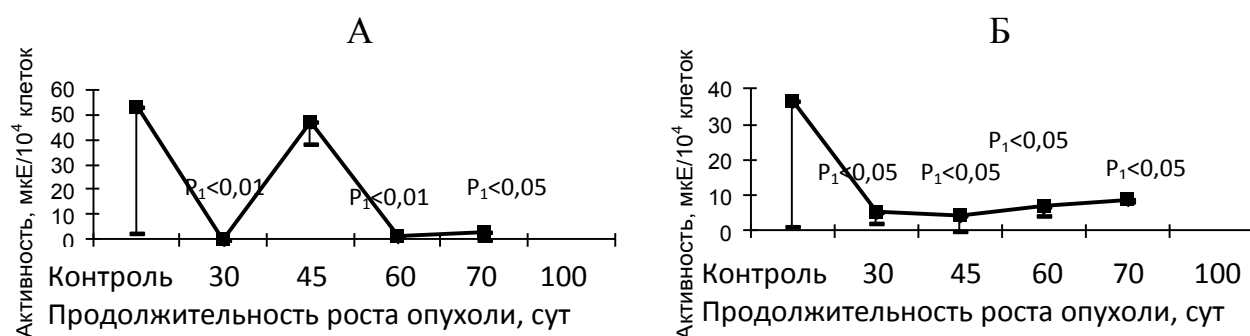


Рисунок 3.28 – Активность НАДИЦДГ (А) и НАДФИЦДГ (Б) в лимфоцитах крови мышей, погибших с 70-х по 100-е сут после инокуляции клеток АКЭ при дозе вводимой опухоли  $1 \times 10^4$  клеток на 1 животное.

Получено в соавт. с Е.В. Слеповым.

Таким образом, время гибели этих животных соответствует периоду наименьшей активности данного фермента в лимфоцитах. Учитывая роль НАДИЦДГ как лимитирующего фермента ЦТК можно говорить о возникновении в лимфоцитах таких животных условий для замедления субстратного потока по циклу и как следствие ухудшении условий для аэробного энергетического обмена. Кроме того, замедление работы ЦТК будет приводить и к нарушениям в ряде синтетических процессов клетки, если их субстратами являются продукты различных реакций ЦТК.

Активность НАДФИЦДГ снижается к 30-м сут роста АКЭ и сохраняется на пониженном уровне в течение всего исследованного периода. Очевидно, что значение этого фермента в метаболизме лимфоцитов снижается и как поставщика НАДФН, и в качестве вспомогательного фермента ЦТК.

Динамика активности другого фермента ЦТК, а именно МДГ, представлена на рисунке 3.29.

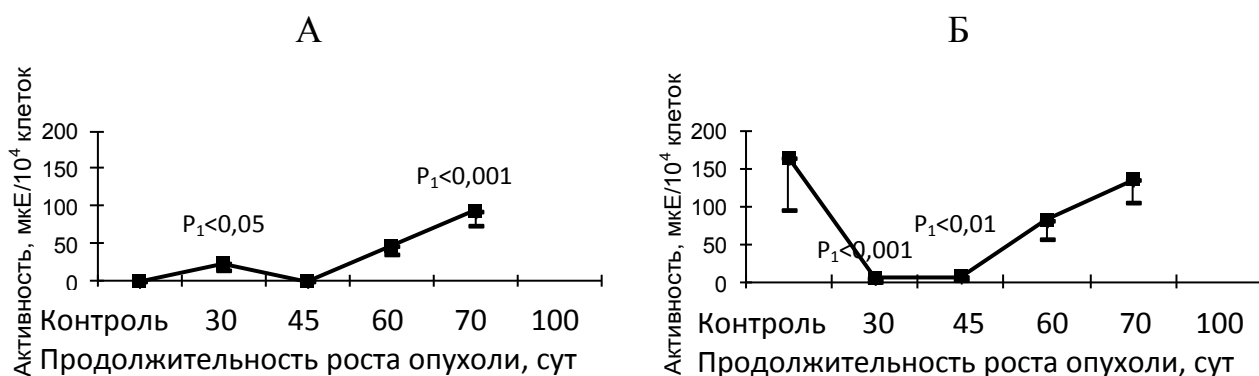


Рисунок 3.29 – Активность НАДМДГ (А) и НАДНМДГ (Б) в лимфоцитах крови мышей, погибших с 70-х по 100-е сут после инокуляции клеток АКЭ при дозе вводимой опухоли  $1 \times 10^4$  клеток на 1 животное.

Получено в соавт. с Е.В. Слеповым.

Как следует из данных рисунка, активность НАДМДГ увеличивается после 45-х сут роста АКЭ. Активность НАДНМДГ также растет после 45-х сут, что по-видимому свидетельствует об увеличении в клетке количества

фермента. Наблюдаемая картина по сути снова повторяет результаты предыдущих экспериментальных серий, что особенно сильно проявляется при сопоставлении данных рисунка 3.29 с данными рисунка 3.21, отражающими активность НАДМДГ и НАДНМДГ в лимфоцитах крови мышей, погибших с 60 по 70 сут после инокуляции клеток АКЭ.

Вместе с тем, снижение уровней активности НАДИЦДГ и НАДФИЦДГ в лимфоцитах животных данной экспериментальной серии, как и в случае с животными, погибшими с 60 по 70 сут после инокуляции клеток АКЭ, рост активности МДГ, по-видимому, не связан с усилением субстратного потока по ЦТК в целом.

При этом активность НАДЛДГ и НАДНЛДГ, как и в случае с лимфоцитами животных погибших с 60 по 70 сут после инокуляции клеток АКЭ находится в целом на невысоком уровне, что может опосредовать недостаточную слаженность работы гликолиза и других метаболических процессов (рисунок 3.30).

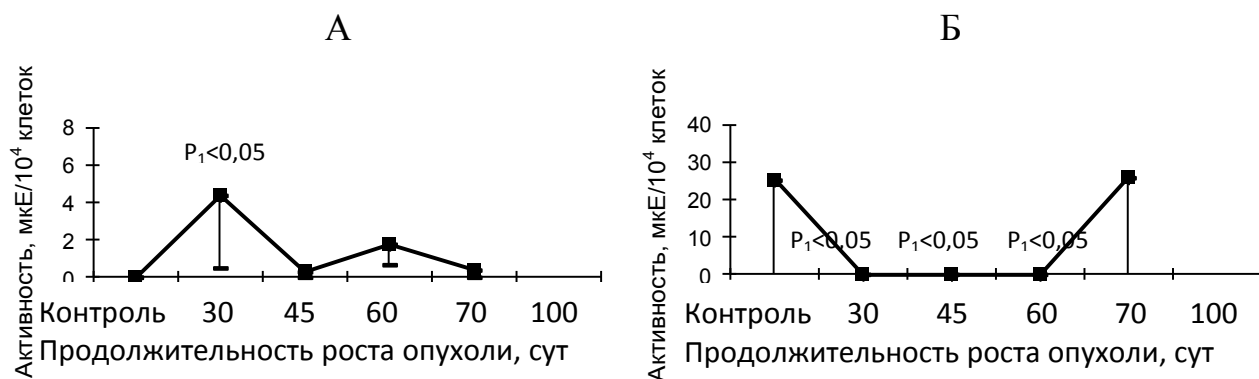


Рисунок 3.30 – Активность НАДЛДГ (А) и НАДНЛДГ (Б) в лимфоцитах крови мышей, погибших с 70-х по 100-е сут после инокуляции клеток АКЭ при дозе вводимой опухоли  $1 \times 10^4$  клеток на 1 животное.

Получено в соавт. с Е.В. Слеповым.

Активность Г6ФДГ, показанная на рисунке 3.31, практически в течение всего исследованного периода снижается, немного возрастая лишь к 70-м сут. Учитывая роль данного фермента в пластическом обмене и защите

клетки от окислительных повреждений, можно предполагать лишь негативные последствия снижения его активности.

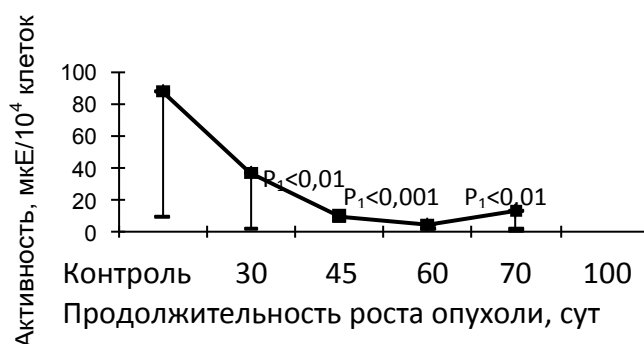


Рисунок 3.31. Активность Г6ФДГ в лимфоцитах крови мышей, погибших с 70-х по 100-е сут после инокуляции клеток АКЭ при дозе вводимой опухоли  $1 \times 10^4$  клеток на 1 животное. Получено в соавт. с Е.В. Слеповым.

Обращает на себя внимание тот факт, что к 70-м сут роста АКЭ наряду с небольшим ростом активности Г6ФДГ возрастает и активность другого поставщика НАДФН в клетке – НАДФМДГ (рисунок 3.32). По-видимому, условия интенсивного воздействия на клетки факторов онкологического процесса способствуют активизации процессов восстановления НАДФ.

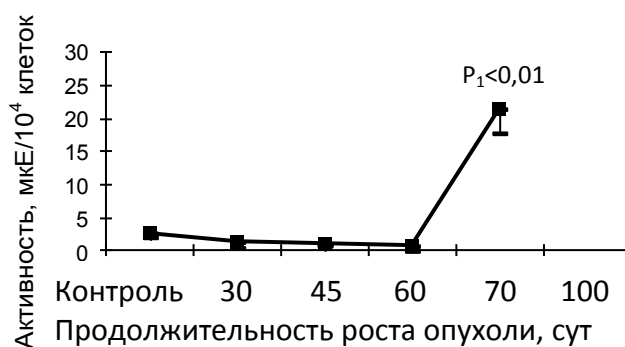


Рисунок 3.32 – Активность НАДФМДГ в лимфоцитах крови мышей, погибших с 70-х по 100-е сут после инокуляции клеток АКЭ при дозе вводимой опухоли  $1 \times 10^4$  клеток на 1 животное.

Получено в соавт. с Е.В. Слеповым.

При этом активность ГР, увеличившись, как и в случае с лимфоцитами мышей погибших с 60 по 70 сут после инокуляции клеток АКЭ, к 60-м сут, резко снижается практически до нулевых значений к 70-м сут (рисунок 3.33).

Учитывая роль ГР в антиоксидантной защите клетки становится очевидным, что такое снижение активности фермента неизбежно приведет к снижению защиты клетки от действия АФК.

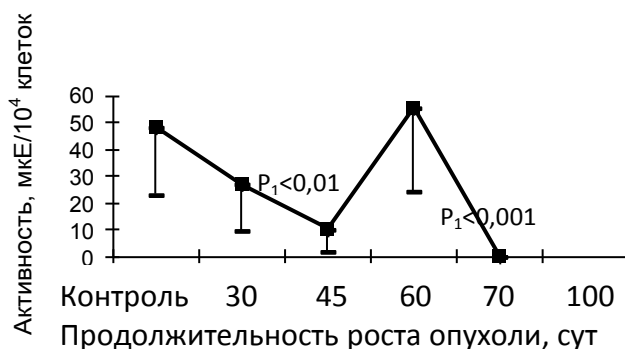


Рисунок 3.33 – Активность ГР в лимфоцитах крови мышей, погибших с 70-х по 100-е сут после инокуляции клеток АКЭ при дозе вводимой опухоли  $1 \times 10^4$  клеток на 1 животное. Получено в соавт. с Е.В. Слеповым.

Активность ГЗФДГ снижается от уровня лимфоцитов интактных животных к 30-м – 45-м сут, после чего следует небольшое увеличение активности к 60-м сут, за которым следует снижение активности практически до нулевых значений (рисунок 3.34). Стоит отметить, что понижение активности данного фермента при приближении времени гибели животных было характерно для мышей, погибших с 45 по 60 сут и с 60 по 70 сут после инокуляции клеток АКЭ. Таким образом, активность данного фермента может иметь прогностическое значение в отношении исхода заболевания при дозе вводимой опухоли  $1 \times 10^4$  клеток на 1 животное.

Учитывая роль ГЗФДГ в метаболизме клеток как фермента, связывающего липидный обмен и гликолиз, можно прийти к выводу, что наличие условий для перераспределения субстратов от реакций липидного синтеза к энергетическим реакциям является важным в отношении выживания животных.

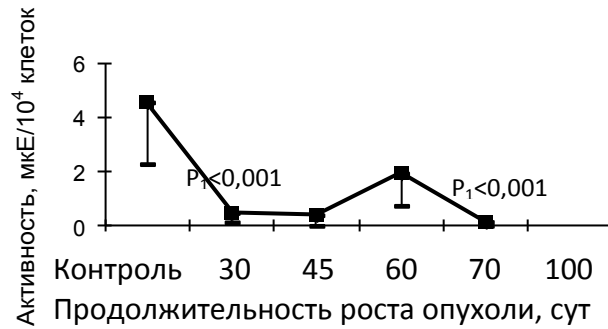


Рисунок 3.34 – Активность ГЗФДГ в лимфоцитах крови мышей, погибших с 70-х по 100-е сут после инокуляции клеток АКЭ при дозе вводимой опухоли  $1 \times 10^4$  клеток на 1 животное. Получено в соавт. с Е.В. Слеповым.

Как уже упоминалось выше, перераспределение субстратного потока в отношении аминокислот между реакциями аминокислотного обмена и ЦТК зависит от активности НАД- и НАДФ-зависимых глутаматдегидрогеназ. Данные по активности этих ферментов представлены на рисунке 3.35.

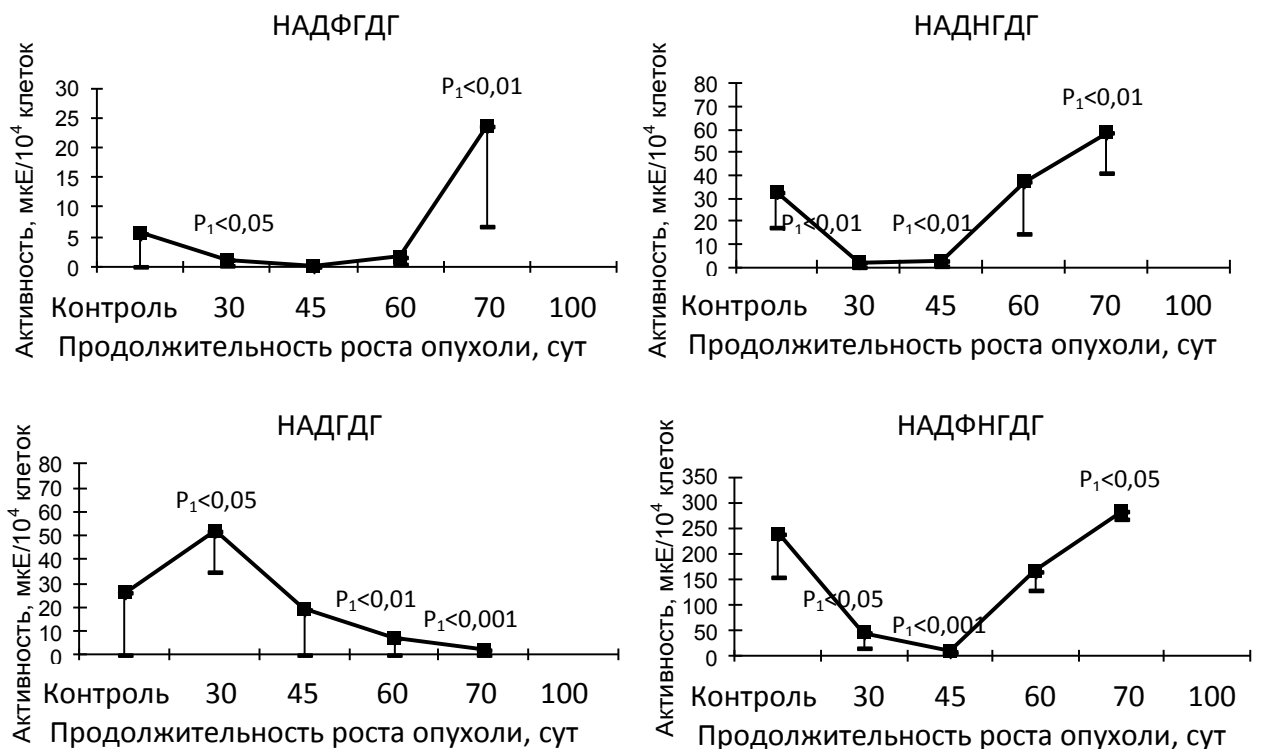


Рисунок 3.35 – Активность НАД- и НАДФГДГ лимфоцитов мышей погибших с 70-х по 100-е сут после инокуляции клеток АКЭ при дозе вводимой опухоли  $1 \times 10^4$  клеток на 1 животное.

Получено в соавт. с Е.В. Слеповым.

Как из них следует, в основном динамика активности ферментов представляет собой дальнейшее продолжение тенденций, намечавшихся в лимфоцитах животных, погибших с 60 по 70 сут после инокуляции клеток АКЭ. Особенно эти хорошо видно на примере НАДНГДГ и НАДФНГДГ, активность которых снижается к 30-м – 45-м сут и затем растет вплоть до времени гибели животных.

Вместе с тем, рост активности НАДНГДГ, при снижении активности НАДГДГ, может говорить о возникновении в клетке условий для преимущественного перераспределения субстратов от реакций ЦТК к реакциям белкового синтеза, что наряду с низкой активностью НАДИЦДГ может обуславливать общее снижение эффективности ЦТК как пути аэробного энергетического обмена.

Таким образом, у погибших животных рост активности отдельных ферментов энергетического обмена, в целом не сопровождается возникновением условий для роста интенсивности воспроизводства энергии, поскольку в то же время происходит снижение активности других ферментов энергетического обмена, либо возникают условия для оттока субстратов энергетического обмена в реакции биосинтеза белков или липидов.

То же самое характерно для ферментов, имеющих для клетки адаптивное значение. Так, рост активности Г6ФДГ, НАДФМДГ и НАДФИЦДГ, которые являются источниками НАДФН, сопровождается снижением активности ГР – важнейшего антиоксидантного фермента клетки, зависящего от НАДФН.

А рост активности НАДНГДГ или НАДФНГДГ, на фоне снижения активности НАДГДГ либо НАДФГДГ, может говорить о возникновении в клетке условий для преимущественного перераспределения субстратов от реакций ЦТК к реакциям белкового синтеза, что наряду с низкой активностью НАДИЦДГ может обуславливать общее снижение эффективности ЦТК как пути энергетического обмена.

К этому добавляется и снижение активности ГЗФДГ ко времени гибели животных, способствующее снижению уровня субстратного потока от реакций липидного обмена к гликолизу, что также неблагоприятно сказывается на эффективности воспроизводства АТФ в клетке.

### 3.4. Особенности обмена веществ в макрофагах, инфильтрующих опухоль, у мышей с АКЭ в процессе роста опухоли

В последние годы особая значимость придается исследованиям функциональных и метаболических особенностей клеток иммунной системы, инфильтрующих опухоль. В литературе появились многочисленные данные о коэволюции опухолевых клеток и их микроокружения (Anderson A.R. et al., 2009; Polyak K. et al., 2009; Kim Y. et al., 2011; Korkaya H. et al., 2011).

В частности, свидетельствующие в пользу того, что клетки иммунной системы, такие как лимфоциты, макрофаги, нейтрофилы, дендритные клетки, попадая в условия опухолевого микроокружения, способны изменять свое поведение под воздействием факторов роста сосудов, микроРНК и других биологически активных веществ микроокружения, которые вырабатывают клетки опухоли. При этом клетки иммунной системы приобретают способность стимулировать опухолевую прогрессию, усиливая ангиогенез, опухолевую инвазивность и метастазирование (Mathivanan S. et al., 2010; Corcoran C. et al., 2011; Condeelis J., Pollard J.W., 2006; Kalish S.V. et al., 2015).

Известно, что макрофаги, присутствующие в опухолях, играют ключевую роль в развитии связанных с опухолью воспалительных процессов (Mantovani A., Locati M., 2016). Макрофаги, инфильтрующие опухоль, являются важными компонентами опухолевого микроокружения, участвуют в формировании ниш первичных опухолей, вырабатывают факторы, обеспечивающие ангиогенез в опухоли (Henze A.T., Mazzone M., 2016).



Активация макрофагов проявляется в виде «кислородного взрыва», генерации NO, изменении активности ферментов, усилении синтеза и секреции цитокинов, ФНО- $\alpha$  и других биологически активных молекул. При этом повышается фагоцитарная активность клеток и способность представлять антиген Т-лимфоцитам (Ярилин, 2010; Курилова и др., 2012; Gaba et al., 2012; Wang et al., 2012).

Подобные изменения происходят и при активации нейтрофилов (Куртасова и др., 2009; Филина и др., 2011; Dias et al., 2011; Uriarte et al., 2011; Santa-Cecília et al., 2012).

Существует две формы активированных макрофагов – M1 и M2 (Wei J., Besner G.E., 2015). M1 считается классической формой активированных макрофагов, продуцирующих провоспалительные цитокины и стимулирующих реакции иммунитета. Активация макрофагов по альтернативному типу M2 приводит к выработке клетками противовоспалительных цитокинов и к супрессии иммунных процессов. Именно макрофаги типа M2 являются характерными для опухолевого микроокружения. Инфильтруя опухоль, макрофаги типа M2 способствуют усилению опухолевого ангиогенеза, росту опухоли и метастазированию. При этом для дифференцировки макрофагов по типу M1 или M2 происходит под воздействием факторов опухолевого микроокружения, таких как факторы роста, цитокины, гипоксия и др. (Soave D.F. et al., 2016).

Учитывая значимость макрофагов в процессах опухолевого роста, и их непосредственное участие в опухолевом микроокружении, мы исследовали особенности обмена веществ в макрофагах, инфильтрующих опухоль, у мышей с АКЭ в процессе роста опухоли.

Как следует из данных, представленных в таблице 3.3, активность НАДИЦДГ в макрофагах снижается к 5-м и 7-м сут опухолевого роста.

Таблица 3.3 – Активность НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ макрофагов, инфильтрующей опухоль, у мышей с АКЭ в процессе роста опухоли, Е/мг белка

Фермент	Экспериментальные группы			
	Интактные N = 12 1	3 сут N = 10 2	5 сут N = 10 3	7 сут N = 10 4
НАДИЦДГ	0,119±0,034	0,182±0,075	0,035±0,007 P <sub>1</sub> <0,05	0,009±0,001 P <sub>1</sub> <0,05
НАДФИЦДГ	0,882±0,215	0,139±0,038 P <sub>1</sub> <0,05	0,108±0,052 P <sub>1</sub> <0,05	0,284±0,142
НАДМДГ	10,445±0,480	8,966±0,352	1,747±0,106 P <sub>1,2</sub> <0,01	2,274±0,599 P <sub>1,2</sub> <0,01
НАДНМДГ	2,687±0,760	3,930±0,701	1,200±0,211 P <sub>2</sub> <0,05	0,440±0,040 P <sub>1</sub> <0,05; P <sub>2</sub> <0,01
Г6ФДГ	2,570±0,663	2,011±0,523	0,249±0,070 P <sub>1</sub> <0,01	0,534±0,166 P <sub>1</sub> <0,01; P <sub>2</sub> <0,05
НАДФМДГ	3,500±1,000	0,789±0,256	0,212±0,037 P <sub>1</sub> <0,05	0,527±0,352
ГР	0,730±0,237	0,223±0,076	0,351±0,065	0,055±0,027 P <sub>1,3</sub> <0,01; P <sub>2</sub> <0,05
НАДГДГ	1,774±0,522	1,312±0,505	0,176±0,100 P <sub>1,2</sub> <0,05	0,529±0,216
НАДФГДГ	4,044±0,626	1,144±0,378 P <sub>1</sub> <0,01	0,247±0,055 P <sub>1</sub> <0,01; P <sub>2</sub> <0,05	0,063±0,036 P <sub>1</sub> <0,05
НАДФНГДГ	0,700±0,121	1,301±0,293 P <sub>1</sub> <0,05	0,280±0,025 P <sub>2</sub> <0,05	0,586±0,159

Поскольку этот фермент – один из лимитирующих в реакциях Цикла трикарбоновых кислот (ЦТК) (Reitman Z.J., Yan H., 2010), снижение его активности будет приводить к снижению интенсивности субстратного потока в ЦТК, что может привести к снижению в клетках уровня АТФ и как следствие, к нарушению функциональных возможностей. В качестве причин происходящего может выступать как действие биологически активных факторов, производимых опухолевыми клетками, так и снижение содержания в асцитической жидкости необходимых субстратов, в частности таких, как глюкоза и кислород.

Активность НАДФИЦДГ снижается к 3-м сут роста АКЭ, и сохраняется на низком уровне в течение всего исследованного периода. В норме роль этого фермента состоит в регенерации НАДФН, но при снижении интенсивности субстратного потока в митохондриях НАДФИЦДГ может включаться в ЦТК, катализируя реакцию образование  $\alpha$ -кетоглутарата (Reitman Z.J., Yan H., 2010; Smolkova K., Jezek P., 2012).

Можно предполагать, что одновременное снижение активности НАДИЦДГ и НАДФИЦДГ будет дополнительно способствовать снижению интенсивности аэробного обмена веществ в макрофагах.

Активность НАДМДГ и НАДНМДГ снижается к 5-м сут роста АКЭ. Очевидно, это также будет способствовать снижению интенсивности субстратного потока в ЦТК (Van H.S. et al., 2016). То обстоятельство, что одновременно снижается активность фермента в прямом и обратном направлении, может говорить об уменьшении количества данного фермента в клетке, а не о действии регуляторов активности.

Также важно отметить, что МДГ является ферментом малат-аспартатного шунта, функция которого заключается в транспорте восстановленных никотинамидных коферментов в митохондрии. Уменьшение активности МДГ должно приводить и к уменьшению интенсивности работы шунта. Исходя из наших данных, очевидно, что условия для этого могут возникать на 5-е и 7-е сут роста АКЭ.

Исходя из представленных данных по активности исследованных ферментов ЦТК можно заключить, что уже в первые дни после появления опухолевых клеток в брюшной полости животных в макрофагах возникают условия для замедления реакций аэробного энергетического обмена.

Как следует из представленных данных, к 5-м сут роста АКЭ в макрофагах снижается активность Г6ФДГ – лимитирующего фермента ПФП. Этот метаболический путь имеет большое значение для обеспечения клетки НАДФН и рибозо-5-фосфатом (Stanton R.C., 2012).

Как известно, этот фермент может рассматриваться как один из ферментов антиоксидантной системы клеток, поскольку восстанавливаемый им НАДФН является кофактором реакции восстановления глутатиона, катализируемой ГР (Ballatori N. et al., 2009; Marí M. et al., 2009; Zhao Y. et al., 2009; Kilburn L. et al., 2010; Stanton R.C., 2012). В этом контексте снижение активности Г6ФДГ может свидетельствовать о возникновении в макрофагах условий для неконтролируемого развития окислительного стресса (Xu Y. et al., 2010; Zhang Z. et al., 2010; Perl A. et al., 2011).

В то же время, снижение активности этого фермента само по себе может быть следствием развития в клетке патологических окислительных процессов (Li W. et al., 2013).

Снижение активности ферментов под действием возрастающих концентраций активных форм кислорода может происходить как вследствие полимеризации путем образования поперечных сшивок с участием ε-аминогрупп лизина, N-концевых остатков аминокислот, а также сульфгидрильных групп, так и вследствие изменения вязкости липидной фракции мембраны, что влечет за собой различные негативные конформационные изменения ферментных молекул (Sánchez-Valle V. et al., 2012; Vamecq J. et al., 2012; Aggarwal N.T., Makielski J.C., 2013).

Так как одним из продуктов ПФП, ключевым ферментом которого является Г6ФДГ, является рибозо-5-фосфат, то снижение активности этого фермента также снижает способность клетки к синтезу нуклеотидов и

нуклеиновых кислот, что не может не отразиться на эффективности трансляции в клетке (Cosentino C. et al., 2011).

Как известно, сходную с Г6ФДГ роль поставщика НАДФН выполняет другой цитоплазматический фермент - НАДФМДГ (Северин Е.С., 2011). Как показали результаты наших исследований, активность этого фермента макрофагов, инфильтрующих опухоль, так же как и активность Г6ФДГ, снижалась в процессе роста АКЭ.

Это обстоятельство дополнительно подтверждает наше предположение о возникновении и развитии в макрофагах инфильтрующих опухоль, ситуации пониженной регенерации НАДФН и, очевидно, дефицита этого кофермента, что, в свою очередь, не может не сказаться на способности клеток противостоять действию активных форм кислорода.

Как уже говорилось выше, НАДФН является коферментом для ГР, важного фермента антиоксидантной защиты клеток.

Что касается активности самой ГР макрофагов, инфильтрующих опухоль в процессе роста АКЭ, то как следует из наших данных, активность фермента в исследованном периоде также как и активность Г6ФДГ и НАДФМДГ, снижается к 7-м сут роста опухоли по сравнению со значениями активности в контрольной группе.

Таким образом, данные по активности трех ферментов макрофагов, инфильтрующих опухоль, работа которых связана с защитой клетки от окислительных повреждений, снижается в течение всего исследованного периода. Это свидетельствует о выраженном негативном характере влияния факторов опухолевого процесса на клетки, которое возрастает по мере роста АКЭ. Следовательно, рост АКЭ будет сопровождаться усилением окислительных повреждений макрофагов в опухоли.

Активность НАДФГДГ макрофагов снижается к 7-м сут практически до нулевых значений. Также происходит уменьшение активности НАДФМДГ. Исходя из этого, можно сделать вывод об уменьшении интенсивности субстратного потока в макрофагах от реакций аминокислотного обмена в

энергетический обмен. Вместе с тем, увеличение к 3-м сут роста АКЭ активности НАДФНГДГ свидетельствует о существовании в это время условий для оттока части субстратов от ЦТК в виде глутамата к реакциям обмена аминокислот.

Таким образом, представленные данные свидетельствуют о снижении активности всех исследованных ферментов и об угнетении обменных процессов в макрофагах, инфильтрующих опухоль, у мышей в процессе роста АКЭ. В клетках снижается уровень аэробного обмена, процессов биосинтеза, нарушается взаимодействие между реакциями ЦТК и аминокислотного обмена, ухудшаются условия для защиты клеток от действия АФК. Выявленные изменения отражают срыв адаптации внутриклеточного обмена веществ в макрофагах.

Важным отличием изменений в обмена веществ макрофагов, инфильтрующих опухоль, от процессов, которые мы наблюдали в лимфоцитах крови, является скорость, с которой они развиваются. Находясь в условиях непосредственного контакта с опухолевым микроокружением, макрофаги, инфильтрующие опухоль, подвергаются наиболее интенсивному воздействию факторов канцерогенеза. Это обуславливает отсутствие среди наших результатов таких данных, которые можно было бы трактовать как отражение процессов адаптации внутриклеточного обмена веществ макрофагов, инфильтрующих опухоль.

Полученные результаты можно систематизировать в виде схемы, представленной в таблице 3.4.

Таблица 3.4 – Механизмы патогенетических изменений макрофагов, инфильтрующей опухоль, в процессе роста опухоли у мышей после инокуляции  $3 \times 10^6$  клеток АКЭ

Наличие опухоли	Особенности обмена веществ	Патогенетическое значение
Интактные	↑ ЦТК ↑ Гликолиз ↑ ПФП ↑ ГР ↑ Активность глутаматдегидрогеназ	Сбалансированный метаболизм. Высокий уровень адаптационных возможностей клеток.
Рост АКЭ	↓ ЦТК ↓ Гликолиз ↓ ПФП ↓ ГР ↓ Активность глутаматдегидрогеназ	Снижение интенсивности энергетического обмена Замедление обмена веществ между реакциями пластического и энергетического обмена. Снижение уровня защиты клеток от действия АФК Низкий уровень адаптационных возможностей клеток.

### 3.5. Особенности обмена веществ в клетках АКЭ у мышей в процессе роста опухоли после инокуляции $3 \times 10^6$ опухолевых клеток

Метаболические особенности, которые клетки приобретают в процессе малигнизации, направлены на обеспечение их интенсивной пролиферации и выживания в экстремальных условиях опухолевого микроокружения (Tennant D.A. et al., 2010; Cairns R.A. et al., 2011). При этом, как следует из материала предыдущего параграфа, опухолевый рост оказывает значительное влияние на клетки иммунной системы, метаболические изменения в которых связаны с фазами роста популяции опухолевых клеток. Несомненно, сами опухолевые клетки не могут оставаться в стороне от действия различных факторов опухолевого процесса, и их метаболизм также может быть подвержен влиянию изменяющихся в процессе опухолевого роста условий. В этой связи особенно интересным представляется сопоставление метаболических изменений в лимфоцитах, с метаболическими изменениями, происходящими в опухолевых клетках в процессе роста АКЭ.

Как следует из представленных на рисунке 3.36 данных, активность НАДИЦДГ в клетках АКЭ у мышей возрастает к 7-м сут роста опухоли по сравнению с 5-ми сут и остается без видимых изменений до 13-х сут, немного снижаясь к 15-м сут опухолевого роста.

Наблюдаемая картина имеет значительное сходство с результатами измерения активности этого фермента в лимфоцитах, описанные выше, за исключением увеличения активности фермента к 7-м сут.

Надо заметить, что НАДИЦДГ является одним из лимитирующих ферментов ЦТК и рост активности этого фермента может свидетельствовать о появлении условий для дополнительной интенсификации аэробного пути получения энергии. Опухолевая ткань, как известно, обладает преимущественно анаэробным метаболизмом, что связано в значительной степени с малой доступностью кислорода для опухолевых клеток.



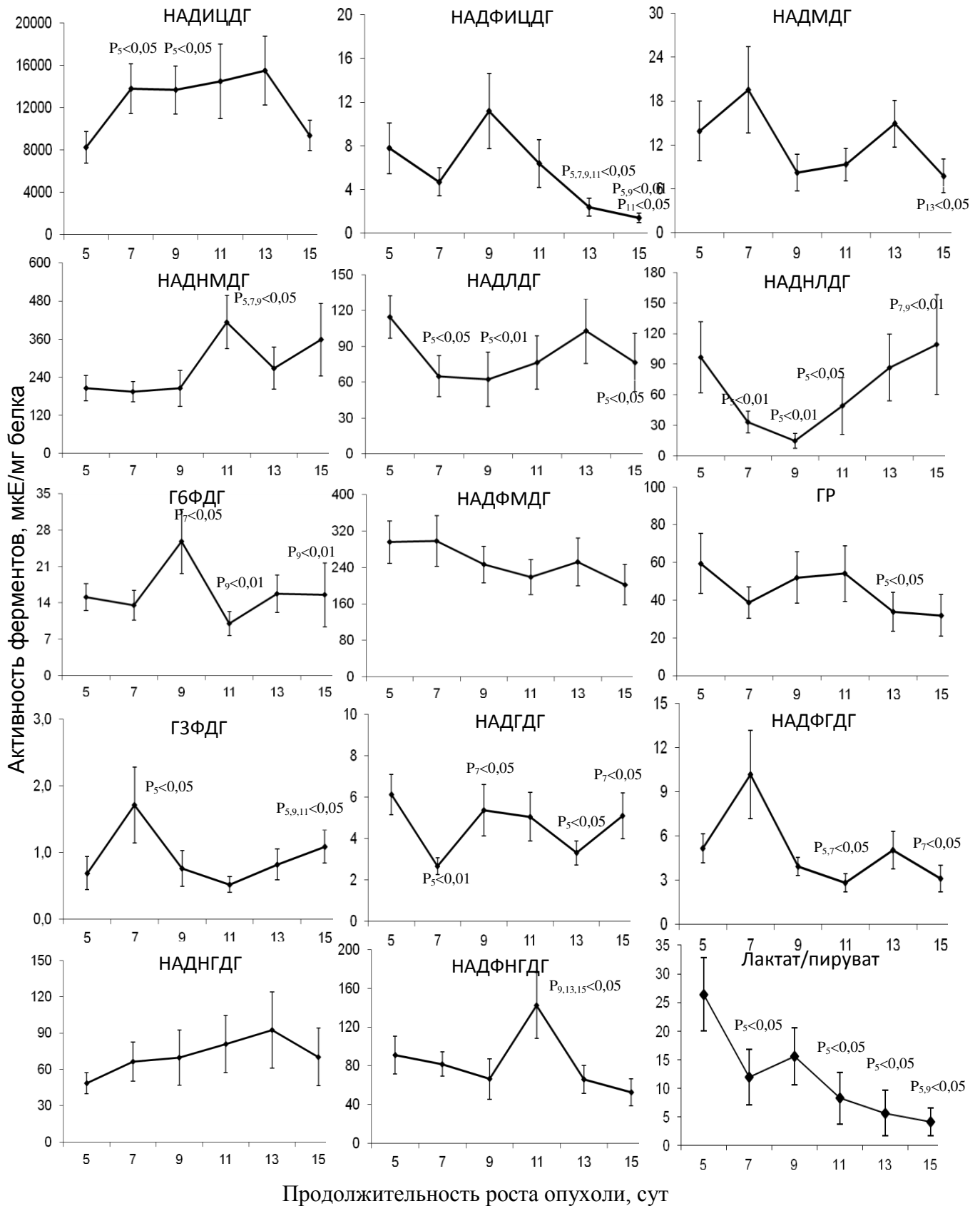


Рисунок 3.36 – Активность НАД(Ф) – зависимых дегидрогеназ и соотношение концентраций лактата и пирувата в клетках АКЭ в процессе роста опухоли. Получено в соавт. с Е.Ю. Фоменко.

Этот фактор особенно сильно проявляется в случае АКЭ, клетки которой находятся в виде суспензии в асцитической жидкости животного вне непосредственного контакта с кровеносными капиллярами и, таким образом, постоянно пребывают в условиях гипоксии. Таким образом, вряд ли есть основания связывать рост активности НАДИЦДГ в опухолевых клетках с интенсификацией в них аэробных процессов. По-видимому, здесь мы можем говорить о роли ЦТК, а точнее его продуктов, в не энергетических реакциях клеток, например в поставке продуктов ЦТК реакциям пластического обмена.

Известно, что интермедиаты ЦТК в опухолевых клетках используются для синтеза аспартата, аспарагина, глутамата, пролина, аргинина и глутамина и что ЦТК в клетках опухоли в очень большой степени функционирует как источник субстратов для биосинтеза аминокислот и жирных кислот (DeBerardinis R J. et al., 2007; DeBerardinis R J. et al., 2008).

Единственная корреляционная связь НАДИЦДГ на 5-е сут роста опухоли с НАДМДГ ( $r=0,55$   $p<0,05$ ) свидетельствует о сбалансированности субстратного потока в ЦТК опухолевых клеток что, возможно, связано и с энергетической ролью ЦТК в клетках АКЭ на данном этапе роста опухоли.

Причем, корреляционная связь фермента с НАДМДГ также наблюдается на 9-е ( $r=0,74$   $p<0,001$ ), 13-е ( $r=0,44$   $p<0,05$ ) и 15-е ( $r=0,52$   $p<0,05$ ) сут роста опухоли. Появление корреляций с уровнем НАДГДГ на 7-е сут опухолевого роста ( $r=0,63$   $p<0,01$ ) говорит о начале взаимодействия ЦТК с реакциями обмена аминокислот (рисунок 3.37). По-видимому, часть аминокислот вовлекается через глутамат в реакции ЦТК, и используется для образования интермедиатов этого цикла. В обзоре литературы уже упоминалось, что амфиболическая роль ЦТК имеет важное значение для опухолевых клеток (DeBerardinis R J. et al., 2007; DeBerardinis R J. et al., 2008). Использование аминокислот в качестве ресурса для выполнения ЦТК этой роли, по-видимому, вносит свой вклад в обеспечение усиленного заквата опухолью аминокислот из организма.

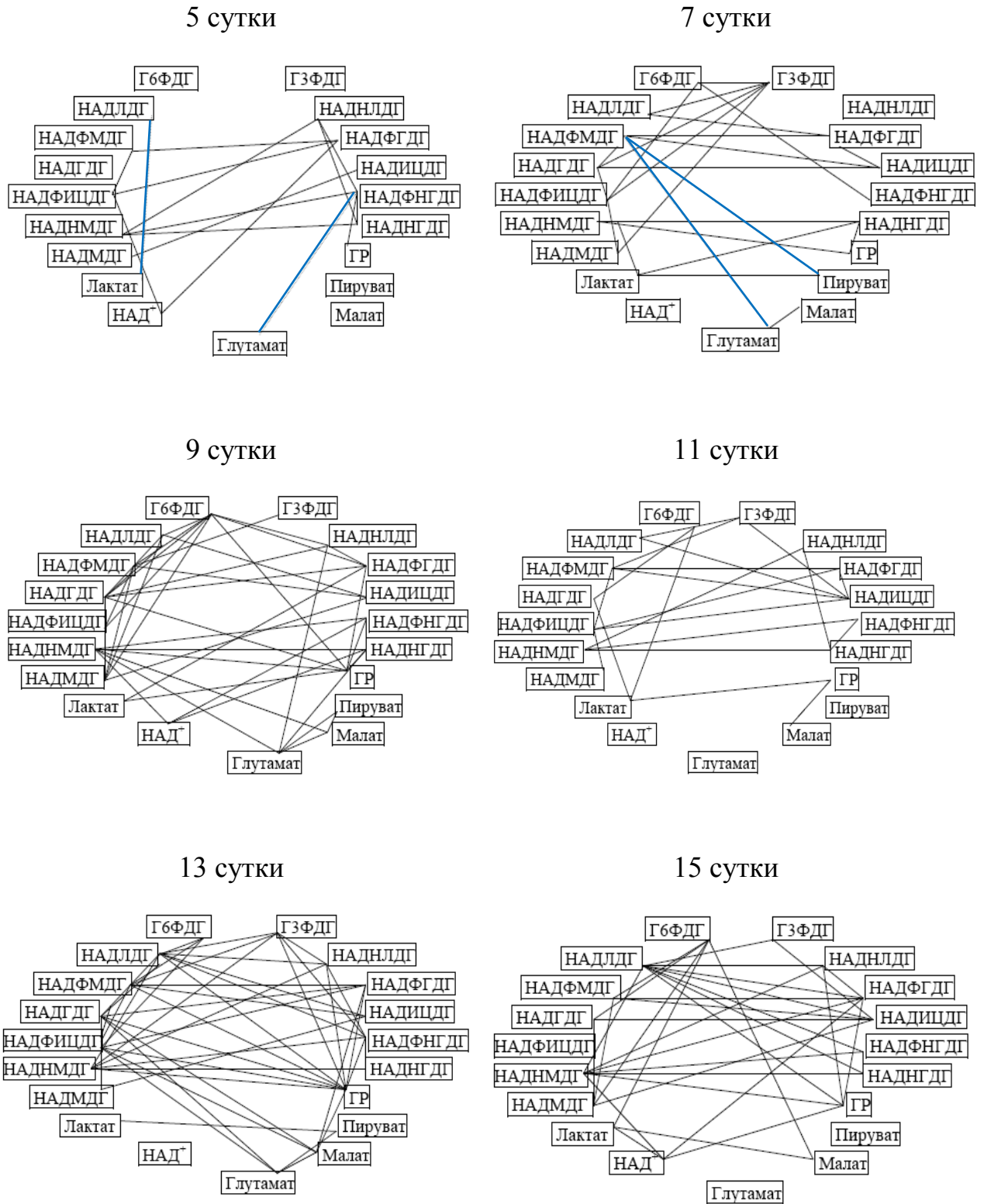


Рисунок 3.37 – Результаты корреляционного анализа, клетки АКЭ у мышей в процессе роста опухоли. Примечание: черным обозначены положительные корреляции, голубым – отрицательные корреляции.

Получено в соавт. с Е.Ю. Фоменко.

Наличие корреляционных связей с НАДГДГ 15-е ( $r=0,59$   $p<0,05$ ) сут роста опухоли свидетельствует о сохранении большого значения для метаболизма клеток АКЭ роли ЦТК в терминальную стадию болезни. Появление на 7-е сут корреляции НАДИЦДГ с НАДФМДГ ( $r=0,82$   $p<0,001$ ), поставщиком НАДФН, очевидно, подтверждает значение амфиболической роли ЦТК в клетках АКЭ в данном периоде.

Это утверждение остается справедливым в дальнейшем на протяжении всего исследованного нами периода, до 15-х сут после прививки опухоли включительно, поскольку корреляции НАДИЦДГ с НАДФМДГ сохраняются все это время ( $r=0,71$ ,  $p<0,001$ ;  $r=0,66$ ,  $p<0,01$ ;  $r=0,58$ ,  $p<0,01$ ;  $r=0,79$ ,  $p<0,001$  на 9, 11, 13 и 15 сут соответственно).

Нужно отметить, что количество корреляционных связей, образованных НАДИЦДГ с различными ферментами, остается достаточно большим на протяжении всего исследованного периода, что подчеркивает большое значение ЦТК для метаболизма клеток.

Концентрация НАД<sup>+</sup> несколько снижается к 7-м сут роста АКЭ по сравнению с 5-ми сут, но затем она постоянно растет вплоть до 15-х сут наблюдений, причем особенно сильный рост происходит между 13-ми и 15-ми сут (рисунок 3.38).

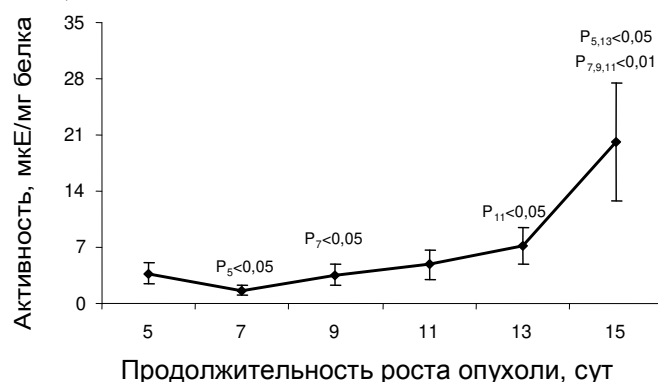


Рисунок 3.38 – Концентрация НАД<sup>+</sup> в клетках АКЭ у мышей в процессе роста опухоли. Получено в соавт. с Е.Ю. Фоменко.

Рост концентрации окисленной формы НАД может быть связан с повышенным окислением этого кофактора в ходе метаболических реакций

клеток, а также с усилением процессов перекисного окисления и использованием НАДН в качестве восстановителя для антиоксидантных реакций.

При этом во всех случаях, когда уровень НАД<sup>+</sup> в клетке коррелирует с активностью исследованных ферментов, обнаруживаются его корреляции с ферментами обмена глутамата. Так, на 5-е сут уровень НАД<sup>+</sup> коррелирует с НАДФГДГ ( $r=0,51$   $p<0,05$ ), на 9-е сут с НАДНГДГ ( $r=0,81$   $p<0,001$ ) и НАДФНГДГ ( $r=0,69$   $p<0,01$ ), и на 15-е сут с НАДФГДГ ( $r=0,69$   $p<0,01$ ). При этом содержание НАД<sup>+</sup> коррелирует с уровнем активности НАДНМДГ на 9-е ( $r=0,75$   $p<0,001$ ) и 15-е ( $r=0,54$   $p<0,05$ ) сут роста АКЭ. Все это также можно рассматривать как отражение большого значения амфиболических путей обмена аминокислот, если рассматривать уровень НАД<sup>+</sup> как один из маркеров состояния клеточного метаболизма.

Цитрат, образуемый в ЦТК, может экспортироваться в цитозоль, и участвовать в генерации НАДФН в реакции превращения цитрата в  $\alpha$ -кетоглутарат ферментом НАДФИЦДГ (Levine A. J., Puzio-Kuter A.M., 2010).

Как следует из данных, представленных на рисунке 3.36, уровень НАДФИЦДГ значительно снижается к 13-м и 15-м сут роста опухоли по сравнению с предыдущим периодом.

Это отличается от наблюдаемого у лимфоцитов скачкообразного возрастания активности фермента на 5-е и 13-е сут роста АКЭ. Очевидно, что в данном случае НАДФИЦДГ не принимает участия в ЦТК в качестве вспомогательного фермента, поскольку как уже обсуждалось выше значимость аэробного пути получения энергии в опухолевых клетках крайне низка.

Следовательно, этот фермент можно полностью рассматривать как источник НАДФН для синтетических процессов опухолевых клеток, включая реакции липидного синтеза, а также реакции восстановления глутатиона. По-видимому, здесь можно говорить о снижении способности клеток АКЭ на поздних этапах опухолевого процесса к реакциям восстановления с

использованием НАДФН. Наиболее значимые последствия это обстоятельство может иметь для реакций синтеза жирных кислот, которые обеспечивают процессы синтеза липидов в условиях активной пролиферации клеток.

Кроме того, синтез жирных кислот необходим для компенсации потерь липидов, происходящих в результате процессов перекисного окисления (Rysman E. et al., 2010; Nomura D.K. et al., 2010; Hilvo M. et al., 2011). Впрочем, более обоснованно об этом можно будет судить исходя из результатов анализа активности других ферментов, связанных с обменом этого кофактора, в частности, Г6ФДГ и НАДФМДГ.

При этом, наиболее выражены корреляционные связи НАДФИЦДГ с НАДФГДГ на 5-е ( $r=0,86$   $p<0,001$ ), 11-е ( $r=0,65$   $p<0,01$ ), и 13-е ( $r=0,64$   $p<0,01$ ) сут роста опухоли. А также с Г6ФДГ на 7-е ( $r=0,48$   $p<0,05$ ), 9-е ( $r=0,60$   $p<0,01$ ) и 13-е ( $r=0,68$   $p<0,001$ ) сут роста АКЭ, и с ГЗФДГ на 7-е сут опухолевого роста ( $r=0,68$   $p<0,001$ ). Корреляционные связи уровня активности НАДФИЦДГ с уровнями активности Г6ФДГ и ГЗФДГ на 7-е и 9-е сут обращают на себя особое внимание, так как свидетельствуют о значимости воспроизводства НАДФН в клетках опухоли для реакций липидного обмена (Levine A. J., Puzio-Kuter A.M., 2010; Jiang P. et al., 2011; Cairns R.A. et al., 2011; Zhang F., Du G., 2012).

На рисунке 3.36 представлены данные по активности еще одного фермента ЦТК в клетках АКЭ – МДГ, в процессе роста АКЭ. Как следует из представленных данных, активность фермента для НАД-зависимой реакции снижается к концу исследованного периода, тогда как активность НАДНМДГ напротив, возрастает к 11-м сут роста опухоли и, судя по графику, остается на повышенном уровне в течение оставшегося времени.

Учитывая низкую роль ЦТК в энергетическом обмене опухолевых клеток и достаточно высокую его значимость как источника разнообразных пластических ресурсов, а также то немаловажное обстоятельство, что реакция МДГ замыкает ЦТК, возвращая его к исходному субстрату ЦТК - ОА, можно предположить, что снижение активности фермента свидетельствует об

изъятии предыдущих субстратов из цикла, с направлением их на какие либо пластические процессы.

О значимости НАДМДГ для реакций пластического обмена опухолевых клеток свидетельствует образование корреляционных связей уровня активности этого фермента с уровнем активности ферментов, имеющих большое значение для реакций пластического обмена. Так, обнаружены корреляционные взаимосвязи НАДМДГ с Г6ФДГ на 9-е ( $r=0,49$   $p<0,05$ ) и 15-е ( $r=0,56$   $p<0,05$ ) сут роста АКЭ, с ГЗФДГ на 7-е сут ( $r=0,66$   $p<0,01$ ), НАДФМДГ на 9-е ( $r=0,55$   $p<0,05$ ) и 15-е ( $r=0,61$   $p<0,05$ ) сут роста опухоли.

Тем не менее, наличие корреляционных взаимосвязей НАДМДГ с НАДЛДГ на 9-е сут ( $r=0,63$   $p<0,01$ ) говорит о важности обеспечения в это время необходимого количества пирувата, способного поступать в реакции окислительного декарбоксилирования и затем в ЦТК. Наличие взаимосвязи уровней активности НАДМДГ и НАДФИЦДГ на 7-е ( $r=0,61$   $p<0,01$ ), 9-е ( $r=0,65$   $p<0,01$ ), 11-е ( $r=0,54$   $p<0,05$ ) и 13-е ( $r=0,53$   $p<0,05$ ) сут роста АКЭ свидетельствует о большом значении НАДФИЦДГ в период с 7-х по 13-е сут в качестве фермента, дающего дополнительный поток субстратов для ЦТК.

Постоянное снижение уровня малата в клетках АКЭ в процессе роста опухоли, показанное на рисунке 3.39, говорит о повышающейся интенсивности его использования клетками в исследованный период.

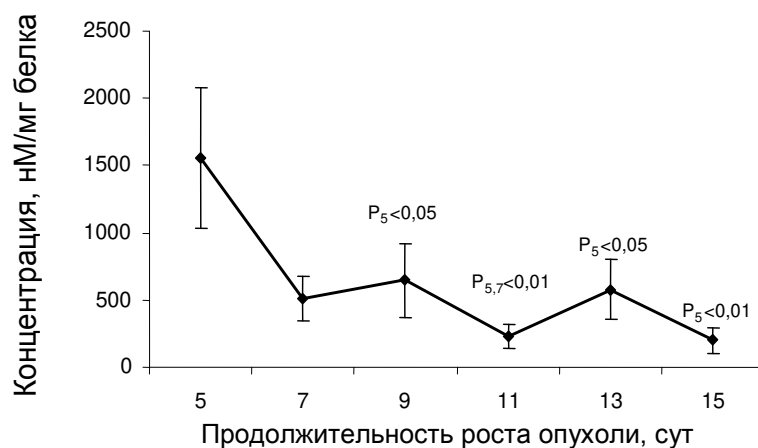


Рисунок 3.39 – Концентрация малата в клетках АКЭ у мышей в процессе роста опухоли. Получено в соавт. с Е.Ю. Фоменко.

Это подтверждает тезис о важной роли ЦТК в метаболизме клеток АКЭ. Вместе с тем, как следует из данных, представленных на рисунке 3.40, на 11-е сут опухолевого роста происходит резкое возрастание концентрации ОА, что может быть связано с замедлением его использования в ЦТК в это время.

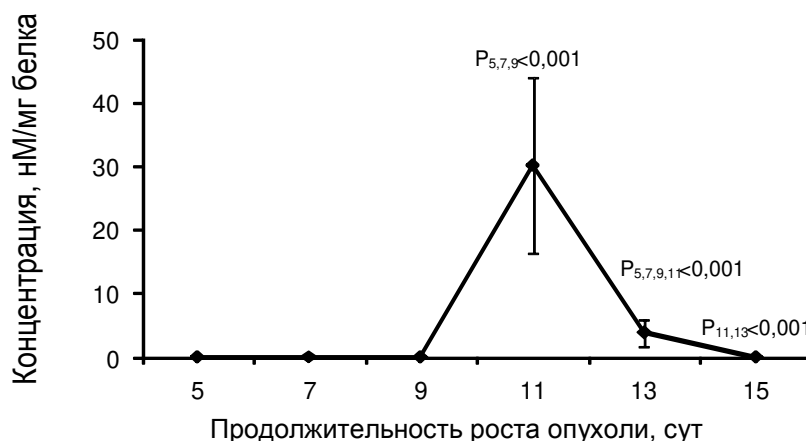


Рисунок 3.40 – Концентрация оксалоацетата в клетках АКЭ у мышей в процессе роста опухоли. Получено в соавт. с Е.Ю. Фоменко.

По-видимому, 11-е сут роста АКЭ являются критическими с точки зрения кинетических параметров роста, так как сопровождаются переходом опухолевого роста от экспоненциальной фазы к фазе плато (Эмануэль Н.М., 1977; Эмануэль Н.М., 2006). Этот период также, очевидно, сопровождается резким ухудшением среды в микроокружении опухолевых клеток вследствие развития опухолевой кахексии.

Как следует из данных, представленных на рисунке 3.36, активность ЛДГ для прямой реакции, т.е. для реакции превращения лактата в пируват снижается после 5-х сут опухолевого роста, остается на пониженном уровне до 11-х сут включительно, немного увеличивается на 13-е сут и снова снижается к 15-м сут.

Активность ЛДГ для НАДН-зависимой реакции также снижается после 5-х сут роста опухоли, достигая минимальных значений на 9-е сут, увеличиваясь в дальнейшем вплоть до 15-х сут, когда активность фермента



возвращается к уровням 5-х сут. Таким образом, на 7-е – 11-е сут наблюдается явное понижение активности фермента в обоих направлениях.

Это может быть свидетельством низкой значимости лактатдегидрогеназной реакции для клеток в это время, что вполне объяснимо, если учесть превалирующую роль гликолиза в ресинтезе АТФ в опухолевых клетках и как следствие низкую значимость ЦТК и реакций окислительного декарбоксилирования пирувата, откуда вытекает безразличие клеток к дальнейшей судьбе пирувата как энергетического субстрата.

Вдобавок клетки опухолей, как об этом упоминалось в обзоре литературы, обладают свойством выделять бикарбонатные кислоты и лактат во внеклеточное пространство. Эти кислоты затем играют важную роль в формировании условий опухолевого микроокружения (Koukourakis M.I. et al., 2006), облегчая опухолевую инвазию (Swietach P. et al., 2007) и оказывая супрессирующее воздействие на клетки иммунной системы (Fischer K. et al., 2007).

Лактат, производимый опухолевыми клетками, через монокарбонатные транспортеры МСТ1 и МСТ2 в дальнейшем может поглощаться нетрансформированными стромальными клетками и превращаться в пируват, который затем может выходить из них и возвращаться в клетки опухоли, направляясь далее в реакцию окислительного декарбоксилирования с дальнейшим участием в реакциях ЦТК и окислительного фосфорилирования, если у опухолевых клеток в тот момент будет возможность для его аэробной утилизации (Koukourakis M.I. et al., 2006).

Наличие корреляционных связей НАДЛДГ и ГЗФДГ на 9-е ( $r=0,65$   $p<0,01$ ), 11-е ( $r=0,74$   $p<0,001$ ), 13-е ( $r=0,78$   $p<0,001$ ) и 15-е ( $r=0,62$   $p<0,05$ ) сут роста АКЭ свидетельствует о значительном вовлечении в гликолиз в это время ГЗФ из реакций липидного обмена. При этом концентрация лактата в опухолевых клетках по нашим данным увеличивается с 7-х по 13-е сут, а затем резко снижается на 15-е сут, тогда как концентрация пирувата

напротив возрастает к 7-м сут и в дальнейшем с некоторыми колебаниями снижается до 15-х сут (рисунок 3.41).

Соответствующие этому изменения в динамике опухолевого роста наблюдаются и для соотношения концентарций лактата и пирувата в клетках АКЭ, что показано на рисунке 3.36.

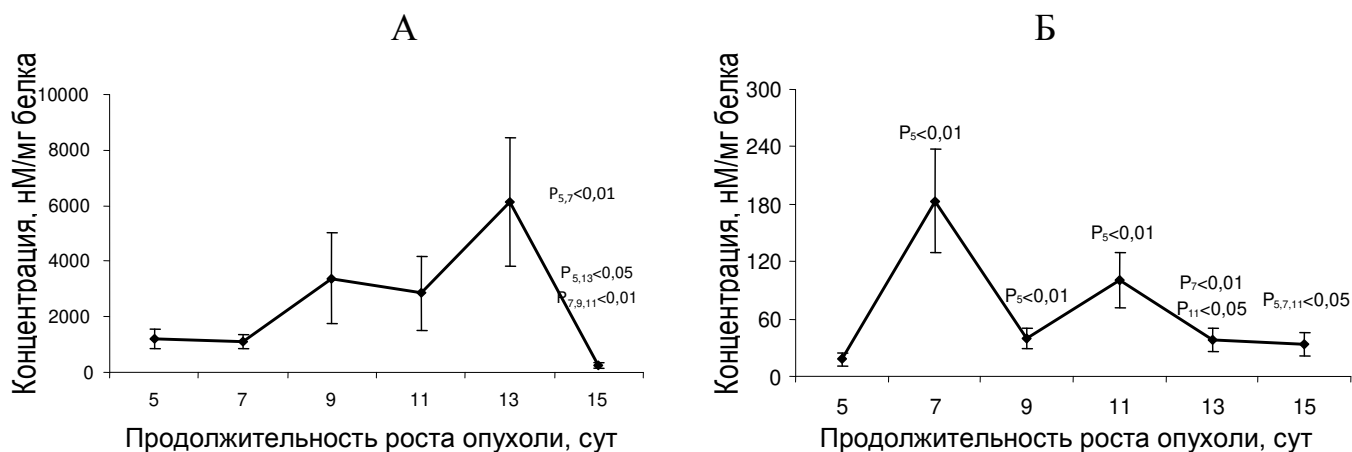


Рисунок 3.41 – Концентрации лактата (А) и пирувата (Б) в клетках АКЭ у мышей в процессе роста опухоли. Получено в соавт. с Е.Ю. Фоменко.

По данным литературы, значение этого параметра зависит в основном от скорости НАДН-зависимой лактатдегидрогеназной реакции и может косвенно свидетельствовать о соотношении концентраций НАДН и НАД в клетке (Kashiwagi A. et al., 1997). Как видно из представленных данных, его значение снижается в течение всего исследованного периода, что может свидетельствовать о высокой интенсивности утилизации НАДН клетками АКЭ. Это заключение находится в полном соответствии с представленными выше (рисунок 3.38) данными по содержанию окисленной формы НАД<sup>+</sup> в клетках АКЭ и с нашими выводами, сделанными на основе анализа этих данных.

Обращает на себя внимание сходство в изменении концентраций НАД<sup>+</sup> и соотношения лактата и пирувата в клетках АКЭ и лимфоцитах. Очевидно, это является свидетельством однотипных метаболических реакций опухолевых и клеток иммунной системы, на которые действуют одни и те же

факторы опухолевого процесса. Правда, интенсивность воздействия этих факторов может быть различной, ведь опухолевые клетки непосредственно находятся в очаге возникновения этих факторов, тогда как лимфоциты, находясь в крови, испытывают это воздействие очевидно в более сглаженной форме. Этим можно объяснить различия в интенсивности изменений указанных параметров метаболизма клеток в процессе роста АКЭ.

Активность Г6ФДГ в клетках АКЭ испытывает скачкообразный подъем к 9-м сут опухолевого роста, с возвращением затем к исходным уровням (рисунок 3.36).

Причем, на 9-е сут обнаружена и положительная корреляция уровня Г6ФДГ с ГР ( $r=0,60$   $p<0,01$ ), что, очевидно, свидетельствует о важности этого фермента как поставщика НАДФН для реакции восстановления глутатиона.

Ранее уже обсуждалось, что Г6ФДГ является иницирующим ферментом ПФП, в результате деятельности которого в больших количествах образуется НАДФН, необходимый для регенерации восстановленного глутатиона. Этот фермент часто рассматривают в качестве одного из адаптационных, обеспечивающих работу восстановительных систем клетки (Xu Y. et al., 2010; Zhang Z. et al., 2010; Perl A. et al., 2011). В то же время, высока роль НАДФН и в липидном синтезе.

Учитывая представленные выше данные о количестве митозов в опухоли в динамике опухолевого роста можно предполагать, что 9-е сут характеризуются рядом особенностей. Так, во-первых, это период продолжающейся активной пролиферации клеток АКЭ, а во-вторых, это период, когда количество опухолевых клеток в организме и их концентрация в самой опухоли достигает больших значений. Т.е. активная пролиферация продолжается при ухудшении условий жизнедеятельности клеток, что требует мобилизации всех пластических и защитных ресурсов клетки.

Было показано, что ингибитором ПФП, который непосредственно управляет активностью Г6ФДГ, является белок p53. Уменьшение содержания в клетке этого белка приводит к значительному возрастанию уровня НАДФН

в опухолевых клетках, благодаря увеличению активности Г6ФДГ (Jiang P. et al., 2011). Очевидно, что увеличение активности Г6ФДГ на 9-е сут роста АКЭ отражает возникновение наиболее благоприятных условий для роста опухоли.

При этом активность НАДФМДГ, другого цитоплазматического фермента – поставщика НАДФН (Северин Е.С., 2011), в течение всего времени эксперимента значимо не изменяется (рисунок 3.36), что еще больше должно повышать значимость для клеток реакций ПФП. О значимости данного фермента для метаболизма клеток свидетельствует образование корреляционных связей уровня активности НАДФМДГ с уровнем ферментов, имеющих большое значение для реакций пластического обмена. Так, обнаружена прямая корреляция НАДФМДГ с Г6ФДГ на 9-е ( $r=0,67$   $p<0,01$ ), 13-е ( $r=0,46$   $p<0,05$ ) и 15-е ( $r=0,65$   $p<0,01$ ) сут роста АКЭ, а также с Г3ФДГ на 9-е ( $r=0,47$   $p<0,05$ ), 11-е ( $r=0,64$   $p<0,01$ ) и 13-е ( $r=0,48$   $p<0,05$ ) сут.

Активность ГР при этом в клетках АКЭ также не демонстрирует больших изменений, лишь несколько снижаясь к 13-м сут эксперимента (рисунок 3.36). Причем, к 13-м сут происходит и снижение активности ГР лимфоцитов крови животных, что наряду со сходными изменениями активности НАДФМДГ может свидетельствовать о схожести метаболических процессов в этих клетках. Таким образом, можно констатировать снижение функционирования отдельных элементов антиоксидантной защиты клеток опухоли и лимфоцитов в позднем периоде роста АКЭ.

Корреляция уровня ГР с уровнем НАДФ-зависимых ферментов, а именно с НАДФМДГ на 13-е сут ( $r=0,65$   $p<0,01$ ), НАДФГДГ на 9-е ( $r=0,78$   $p<0,001$ ), 13-е ( $r=0,66$   $p<0,01$ ) и 15-е ( $r=0,67$   $p<0,01$ ) сут роста АКЭ, НАДФИЦДГ на 13-е сут ( $r=0,51$   $p<0,05$ ) может свидетельствовать об использовании этим ферментом НАДФН, образуемого в соответствующих реакциях.

Повышение активности ГЗФДГ, наблюдаемое на 7-е сут роста АКЭ, очевидно, создает условия для оттока части ГЗФ от реакций метаболизма липидов в гликолиз. Последующее понижение уровня к 9-м сут, с дальнейшим незначительным ростом к 15-м сут (рисунок 3.36), говорит о снижении возможностей для оттока субстратов от реакций биосинтеза липидов к реакциям энергетического обмена, поскольку ГЗФДГ катализирует превращение ГЗФ, предшественника триацилглицеролов в диоксиацетонфосфат, тем самым вовлекая его в гликолиз.

Это дополнительно подтверждает наше предположение о высокой значимости липидного синтеза для клеток на 9-е сут эксперимента как фактора обеспечивающего поставку липидов для поддержания процессов пролиферации клеток и восстановления поврежденных клеточных мембран, тогда как рост активности фермента на 7-е сут может говорить о высокой значимости энергетических реакций в соответствующий период.

В то же время, уже описанное выше наличие корреляций уровней активности НАДЛДГ и ГЗФДГ на 9-е ( $r=0,65$   $p<0,01$ ), 11-е ( $r=0,74$   $p<0,001$ ), 13-е ( $r=0,78$   $p<0,001$ ) и 15-е ( $r=0,62$   $p<0,05$ ) сут роста АКЭ свидетельствует о большом значении в это время продукта ГЗФДГ - ГЗФ для гликолиза. Учитывая, что гликолиз в опухолевых клетках является основным источником АТФ, понижении активности фермента в период с 9-х по 15-е сут по сравнению с уровнем 7-х сут будет неблагоприятно сказываться на энергетическом обеспечении клеток АКЭ. Очевидно, период до 7-х сут опухолевого роста является наиболее благоприятным с точки зрения метаболических процессов в опухолевых клетках.

При этом, значимостью ГЗФДГ в качестве фермента глицерофосфатного челночного механизма можно пренебречь, так как значение дыхания в энергетическом обмене клеток АКЭ в условиях диффузной опухоли в брюшной полости, очевидно, близко к нулю, к тому же роль самого глицерофосфатного челночного механизма в дыхании клеток также невелика (Северин Е.С., 2011).

На стыке между энергетическим и пластическим направлениями обмена находятся НАДГДГ и НАДФГДГ, обеспечивающие поступление в ЦТК субстратов с аминокислотного обмена в виде  $\alpha$ -кетоглутарата, тогда как в ходе обратных реакций этих ферментов из аммония и  $\alpha$ -кетоглутарата синтезируется глутаминовая кислота. Оценивая активность данных ферментов для прямой и обратной реакций можно оценить интенсивность субстратного потока с ЦТК на аминокислотный обмен и обратно. Данные по активности этих ферментов также представлены на рисунке 3.36.

Как следует из представленных данных, активность НАДГДГ снижается к 7-м сут опухолевого роста, восстанавливая свои значения к 9-м сут и испытывает небольшие колебания в терминальном периоде заболевания несколько снижаясь на 13-е и повышаясь к 15-м сут. Активность НАДФГДГ напротив возрастает на 7-е сут и затем снижается к 9-м сут, сохраняя низкие значения до окончания эксперимента. Пик активности НАДФНГДГ приходится на 11-е сут, тогда как НАДНГДГ испытывает тенденцию к росту в течение почти всего времени исследования.

Очевидно, что исходя из представленных данных, общей тенденцией в динамике опухолевого роста является снижение интенсивности обмена глутамата и  $\alpha$ -кетоглутарата, т.е. перетока субстратов между аминокислотным обменом и ЦТК.

Тенденция к росту НАДНГДГ и всплеск активности НАДФНГДГ на 11-е сут роста АКЭ свидетельствует о тенденции к переходу субстратов из ЦТК к реакциям аминокислотного обмена. Очевидно, что ЦТК в клетках АКЭ не играет энергетической роли, а выполняет амфиболическую функцию, связывая реакции катаболизма углеводов с различными направлениями обмена клетки.

Об этом говорит и слабость корреляционных взаимосвязей между уровнем активности глутаматдегидрогеназ и уровнем ферментов энергетического обмена. Зато обнаружены сильные положительные взаимосвязи НАДГДГ с Г6ФДГ на 9-е ( $r=0,88$   $p<0,001$ ), 11-е ( $r=0,70$   $p<0,001$ )

и 15-е ( $r=0,53$   $p<0,05$ ) сут роста опухоли, а также НАДФГДГ и НАДФМДГ на 5-е ( $r=0,59$   $p<0,01$ ), 7-е ( $r=0,81$   $p<0,001$ ), 11-е ( $r=0,86$   $p<0,001$ ) и 13-е ( $r=0,60$   $p<0,01$ ) сут, что может говорить о преимущественно пластической направленности метаболических путей, включающих исследованные глутаматдегидрогеназы.

Подтверждают сказанное и результаты по исследованию содержания глутамата в клетках АКЭ, представленные на рисунке 3.42.

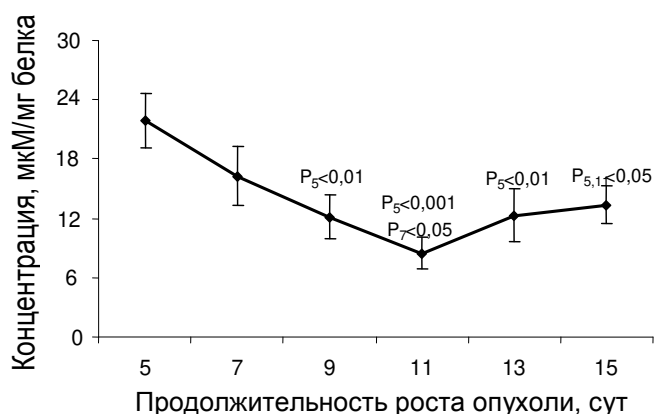


Рисунок 3.42 – Концентрация глутамата в клетках АКЭ у мышей в процессе роста опухоли. Получено в соавт. с Е.Ю. Фоменко.

Как видно из данных рисунка, концентрация глутамата гладко снижается от 5-х к 11-м сут роста АКЭ, немного возрастая далее и оставаясь примерно на одном и достаточно низком уровне с 13-х по 15-е сут. Понижение концентрации глутамата вкупе с данными по активности ГДГ по-видимому свидетельствует о росте потребления этого субстрата клетками. Очевидно, что это стоит связать с активизацией пластических процессов в опухолевых клетках.

О востребованности глутамата преимущественно пластическими процессами говорит и отсутствие корреляционных связей между содержанием его в клетках и уровнем активности ферментов энергетического обмена. Корреляции выявляются в основном с уровнем активности глутаматдегидрогеназ, в частности, с НАДФГДГ на 13-е сут после прививки

опухоли ( $r=0,58$   $p<0,05$ ), НАДН ГДГ на 9-е сут ( $r=0,70$   $p<0,01$ ), НАДФНГДГ на 5-е сут ( $r=-0,51$   $p<0,05$ ).

При этом, как показывают данные хемилюминесцентного анализа, представленные на рисунке 3.43, рост опухоли сопровождается увеличением содержания АФК в суспензии опухолевой ткани, что может являться одним из неблагоприятных факторов как для самих клеток АКЭ, так и для клеток иммунной системы, инфильтрующей опухоль, а также для органов брюшной полости животных.

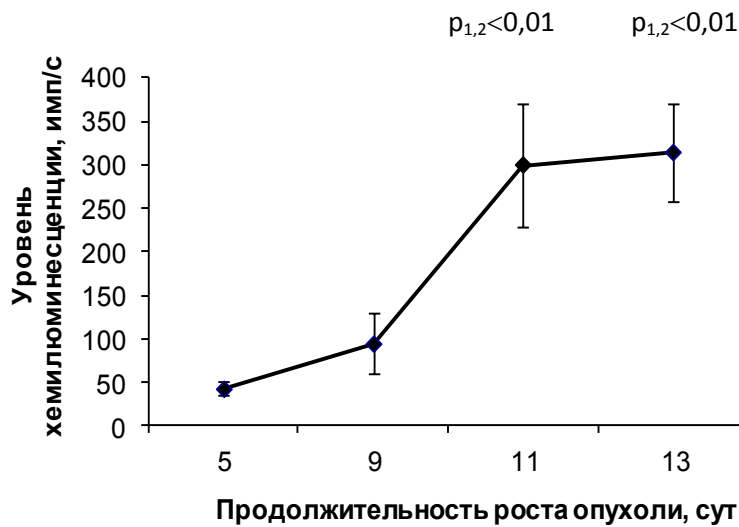


Рисунок 3.43 – Люминол-зависимая хемилюминесценция суспензии клеток асцитной карциномы Эрлиха.

Повысить степень понимания происходящих в клетках процессов помогают методы нейросетевого анализа данных. Так, на рисунке 3.44 представлена средняя информативность исследуемых метаболических параметров в динамике развития опухоли.

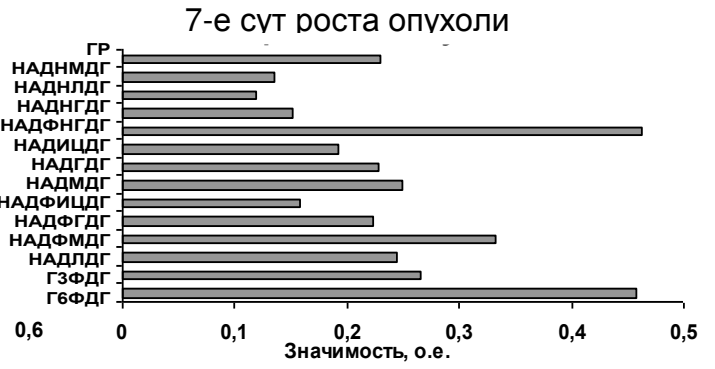
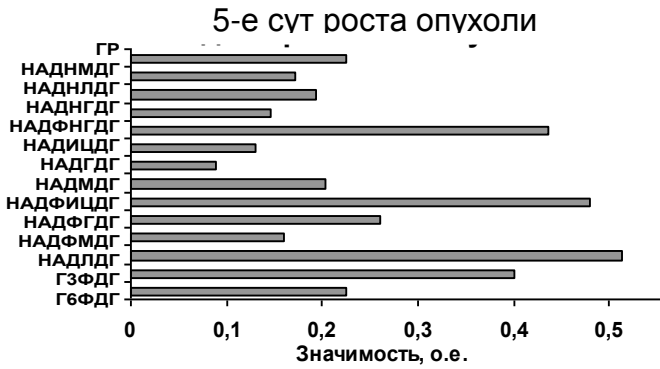
Успешное обучение нейросетевого классификатора осуществлялось всего на 3-х нейронах. После обучения подсчитывалась информативность показателей. Было обнаружено, что вариабельность введенных параметров приводит к вариациям величин информативности. В связи с этим,



рассчитывалась средняя величина информативности при обучении 10 нейросетей для каждой нейросетевой модели.

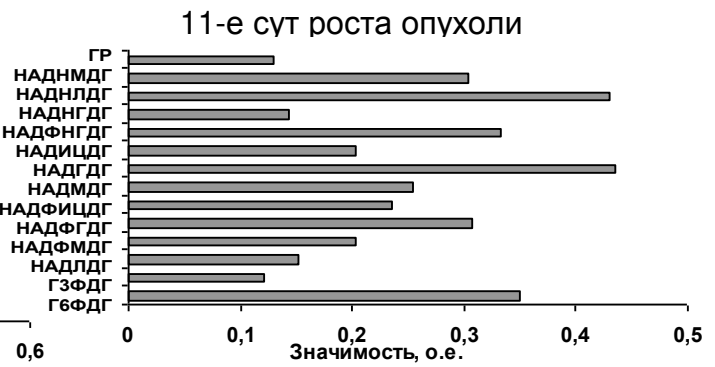
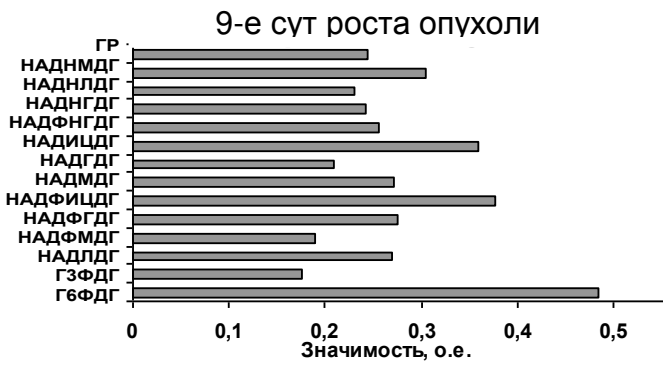
А.

Б.



В.

Г.



Д.

Е.

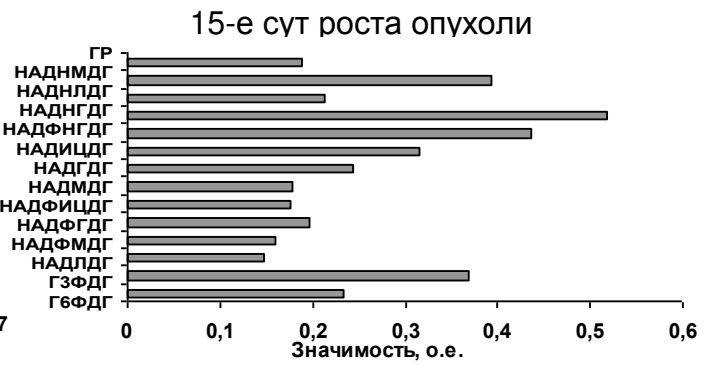
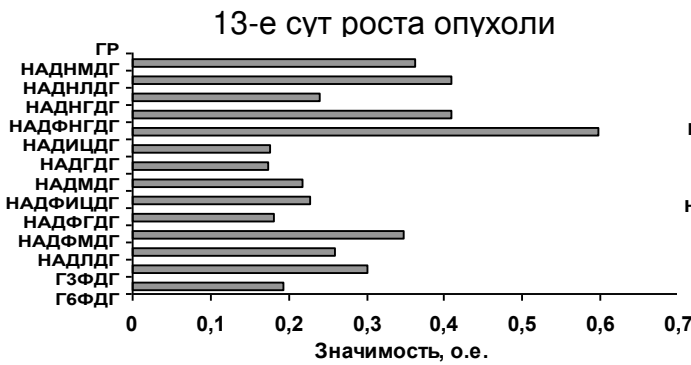


Рисунок 3.44 – Значимость НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ клеток АКЭ в модели нейросетевого предиктора уровня пирувата в динамике опухолевого процесса. Получено в соавт. с Е.Ю. Фоменко.

При исследовании информативности метаболических параметров установлено, на 5-е сут роста опухоли наиболее информативными показателями являются НАДФИЦДГ, ЛДГ, НАДФНГДГ (рисунок 3.44 А). На 7-е сут опухолевого роста наиболее информативными показателями становятся НАДФНГДГ, НАДФМДГ, Г6ФДГ (рисунок 3.44 Б).

На 9-е сут опухолевого процесса наибольшей информативностью обладают ИЦДГ, Г6ФДГ, НАДФИЦДГ (рисунок 3.44 В). На 11-е сут опухолевого роста наибольшей значимостью обладают ГДГ, НАДНЛДГ, Г6ФДГ (рисунок 3.44 Г). Из рисунка 3.44 Д следует, что на 13-е и 15-е сут опухолевого процесса наиболее значимыми показателями, отражающими изменения содержания пирувата становятся НАДНГДГ, НАДФНГДГ, НАДНМДГ.

На протяжении всего исследуемого периода, наиболее значимыми для данного предиктора ферментами являются НАДФ(Н)-зависимые ферменты: НАДФНГДГ – в течение всего исследуемого периода, Г6ФДГ – в течение периода быстрого увеличения массы опухоли, НАДФМДГ и НАДФИЦДГ на 7-е и 9-е сут роста АКЭ соответственно.

Г6ФДГ является лимитирующим ферментом ПФП (Stanton R.C., 2012), и рост уровня значимости Г6ФДГ на стадии быстрого увеличения массы опухоли обусловлен возрастанием потребностей опухолевых клеток в восстановленном НАДФН, который необходим для противодействия окислительным повреждениям клеток и для биосинтетических процессов, среди которых важнейшее, и зачастую критическое значение для жизнедеятельности и выживания клеток, занимает синтез жирных кислот (Furuta E. et al., 2010; Samudio I. et al., 2010; Flavin R. et al., 2011).

Как отмечено выше, высокой информативностью на терминальной стадии обладает НАДНМДГ. В условиях высокого уровня метаболизма, нехватки энергетических ресурсов большое значение приобретает не только уровень внутримитохондриального фосфорилирования, но и интенсивность поступления необходимых для этого процесса компонентов. Одной из

функций этого фермента в клетках является транспорт восстановленного НАД в митохондрии в составе малат-аспартатного шунта. Следовательно, изменение активности НАДН-зависимой МДН приводит к изменениям концентрации в клетках.

Высокая информативность НАДФН-зависимой ГДГ на протяжении всех фаз развития опухоли связан с тем, что данный фермент приводит к образованию глутамата, что актуально для постоянно растущей и делящейся клетки. Кроме того, высокая интенсивность цикла Кребса приводит к образованию большого количества восстановленного НАД. В условиях гипоксии снижается уровень окислительного фосфорилирования, соответственно естественным процессом поддержания необходимой концентрации НАДН является изменение активности НАДФН-зависимой ГДГ.

Кроме того, с развитием опухоли наблюдается снижение значимости ЛДГ, что связано с тем, что с увеличением массы опухоли увеличивается конкуренция за кислород, следовательно, снижается активность ЛДГ и увеличивается активность НАДН-зависимой ЛДГ.

При выполнении работы были также получены данные, косвенно свидетельствующие о принципиальной обратимости дезадаптационных процессов в опухолевых клетках. В частности, было исследовано влияние гипертермического воздействия *in vitro* на индукцию блеббинга в культуре клеток асцитной карциномы Эрлиха. Результаты исследования показали, что гипертермия при температуре от  $+42^{\circ}\text{C}$  способствует индукции блеббинга в культуре клеток (таблица 3.5). Однако такая индукция обратима, и прекращение гипертермического воздействия приводит к почти полному восстановлению морфологического состава клеточной суспензии.

Подтверждением тезиса о принципиальной обратимости наблюдаемых изменений в клетках являются полученные нами ранее результаты, в соответствии с которыми воздействие экстремального фактора – гипертермии, в первые 6 часов после воздействия приводило в гепатоцитах

крыс к снижению интенсивности дыхания клеток и замедлению субстратного потока в ЦТК.

Однако в дальнейшем, через 18 часов после гипертермического воздействия, в клетках увеличивается скорость потребления кислорода и снижается интенсивность гликолиза, возникают условия для усиления биосинтетических процессов, усиливается взаимодействие между реакциями пластического и энергетического обмена с притоком субстратов липидного катаболизма в гликолиз и субстратов аминокислотного обмена в ЦТК (Инжеваткин и др., 2000а – в).

Таблица 3.5 – Доля клеток АКЭ с признаками блеббинга при различных температурах и продолжительности постгипертермического восстановительного периода, в процентах от общего количества клеток, ( $X \pm m$ )

Продолжительность восстановительного периода, мин.	Контроль N=12 1	+40°C N=13 2	+42°C N=11 3
0	2,84±0,71	3,85±0,97	35,00±16,81 p <sub>1,2</sub> <0,001
30	2,75±0,69	3,20±1,2	7,53±4,73 p <sub>1,2</sub> <0,05
90	2,53±0,8	2,83±0,60	5,66±2,31 p <sub>1,2</sub> <0,05

Подводя итог вышесказанному можно отметить, что на протяжении лаг-фазы роста опухоли в клетках АКЭ увеличивается интенсивность аэробного гликолиза, как за счет утилизации глюкозы, так и за счет поступления диоксиацетонфосфата. В пользу данного предположения

говорит значительное увеличение содержания пирувата в клетке с 5-х к 7-м сут.

В то же время активность ЛДГ в анаэробной реакции, а также концентрация лактата в опухолевых клетках снижаются. Также на протяжении лаг-фазы отмечено активизация процессов митохондриального транспорта и ЦТК. Снижается интенсивность поступления глутамата из аминокислотного обмена в ЦТК. Активность фермента, отвечающего за восстановление глутатиона, находится на стабильном уровне в течение всей лаг-фазы.

Фаза экспоненциального роста опухоли характеризуется увеличением интенсивности пластических процессов в клетках АКЭ, что подтверждается увеличением интенсивности ПФП в период с 7 по 9 сут. С увеличением количества опухолевых клеток обостряется нехватка кислорода, что приводит к увеличению роли анаэробного гликолиза.

Активность ферментов ЦТК в опухолевых клетках, в период с 7 по 13 сут остается на стабильно высоком уровне относительно соответствующих параметров в лаг-фазе. Однако, несмотря на высокий уровень ЦТК на протяжении исследуемого периода происходит увеличение соотношения НАД/НАДН, что, вероятно, обусловлено гипогликемией. Уменьшение содержания НАДН приводит к снижению активности митохондриальных транспортных механизмов. Достоверных изменений активности ГР в это время не обнаружено.

На терминальной стадии опухолевого процесса в клетках АКЭ значительно снижены как активность ЛДГ, так и концентрации лактата и пирувата, что по-видимому обусловлено нехваткой глюкозы. Снижается активность ферментов ЦТК, что отражается на интенсивности процесса в целом. В некоторой степени снижение уровня ЦТК компенсируется поступлением субстратов из аминокислотного обмена. Также отмечено снижение интенсивности транспорта пирувата и НАДН в митохондрии. Активность ГР на терминальной стадии также снижается.

Таким образом, наблюдаемые изменения метаболизма в клетках АКЭ отражают механизмы срыва метаболической адаптации опухолевых клеток в ухудшающихся условиях клеточного окружения. Полученные результаты могут быть систематизированы в виде схемы, представленной в таблице 3.6.

Таблица 3.6 – Метаболические механизмы патогенетических изменений клеток АКЭ в процессе роста опухоли у мышей после инокуляции  $3 \times 10^6$  клеток АКЭ

Фаза роста АКЭ	Метаболические особенности	Патогенетическое значение
Лаг-фаза	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ гликолиз</li> <li>↑ ЦТК</li> <li>↑ Глицерофосфатный челночный механизм</li> <li>↓ Активность глутаматдегидрогеназ</li> </ul>	Преобладание энергетических процессов над пластическими Адаптация клеток АКЭ к новым условиям существования
Лог-фаза	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ Анаэробный гликолиз (при оттоке ДОАФ к реакциям липидного обмена, связанным с потребностью клеток в ТАГ)</li> <li>↑ ПФП</li> <li>↑ ЦТК</li> <li>↑ Глицерофосфатный челночный механизм</li> </ul>	Увеличение интенсивности энергетических и пластических процессов. Повышение амфмболической роли ЦТК Усиление защиты клеток от АФК. Оптимальные условия опухолевой прогрессии.
Терминальная фаза	<ul style="list-style-type: none"> <li>↓ ПФП</li> <li>↓ ЦТК (при увеличении притока <math>\alpha</math>-КГ)</li> <li>↓ ГР</li> <li>↑ Поток ГЗФ в гликолиз</li> <li>↓ Анаэробный гликолиз (компенсируется за счет поступления ДОАФ)</li> </ul>	Уменьшение интенсивности метаболических процессов. Снижение пролиферативной активности, гибель опухолевых клеток, гипоксия, ацидоз, общее угнетение обмена веществ.

### 3.6. Особенности обмена веществ в клетках солидной карциномы Эрлиха

При асцитной форме карциномы Эрлиха все клетки опухоли находятся в одинаковых условиях и имеют равный доступ к ресурсам организма через асцитическую плазму и в равной степени подвержены воздействию неблагоприятных факторов опухолевого роста. В случае солидной опухоли ситуация изменяется. Клетки, находящиеся в различных пространственных областях опухоли, в силу различий в степени васкуляризации и межклеточных контактах, имеют неравный доступ к ресурсам и по разному подвергаются воздействию различных факторов, связанных с опухолевым ростом (Husain E.A. et al., 2011; Michor F., Polyak K., 2010; Polyak K., 2011). Это неизбежно должно сказываться на характере обмена веществ клеток опухолевой ткани (Diaz-Cano S.J., 2012). На рисунке 3.45 показано распределение активности ферментов по площади исследованного фрагмента опухолевой ткани.

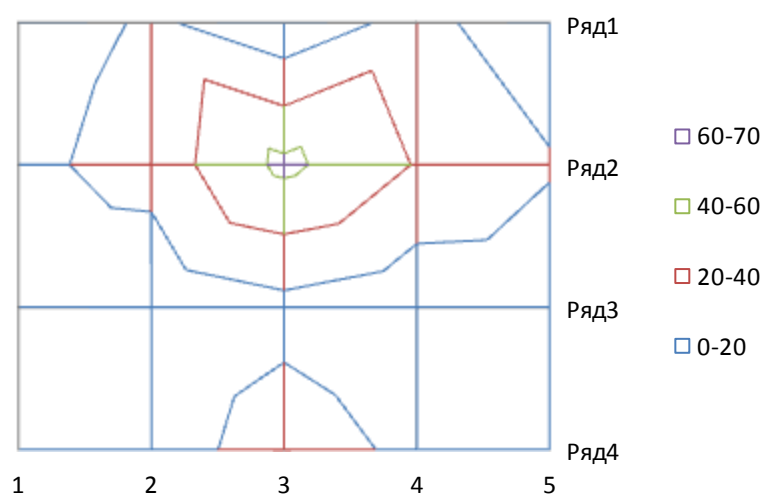


Рисунок 3.45 – Распределение активности НАДИЦДГ на срезе солидной формы карциномы Эрлиха.

Как следует из представленных данных, наибольшая активность НАДИЦДГ наблюдается в центральной области исследуемого фрагмента (ряд 2, столбец 3). Поскольку НАДИЦДГ является одним из лимитирующих

ферментов в реакциях цикла трикарбоновых кислот (ЦТК) (Reitman Z.J., Yan H., 2010), изменение его активности будет оказывать влияние на интенсивность субстратного потока в ЦТК. Ранее мы указывали, что в опухолевых клетках ЦТК функционирует в большой мере в качестве источника субстратов для синтеза аминокислот и жирных кислот, которые необходимы для осуществления интенсивной пролиферации ее клеток (DeBerardinis R J. et al., 2008). Таким образом, высокие значения активности этого фермента в центральной области опухоли могут свидетельствовать о локальном высоком пролиферативном потенциале. В то же время, это может быть свидетельством хорошей оксигенации опухолевой ткани в данной области.

Как показано на рисунке 3.46, активность НАДМДГ достигает максимальных значений в центральной, а также в правой верхней областях исследованного фрагмента (ряд 1, столбец 4; ряд 2, столбец 3).

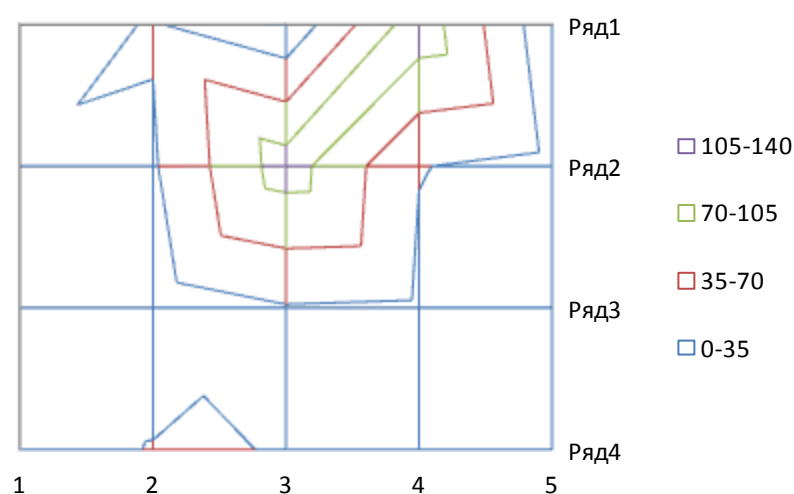


Рисунок 3.46 – Распределение активности НАДМДГ на срезе солидной формы карциномы Эрлиха.

На основании того, что НАДМДГ также является одним из ферментов, определяющих интенсивность субстратного потока в ЦТК, повышение его активности может приводить к увеличению интенсивности аэробных процессов в опухолевых клетках (Ban H.S. et al., 2016).



Максимум активности НАДНМДГ (рисунок 3.47) наблюдается в смежной области по отношению к НАДМДГ (ряд 2, столбец 4), правее и ниже максимума его активности.

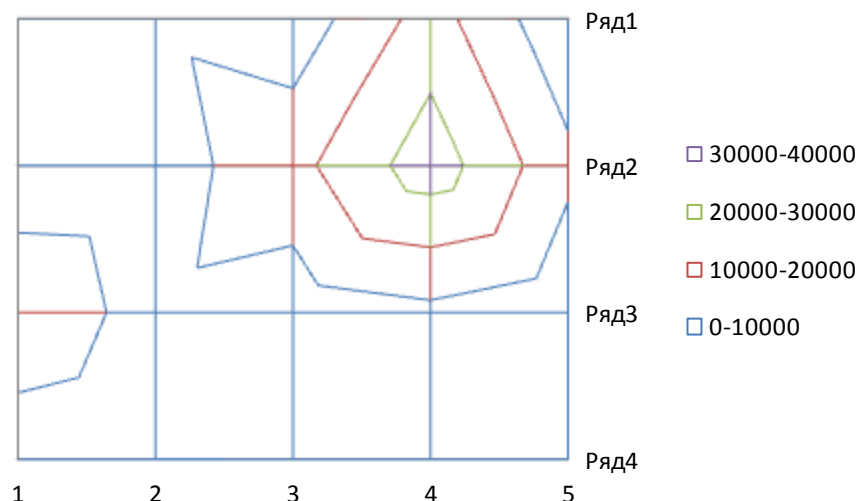


Рисунок 3.47 – Распределение активности НАДНМДГ на срезе солидной формы карциномы Эрлиха.

Поскольку этот фермент участвует в работе малат-аспартатного шунта, можно предполагать высокую активность этого механизма в исследуемой области опухоли. В дальнейшем малат в митохондриях опухолевых клеток может превращаться в оксалоацетат, который в свою очередь становится субстратом для образования аминокислот.

Активность НАДФМДГ и НАДЛДГ достигает максимума в той же области опухоли, что и НАДНМДГ (рисунки 3.48 и 3.49). 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 (Zheng F.-J. et al., 2012).

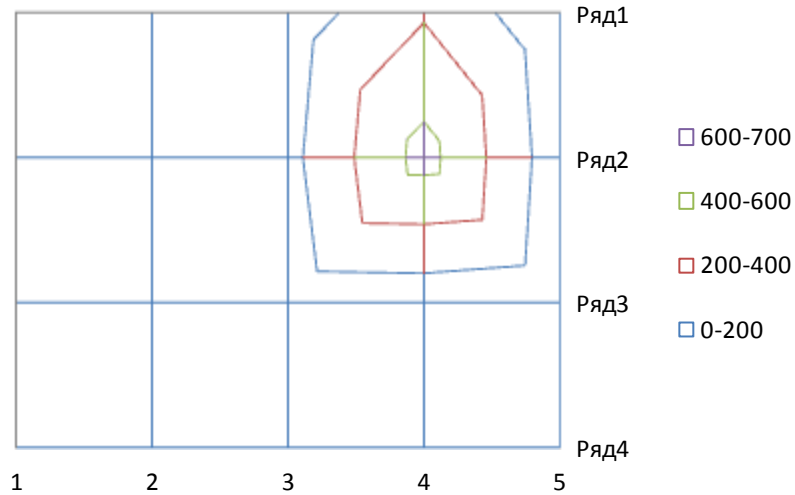


Рисунок 3.48 – Распределение активности НАДФМДГ на срезе солидной формы карциномы Эрлиха.

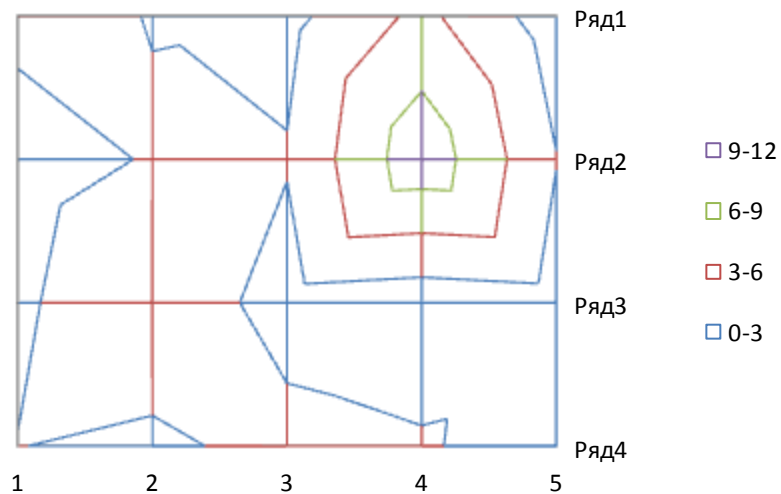


Рисунок 3.49 – Распределение активности НАДЛДГ на срезе солидной формы карциномы Эрлиха.

Высокая активность НАДЛДГ свидетельствует о высоком уровне активности гликолиза, а повышение активности Г6ФДГ в центральной области исследованного фрагмента опухоли (ряд 2, столбец 3) может говорить об усилении в клетках биосинтетических процессов (рисунок 3.50).

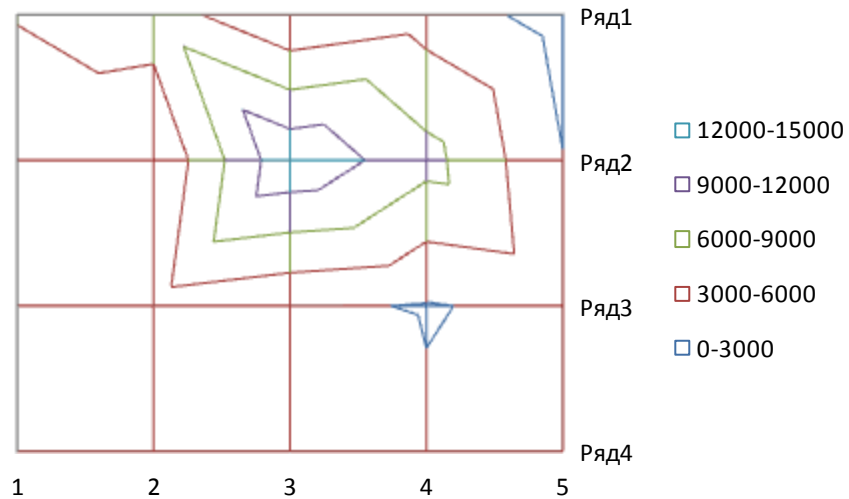


Рисунок 3.50 – Распределение активности Г6ФДГ на срезе солидной формы карциномы Эрлиха.

Как показано на рисунке 3.51, активность Г3ФДГ достигает максимальных уровней на периферии исследуемого фрагмента ткани опухоли. Этот фермент катализирует НАД-зависимое превращение глицерол-3-фосфата, который является предшественником триацилглицеролов, в диоксиацетонфосфат – один из интермедиатов гликолиза (Kelly T.J. et al., 2011).

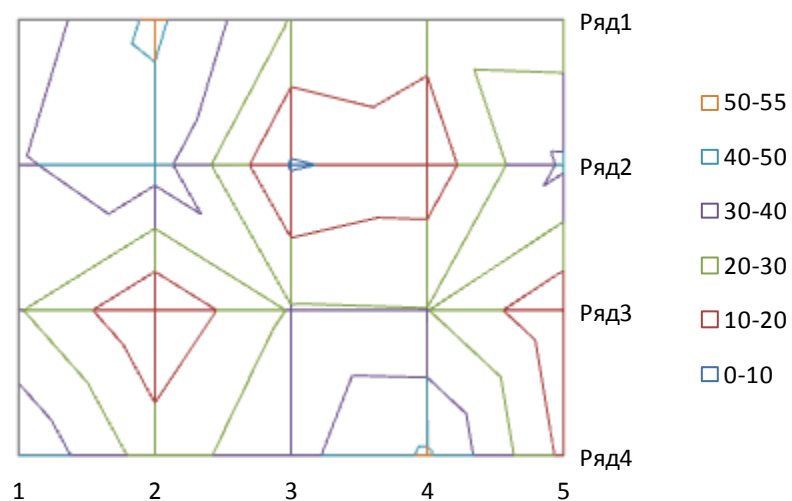


Рисунок 3.51 – Распределение активности Г3ФДГ на срезе солидной формы карциномы Эрлиха.

Высокие значения активности ГЗФДГ могут говорить о возникновении предпосылок для перераспределения субстратов липидного обмена в направлении гликолиза. Однако, низкий уровень активности данного фермента в центральной области исследованного фрагмента опухоли (ряд 2, столбец 3) свидетельствует о преимущественном использовании глицерол-3-фосфата в качестве субстрата для синтеза липидов. Наряду с повышенной активностью Г6ФДГ и другими особенностями метаболизма, характерными для центральной области исследованного фрагмента, это может свидетельствовать о развитии процессов метаболической адаптации опухолевых клеток.

Исходя из наших данных, представленных на рисунке 3.52, наибольший уровень активности НАДФДГ наблюдается в центральной и правой верхней областях исследуемого фрагмента (ряд 1, столбец 4; ряд 2, столбец 3).

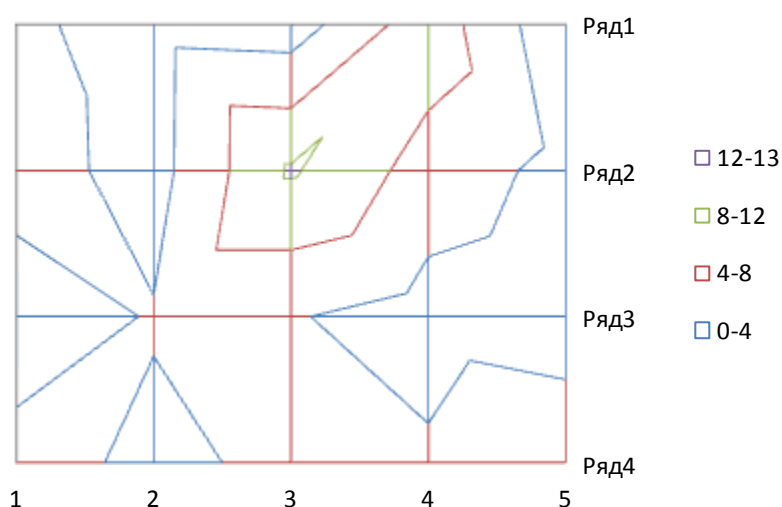


Рисунок 3.52 – Распределение активности НАДФДГ на срезе солидной формы карциномы Эрлиха.

В то же время, активность фермента для НАД-зависимой реакции достигает наибольших значений в смежных областях, как показано на рисунке 3.53. Следовательно, в целом распределение активности реакций

НАДФГДГ и НАДГДГ противоположно: высокий уровень активности НАДФГДГ соответствует пониженному уровню НАДГДГ и наоборот.

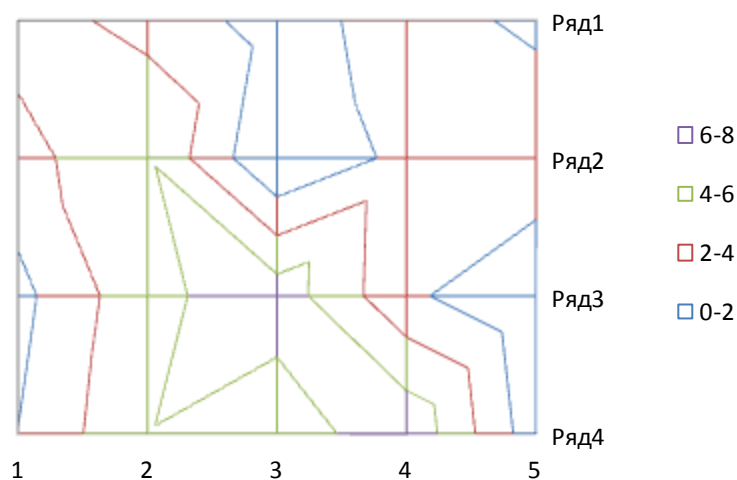


Рисунок 3.53 – Распределение активности НАДГДГ на срезе солидной формы карциномы Эрлиха.

Поскольку эти ферменты связывают пластический и энергетический обмен в клетках, обеспечивая поступление в ЦТК субстратов от аминокислотного обмена в виде  $\alpha$ -кетоглутарата с образованием аммиака, представленные данные говорят об особенностях взаимодействия ЦТК и пластического обмена в соответствующих пространственных областях солидной опухоли.

Таким образом, для солидного варианта карциномы Эрлиха характерна пространственная метаболическая неоднородность, что существенно отличает его от асцитного варианта этой опухоли, особенности которого были представлены выше. 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, что говорит о развитии адапционных процессов в клетках центральной области исследованного фрагмента опухоли и срыве клеточной адаптации на периферии.

### 3.7. Особенности обмена веществ в гепатоцитах у мышей с АКЭ в процессе роста опухоли после инокуляции $3 \times 10^6$ опухолевых клеток

Рассмотренные выше результаты свидетельствуют о значительном влиянии роста опухоли на характер обмена веществ в лимфоцитах крови и макрофагах, инфильтрующей опухоль. В то же время, системное действие опухоли далеко не ограничивается воздействием на клетки иммунной системы. Целесообразным представляется оценить влияние опухолевого роста на характер обмена веществ в клетках тех органов, которые играют наиболее существенную роль в поддержании гомеостаза организма. Важнейшее место среди таких органов принадлежит печени (Jones D.P. et al., 2010; Kasevska M. et al., 2011).

Весьма интересным для данной работы представляется сопоставление метаболических изменений, происходящих при росте АКЭ в гепатоцитах, клетках иммунной системы и клетках самой опухоли. Такое сопоставление позволит выявить общие закономерности протекания адаптивных метаболических процессов в названных тканях либо найти характерные различия. И то и другое существенно расширит наше понимание патогенетических закономерностей онкологических заболеваний.

Как следует из представленных данных (рисунок 3.54), активность НАДИЦДГ печени мышей после внутрибрюшинной инокуляции  $3 \times 10^6$  клеток АКЭ претерпевает изменения, состоящие в снижении активности к 5-м сут роста опухоли с дальнейшим плавным повышением к 13-м сут.

При этом активность НАДФИЦДГ растет в течение всего исследованного периода, как это показано на рисунке 3.55.

Учитывая роль этих двух ферментов в энергетическом обмене клетки, а именно лимитирующую роль НАДИЦДГ для ЦТК (Северин Е.С., 2011) и возможность включаться в ЦТК в качестве вспомогательного фермента для НАДФИЦДГ, рост их активности в течение исследованного периода свидетельствует о создании в гепатоцитах условий для активизации ЦТК.

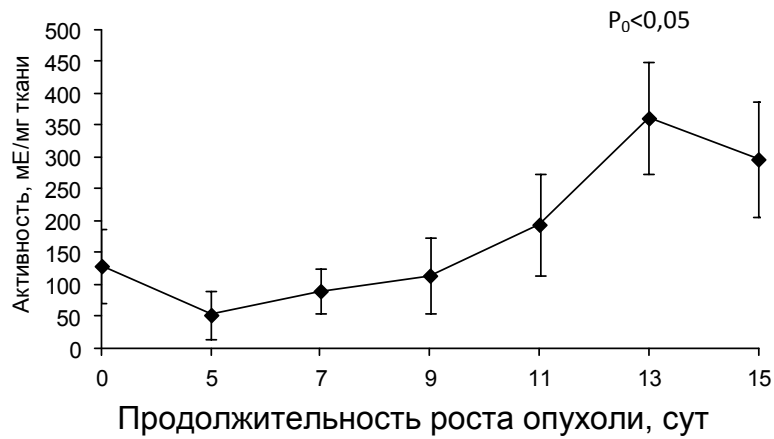


Рисунок 3.54 – Активность НАДИЦДГ в клетках печени у мышей в процессе роста АКЭ.

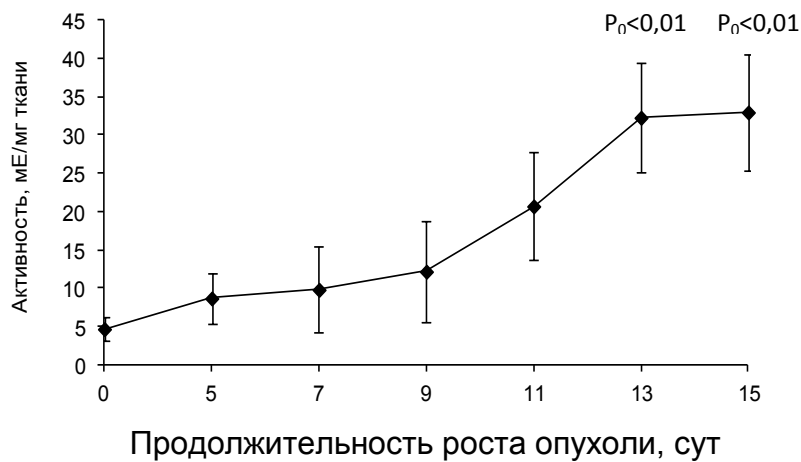


Рисунок 3.55 – Активность НАДФИЦДГ в клетках печени у мышей в процессе роста АКЭ.

При этом активность другого фермента ЦТК, а именно НАДМДГ, представленная на рисунке 3.56, также растет, начиная с 13-х сут после инокуляции клеток АКЭ в организм животных.

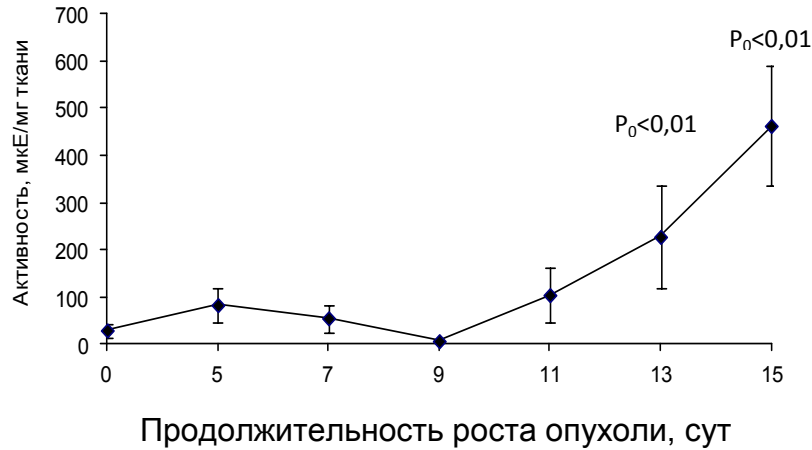


Рисунок 3.56 – Активность НАДМДГ в клетках печени у мышей в процессе роста АКЭ.

Исходя из одновременного роста активности фермента в направлениях как прямой, так и обратной реакций (рисунок 3.57) можно предполагать, что изменения активности связаны с изменением количества белка фермента в клетке, т.е. с усилением процессов транскрипции и трансляции генов МДГ.

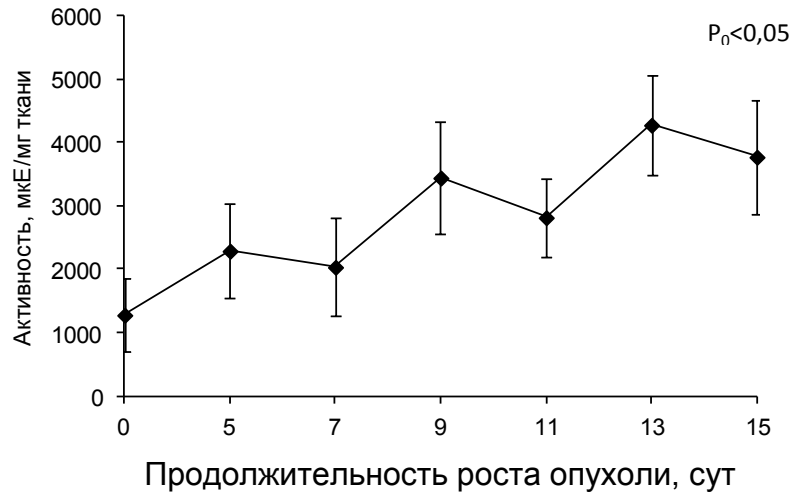


Рисунок 3.57 – Активность НАДНМДГ в клетках печени у мышей в процессе роста АКЭ.



Таким образом, только из анализа данных по трем вышеназванным ферментам можно сделать вывод о том, что в процессе роста АКЭ в печени мышей возникают условия для увеличения скорости субстратного потока в ЦТК, что в целом может характеризовать усиление интенсивности энергетического метаболизма гепатоцитов, а также создание условий для усиления амфиболической роли ЦТК.

Дополняют картину о возникающих условиях для изменения интенсивности реакций, связанных с энергетическим обменом гепатоцитов при внутрибрюшинном росте АКЭ, данные по изменению активности ЛДГ для прямой (рисунок 3.58) и обратной (рисунок 3.59) реакций.

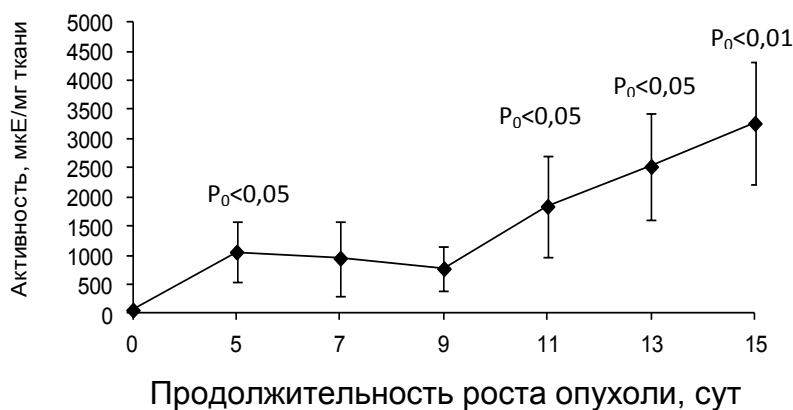


Рисунок 3.58 – Активность НАДЛДГ в клетках печени у мышей в процессе роста АКЭ.

Из этих данных следует, что активность фермента для обоих направлений реакции растет в течение всего исследованного периода, что, во-первых, подтверждает выше высказанное предположение о возникновении в гепатоцитах условий для активизации энергетического обмена, и во-вторых позволяет предполагать, что рост активности фермента связан с повышением количества фермента в клетках, т.е. с повышением уровня экспрессии ЛДГ.

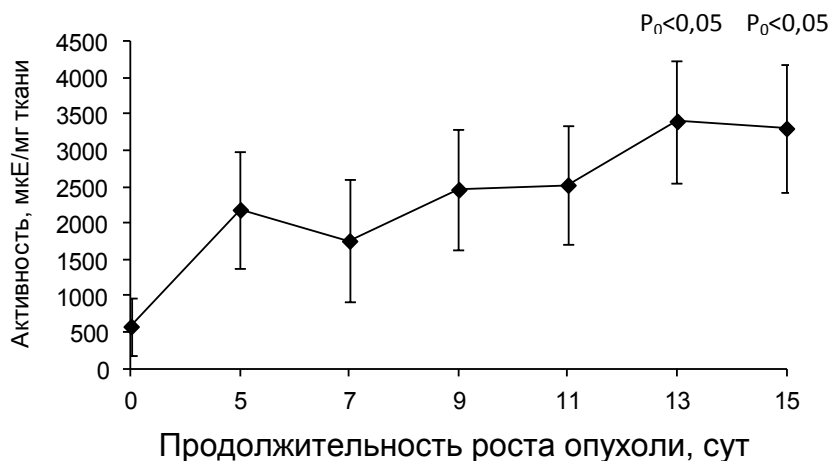


Рисунок 3.59 – Активность НАДНЛДГ в клетках печени у мышей в процессе роста АКЭ.

Сопоставляя данные по активности ЛДГ с приведенными выше данными по активности других ферментов энергетического метаболизма, можно сделать вывод о том, что в процессе роста АКЭ в гепатоцитах мышей возникают условия для усиления воспроизводства энергии.

Активность Г6ФДГ в течение исследованного периода напротив, снижается, как это показано на рисунке 3.60.

Исходя из роли этого фермента в клеточном метаболизме можно предположить, что обнаруженное нами снижение активности Г6ФДГ, наблюдаемое уже на начальном этапе опухолевого роста, может свидетельствовать о возникновении условий для снижения эффективности антиоксидантной защиты клеток.

При этом, как показано на рисунке 3.61, активность НАДФМДГ, также восстанавливающего НАДФ в цитоплазме клетки, напротив, увеличивается в течение всего исследованного периода что, очевидно, в определенной степени компенсирует снижение активности Г6ФДГ.

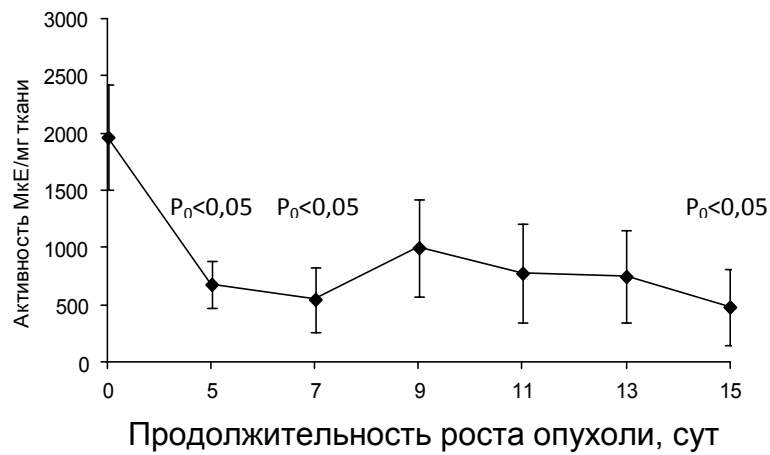


Рисунок 3.60 – Активность Г6ФДГ в клетках печени у мышей в процессе роста АКЭ.

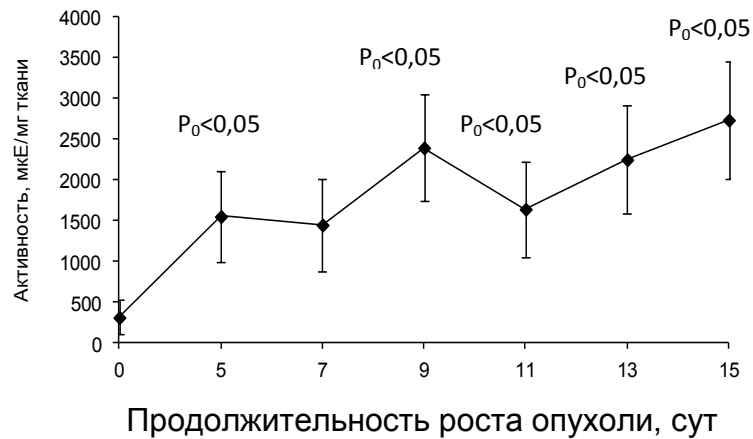


Рисунок 3.61 – Активность НАДФМДГ в клетках печени у мышей в процессе роста АКЭ.

Возрастание активности ГР, наблюдаемое с 9-х сут роста АКЭ (рисунок 3.62), свидетельствует о повышении уровня защиты клеток печени от окислительных повреждений.

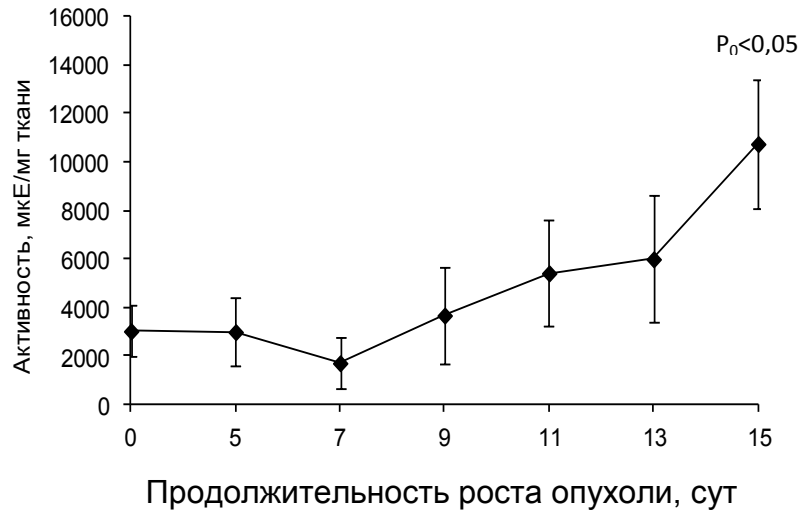


Рисунок 3.62 – Активность ГР в клетках печени у мышей в процессе роста АКЭ.

Несмотря на это, мы отмечаем рост уровня МДА в гомогенатах печени в динамике исследованного периода, как это показано на рисунке 3.63, что свидетельствует о возрастании в печеночной ткани уровня перекисных процессов, приводящих к повреждению липидных молекул клеток.

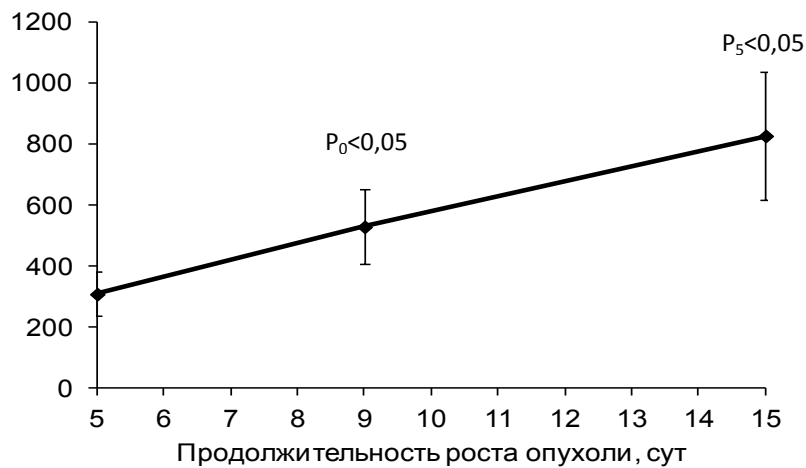


Рисунок 3.63 – Содержание МДА в гомогенате печени мышей с АКЭ в процессе роста опухоли, нмоль/г ткани.

Одновременно наблюдается рост уровня люминол-зависимой хемилюминесценции гомогенатов печеночной ткани, свидетельствующий о повышении уровня АФК (рисунок 3.64).

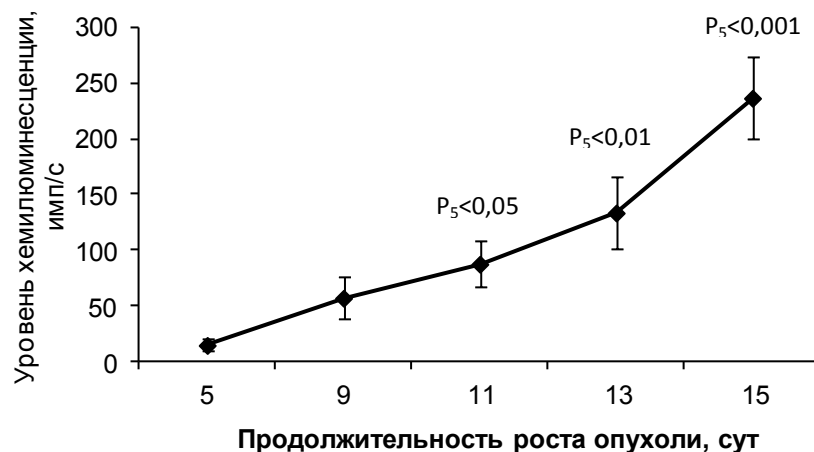


Рисунок 3.64 – Люминол-зависимая хемилюминесценция гомогенатов ткани печени у мышей с АКЭ

Тогда как рост активности ГЗФДГ, показанный на рисунке 3.65, говорит о возникновении и усилении в процессе роста АКЭ условий для оттока субстратов от реакций липидного обмена и направления их к гликолизу, что дополнительно подтверждает наш ранее высказанный тезис о развитии в гепатоцитах условий для усиления интенсивности реакций, связанных с воспроизводством энергии.

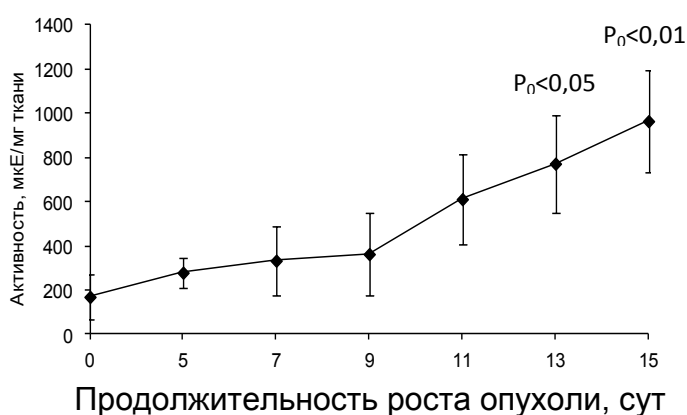


Рисунок 3.65 – Активность ГЗФДГ в клетках печени у мышей в процессе роста АКЭ.

На рисунке 3.66 показаны изменения уровня активности НАД(Ф) ГДГ в клетках печени у мышей в процессе роста опухоли.

Как следует из представленных данных, активность НАДГДГ, НАДНГДГ и НАДФНГДГ возрастает в течение всего исследованного периода, тогда как уровень активности НАДФГДГ снижается к 5-м сут после инокуляции опухолевых клеток в организм животных.

Учитывая роль этих ферментов в метаболических процессах клетки, можно сделать вывод, что в целом, рост АКЭ у мышей характеризуется возникновением в гепатоцитах животных условий для усиления перехода субстратов от ЦТК к реакциям аминокислотного и белкового обмена.

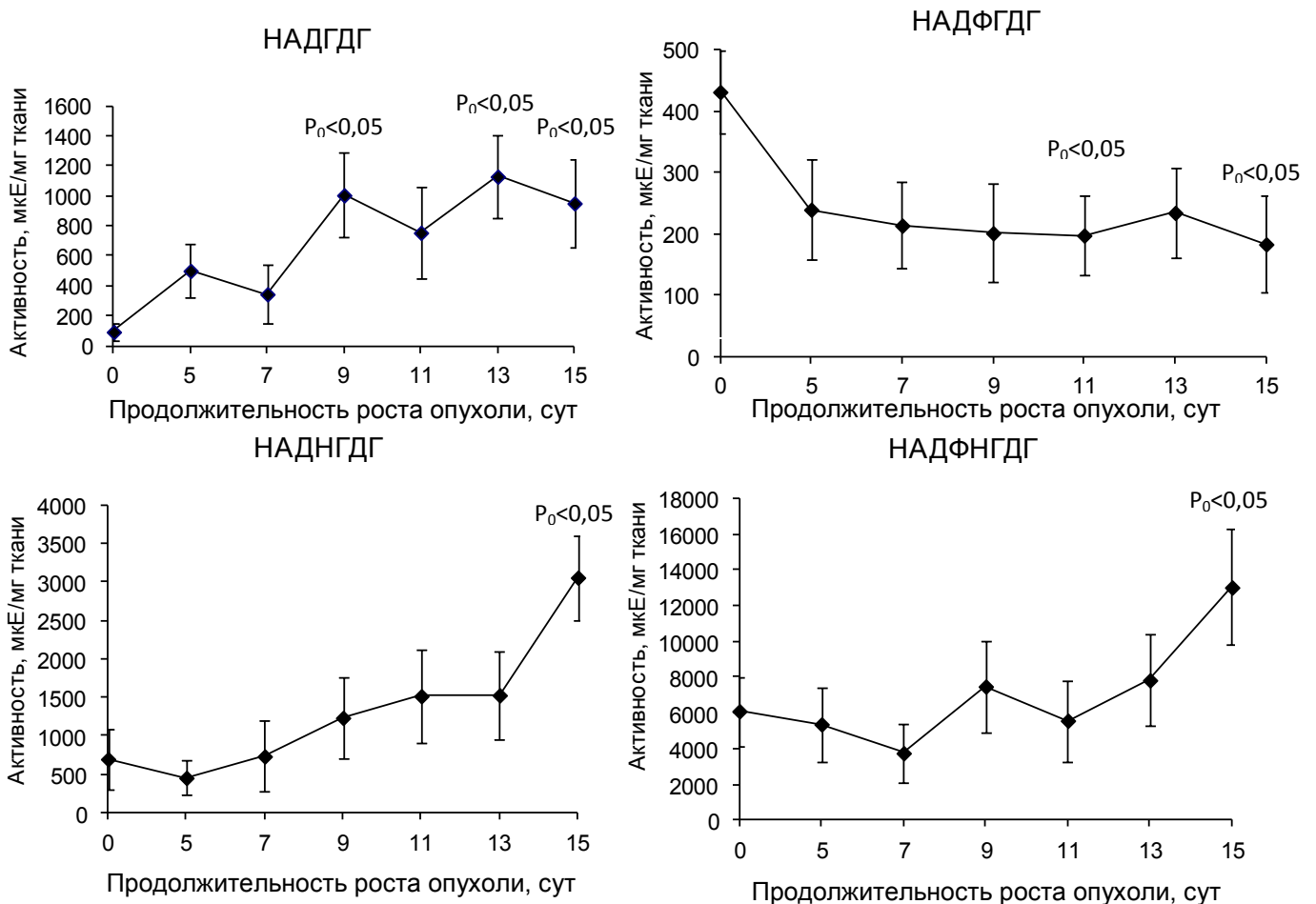


Рисунок 3.66 – Активность НАД(Ф) ГДГ в клетках печени у мышей в процессе роста АКЭ.

Как известно, одной из функций ЦТК является амфиболическая функция, в результате чего ЦТК выступает в роли связующего звена между различными метаболическими процессами в клетке. В соответствии с полученными данными, при приближении к терминальной стадии болезни в гепатоцитах возникают условия для оттока части молекул субстратов от реакций ЦТК к реакциям синтеза в аминокислотном или белковом обмене и, следовательно, для усиления амфиболической роли ЦТК.

Все наши результаты, характеризующие динамику метаболических изменений в печени мышей в процессе роста АКЭ, могут быть систематизированы в виде схемы, представленной в таблице 3.7.

Таблица 3.7 – Метаболические механизмы патогенетических изменений клеток печени у мышей в процессе роста опухоли после инокуляции  $3 \times 10^6$  клеток АКЭ

Условия эксперимента	Особенности обмена веществ	Патогенетическое значение
Печень интактных животных	↓ гликолиз ↓ ЦТК ↓ Поток ГЗФ в гликолиз ↓ уровень глутаматдегидрогеназ ↓ АФК, ПОЛ ↑ ПФП	Относительно невысокая интенсивность биоэнергетических процессов. Низкий уровень обмена субстратами между реакциями пластического и энергетического обмена. Низкая интенсивность перекисных окислительных реакций.
Печень животных в процессе роста АКЭ	↑ гликолиз ↑ ЦТК ↑ Поток ГЗФ в гликолиз ↑ уровень глутаматдегидрогеназ ↑ АФК, ПОЛ ↓ ПФП	Повышение интенсивности биоэнергетических процессов. Возрастание уровня обмена субстратами между реакциями пластического и энергетического обмена. Возрастание интенсивности перекисных окислительных реакций.

Таким образом, в гепатоцитах мышей с АКЭ, в процессе роста опухоли, наблюдаются изменения метаболизма, которые состоят в повышении активности ферментов энергетического обмена, а также в усилении амфиболической роли ЦТК, развивающиеся на фоне роста уровня АФК и перекисного окисления липидов.

Учитывая наши данные по изменениям обмена веществ, которые мы наблюдаем в клетках иммунной системы и в опухолевых клетках, в процессе роста АКЭ, такое состояние клеток печени можно считать состоянием адаптации. Вследствие того, что воздействие опухоли на печень осуществляется более опосредованно, чем на макрофаги, нфильтрующие опухоль, или на клетки крови, интенсивность этого воздействия не достигает критического уровня. В течение всего исследованного периода в печени не успевают развиться изменения, которые бы свидетельствовали о срыве адаптации гепатоцитов, за исключением возрастания уровня перекисных процессов.

Следовательно, характер метаболических изменений различных клеток организма и скорость, с которой развиваются эти изменения в процессе роста опухоли, зависят от интенсивности ее воздействия на них, что определяется особенностями анатомо-физиологических связей соответствующих органов и тканей с опухолью.



## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рост опухоли приводит к развитию в организме местных и системных эффектов, которые являются важнейшими составляющими патогенеза онкологического заболевания. Среди таких эффектов очень важными, с точки зрения исхода заболевания, являются изменения в клетках иммунной системы. Прежде всего, речь идет о патологических нарушениях, снижающих эффективность противоопухолевой иммунной защиты в организме.

Нарушения функций клеток иммунной системы развиваются, как правило, по мере увеличения массы опухоли. Сначала лимфоциты и фагоциты активно используют свой цитотоксический потенциал, но с ростом опухоли их функциональные возможности снижаются. Более того, есть данные, что на определенных этапах опухолевого роста некоторые популяции клеток иммунной системы могут способствовать росту опухоли. Такие изменения в функционировании клеток иммунной системы связывают, в числе прочего, с нарушениями обменных процессов (Serafini P. et al., 2006; Rabinovich G.A. et al., 2007; Козлов В.А. и др., 2009).

Известно, что злокачественные опухоли внепеченочной локализации могут оказывать влияние на характер обменных процессов в гепатоцитах (Kacevska M. et al., 2011). Учитывая важное значение печени как органа поддержания гомеостаза организма, а также с учетом задачи по выявлению неспецифической составляющей в патогенетических изменениях на клеточном уровне, представляется важным исследовать особенности обмена веществ в гепатоцитах мышей с АКЭ в процессе роста опухоли.

С патогенетической точки зрения, важнейшей характеристикой опухолевого процесса является скорость роста опухоли, которая зависит от разновидности опухоли, особенностей организма и характера лечения. В свою очередь, скорость роста опухоли определяет особенности течения заболевания (Enderling H. et al., 2009; Enderling H. et al., 2010). Очевидно, что

различия в кинетических особенностях онкологического процесса могут обуславливать и различия в характере изменений обмена веществ в клетках организма. Актуальным также представляется вопрос о времени начала таких изменений в нормальных клетках организма в ходе онкологического заболевания.

Исследования изменений обменных процессов в клетках организма при различных патологиях тем более актуальны, что в последнее время все большее развитие получают терапевтические подходы, связанные с коррекцией обмена веществ у пациентов (Савченко А.А. и др., 2011; Савченко А.А., Борисов А.Г., 2012).

Целью работы стало установить закономерности изменений внутриклеточных обменных процессов в условиях канцерогенеза у мышей с асцитной карциномой Эрлиха для патогенетического обоснования разработки методов коррекции обмена веществ при онкологических заболеваниях.

Результаты исследований, выполненных на лимфоцитах крови мышей с АКЭ показали, что в течение лаг-фазы роста опухоли, которая составляет до 5-7 сут от момента ее прививки, ведущую роль в энергетическом обмене клеток играют аэробные процессы, при усиленном вовлечении в катаболизм субстратов липидного обмена, в частности глицерол-3-фосфата. Наблюдается значительное уменьшение интенсивности ПФП, что должно приводить к замедлению пластических процессов, в частности синтеза нуклеотидов вследствие замедления синтеза рибозы, и биосинтеза жирных кислот вследствие снижения скорости восстановления НАДФ.

Интенсивность ЦТК на протяжении всей лаг-фазы остается стабильной. При этом уменьшается активность глутаматдегидрогеназ, и следовательно, происходит ослабление связи между реакциями ЦТК и обмена аминокислот. Снижение интенсивности малатаспартатного шунта, которое, по нашим данным, может происходить в это время вследствие уменьшения уровня активности МДГ, до некоторой степени компенсируется

увеличением уровня транспорта НАДН в глицерофосфатном челночном механизме. Таким образом, в целом, лаг-фаза роста опухоли характеризуется высоким уровнем энергетических реакций лимфоцитов при снижении интенсивности пластических процессов.

На наш взгляд, совокупность описанных изменений можно трактовать как отражение метаболических механизмов адаптации лимфоцитов к незначительному уровню воздействующих на них факторов опухолевого процесса. Клетка перераспределяет субстратные потоки в пользу интенсификации энергетического обмена за счет не критичного снижения интенсивности биосинтеза.

Далее наступает фаза логарифмического роста опухоли, соответствующая стадии выраженных проявлений болезни, которая характеризуется быстрым увеличением интенсивности воздействия на лимфоциты факторов опухолевого процесса. В этот период наблюдается повышение интенсивности как биоэнергетических, так и синтетических процессов. Возникают условия для увеличения интенсивности гликолиза. В результате увеличения активности МДГ и ГЗФДГ формируются условия для увеличения активности малат-аспартного и глицерофосфатного челночных механизмов, что обуславливает усиление транспорта НАДН из цитозоля в митохондрии и интенсивный ход реакций окислительного фосфорилирования. При этом возрастает интенсивность ПФП, увеличивается активность антиоксидантной защиты клеток, а также усиливается аминирование  $\alpha$ -кетоглутарата, чем обеспечивается его отток от ЦТК к реакциям обмена аминокислот.

Согласно данным литературы, усиление аэробных процессов в клетках и усиление клеточной защиты от повреждений активными формами кислорода является важным условием для выживания клеток при воздействии неблагоприятных факторов (Calabrese V. et al., 2010; Tew K.D., Townsend D.M., 2012). Увеличение активности Г6ФДГ в условиях развития окислительного стресса рассматривается как адаптивная реакция клеточного

метаболизма, так как способствует увеличению уровня НАДФН и как следствие, росту уровня восстановленного глутатиона в клетке (Xu Y. et al., 2010; Stanton R.C., 2012).

Выявленные нами метаболические изменения лимфоцитов в обсуждаемый период опухолевого роста также можно трактовать как дальнейшее развитие адаптации обмена веществ к меняющимся условиям существования – как мобилизацию всех имеющихся метаболических ресурсов клеток.

В терминальную стадию болезни в лимфоцитах крови наблюдается значительное уменьшение интенсивности как биоэнергетических, так и синтетических процессов. Наши данные свидетельствуют о снижении уровня гликолиза при резком снижении активности исследованных нами ферментов ЦТК. Интенсивность функционирования малат-аспартного и глицерофосфатного челночных механизмов, а также ПФП и антиоксидантной защиты также находится на низком уровне. Такие изменения, по нашему мнению, характеризуют метаболические механизмы срыва адаптации лимфоцитов в условиях интенсивного воздействия факторов опухолевого процесса.

Необходимо отметить, что подобные изменения метаболизма, связанные с развитием адаптационных и дизадаптационных процессов в лимфоцитах, были отмечены и в других исследованиях.

Так, было обнаружено, что у больных немелкоклеточным раком легкого в лимфоцитах крови происходит уменьшение активности аэробных и анаэробных энергетических процессов, коррелирующее с увеличением размеров опухоли. В частности, происходит примерно двукратное уменьшение активности НАДИЦДГ, НАДМДГ, НАДНМДГ, в несколько раз снижается активность НАДНЛДГ (Лапешин П.В. и др., 2005).

Показано, что развернутая и терминальная стадии хронического миелолейкоза характеризуется снижением в лимфоцитах интенсивности гликолиза, ЦТК, митохондриального транспорта, катаболизма липидов,

уровня антиоксидантной защиты по сравнению с лимфоцитам здоровых людей, что также сопровождается развитием иммунодефицитного состояния (Смирнова О.В. и др., 2007).

Развитие метастазов рака шейки матки сопряжено со снижением активности ферментов ЦТК и гликолиза в лимфоцитах циркулирующего пула по сравнению с такими же показателями у больных без метастазов. Проведение антиметастатической химиотерапии способствовало увеличению активности сукцинатдегидрогеназы и эффективности функционирования ЦТК (Калабанова Е.А. и др., 2011).

В работе (Савченко А.А., Манчук В.Т., 2003) было показано, что адаптация организма человека к условиям Крайнего Севера сопровождается активацией аэробных энергетических процессов лимфоцитов с увеличением оттока субстратов от реакций пластического обмена к реакциям энергетического обмена. Однако, в случае срыва адаптации, наблюдается ингибирование энергетических процессов лимфоцитов и нарушаются взаимосвязи различных метаболических процессов в клетках, что сопровождается возникновением иммунодефицитного состояния. Похожие изменения выявлены и в метаболизме лимфоцитов крови у подростков с хроническими вирусными гепатитами (Соловьева И.А. и др., 2011).

Подводя итог исследованиям метаболических изменений в лимфоцитах крови, в процессе роста опухоли после введения  $3 \times 10^6$  и  $1 \times 10^4$  клеток АКЭ, можно представить следующую схему метаболических изменений (рисунок 4.1).

Также важно отметить, что в последние годы особая значимость придается исследованиям функциональных и метаболических особенностей клеток иммунной системы, инфильтрующей опухоль. Появились многочисленные данные, свидетельствующие в пользу того, что клетки иммунной системы, такие как лимфоциты, макрофаги, нейтрофилы, дендритные клетки, попадая в опухолевое микроокружение, перестают выполнять свои функции и даже могут способствовать усилению

опухолевого роста, благодаря вырабатываемым ими факторам роста сосудов и других биологически активных веществ (Mathivanan S. et al., 2010; Corcoran C. et al., 2011; Condeelis J., Pollard J.W., 2006; Kalish S.V. et al., 2015; Henze A.T., Mazzone M., 2016).

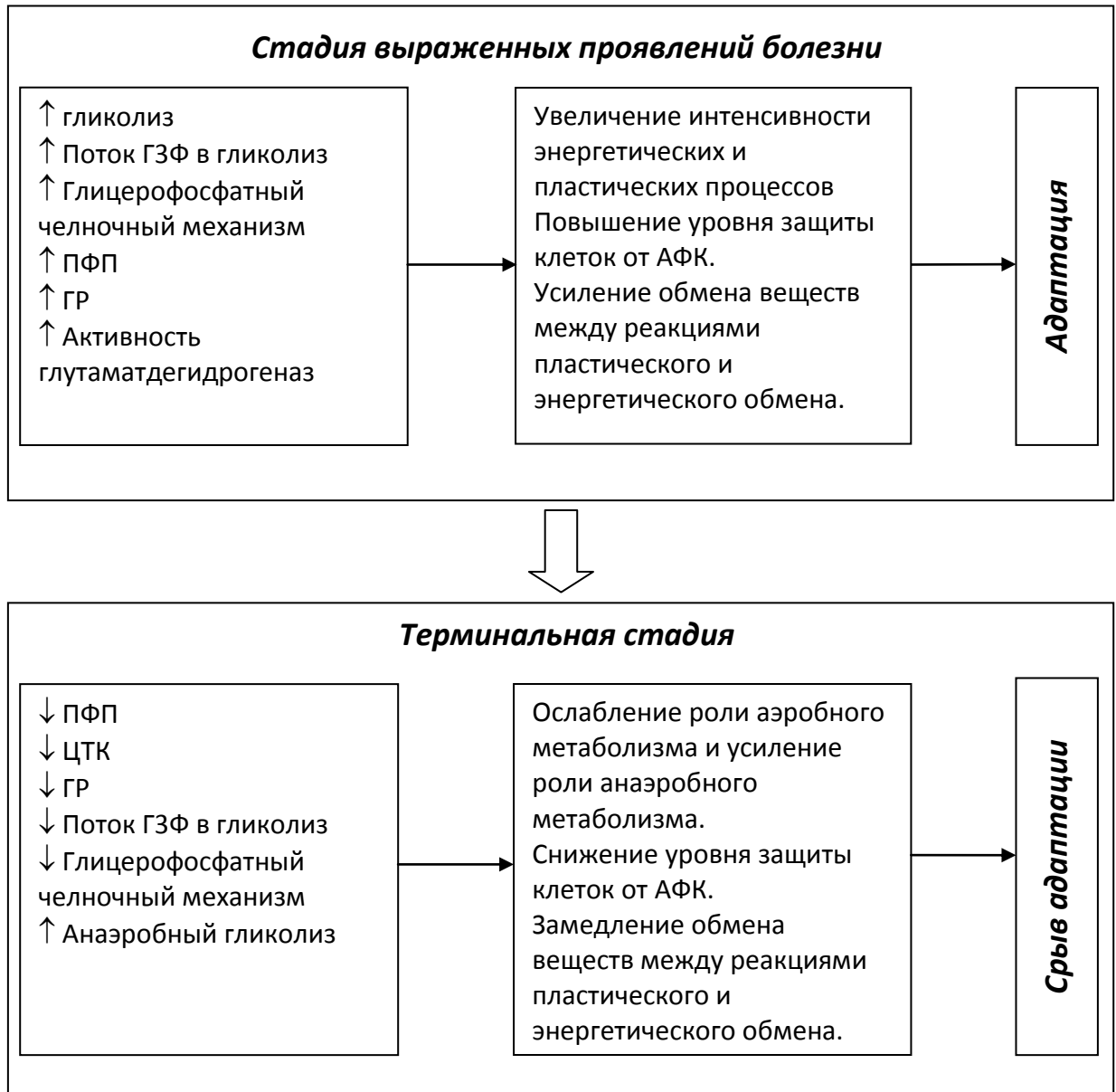


Рисунок 4.1 – Метаболические механизмы адаптации и срыва адаптации лимфоцитов крови у мышей в процессе роста АКЭ.

Учитывая значимость макрофагов в противоопуховом иммунном ответе, мы исследовали особенности метаболизма макрофагов,

инфильтрующей опухоль, у мышей с АКЭ в процессе роста опухоли.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что в процессе роста АКЭ в макрофагах возникают условия для снижения интенсивности субстратного потока в цикле трикарбоновых кислот, замедления окислительного дезаминирования глутамата, регенерации НАДФН и для уменьшения мощности антиоксидантной защиты клеток (рисунок 4.2.).

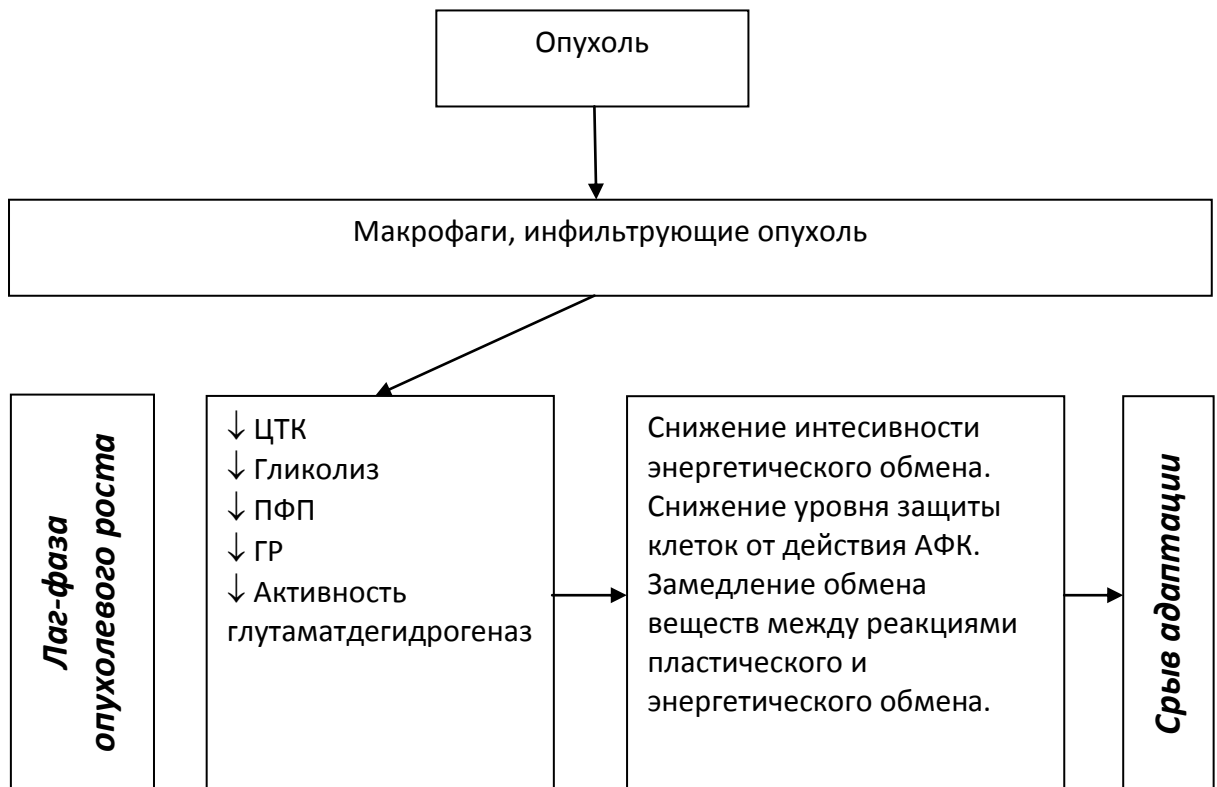


Рисунок 4.2 – Метаболические механизмы срыва адаптации макрофагов, инфильтрующих опухоль, у мышей в процессе роста АКЭ.

По результатам наших исследований обращает на себя внимание значительное сходство метаболических изменений в лимфоцитах крови в процессе роста АКЭ у мышей и метаболических изменений, происходящих в то же время в клетках самой опухоли.

Так, ляг-фаза опухолевого роста характеризуется увеличением интенсивности аэробного гликолиза в клетках АКЭ при усилении вовлечения в него глицерол-3-фосфата, на фоне активизации ЦТК и транспорта НАДН в

митохондрии. При этом уменьшается интенсивность ПФП и обмена  $\alpha$ -кетоглутарата между ЦТК и реакциям метаболизма аминокислот.

Фаза экспоненциального роста опухоли характеризуется увеличением интенсивности пластических процессов в клетках АКЭ. В частности, происходит рост интенсивности ПФП в период с 7 по 9 сут. Повышение интенсивности ПФП связывают с усилением пролиферативного потенциала опухолевых клеток, поскольку в ПФП происходит регенерация НАДФН, необходимого для синтеза липидов, а также синтезируется рибозо-5-фосфат, участвующий в биосинтезе нуклеотидов (Swierczynski et al., 2014).

При этом усиливается анаэробный гликолиз. Активность ферментов ЦТК в опухолевых клетках в этот период остается на стабильно высоком уровне относительно лаг-фазы.

Известно, что опухолевые клетки обладают рядом метаболических особенностей по сравнению с клетками нормальных тканей организма (Toschi A. et al., 2010; Martinez-Outschoorn U.E. et al., 2011). Однако это не снижает значимости адаптации метаболизма опухолевых клеток при ухудшении условий их микроокружения. В частности, они способны активно перераспределять субстраты между различными метаболическими путями, обеспечивая высокую степень интеграции своего метаболизма (Kroemer G., Pouyssegur J., 2008; DeBerardinis R J. et al., 2008).

Например, активация экспрессии гипоксия-индуцибельного фактора (HIF) в опухолевых клетках в условиях гипоксии приводит к усилению анаэробной утилизации глюкозы (Brahimi-Horn M.C. et al., 2011; Semenza G.L., 2012). Образующиеся при этом в больших количествах лактат и пируват выделяются из опухолевых клеток в окружающую их среду (Martinez-Outschoorn U.E. et al., 2011; Wu X.H. et al., 2013), что является одним из факторов супрессии клеток иммунной системы (Fischer K. et al., 2007). Кроме того, ингибируя пируватдегидрогеназный комплекс, HIF-1 уменьшает интенсивность окислительного декарбоксилирования пирувата



(Kim J.W. et al., 2006; Papandreou I. et al., 2006), а также уменьшает биогенез митохондрий (Zhang H. et al., 2007).

ЦТК не утрачивает своего значения для опухолевых клеток в качестве источника субстратов биосинтеза некоторых аминокислот. При этом усиление субстратного потока по ЦТК в клетках опухолей происходит благодаря конвертации пирувата в оксалоацетат пируваткарбоксилазой либо при превращении глутамин в  $\alpha$ -кетоглутарат (DeBerardinis R J. et al., 2007; DeBerardinis R J. et al., 2008).

Перечисленные процессы обеспечивают опухолевую клетку энергетическими и пластическими ресурсами, необходимыми для активной пролиферации, обеспечения собственного гомеостаза и реализации механизмов клеточной адаптации.

Исходя из собственных экспериментальных данных мы можем заключить, что наблюдаемые изменения метаболизма в клетках АКЭ в лаг-фазу и фазу экспоненциального роста опухоли отражают действие адаптационных механизмов, направленных на увеличение уровня обеспечения клеток энергетическими и пластическими ресурсами при поддержании интенсивной пролиферации опухолевых клеток.

По нашим данным, в терминальную стадию болезни у животных в клетках АКЭ отмечено значительное снижение активности ЛДГ и концентрации лактата, что по-видимому обусловлено нехваткой глюкозы и других субстратов, способных включаться в гликолиз. Снижается интенсивность ЦТК и транспорта пирувата и НАДН в митохондрии. К этому времени также уменьшается уровень активности ГР по сравнению с предшествующими фазами роста опухоли, что свидетельствует об уменьшении возможностей клеток для защиты от воздействия АФК.

Следовательно, терминальная стадия болезни, соответствующая фазе плато на кривой опухолевого роста, характеризуется в отношении клеток АКЭ ухудшением условий клеточного окружения, и как следствие,

нарушением течения метаболических процессов, что является отражением метаболических механизмов срыва клеточной адаптации.

Наряду с временной динамикой, полезно оценить пространственные изменения обмена веществ в клетках солидной опухоли. Так, мы обнаружили, что для солидного варианта карциномы Эрлиха характерна пространственная метаболическая неоднородность. В частности, для центральной области исследованного фрагмента опухоли характерно усиление энергетического метаболизма, а также возникновение условий для увеличения интенсивности процессов биосинтеза по сравнению с периферическими областями, что говорит о развитии адаптационных процессов в клетках центральной области исследованного фрагмента опухоли и срыве клеточной адаптации на периферии. Таким образом, пространственная метаболическая неоднородность солидной опухоли отражает те же изменения, связанные с ухудшением состояния опухолевого микроокружения, которые ранее наблюдались в динамике роста асцитной опухоли Эрлиха.

На основе динамики метаболических изменений в клетках асцитной опухоли, и учитывая характер изменения активности ферментов в клетках различных областей солидной карциномы Эрлиха, можно предложить схему метаболических изменений, отражающую зависимость метаболических особенностей клеток опухоли от силы воздействия факторов опухолевого процесса (рисунок 4.3.).

Состояние клеток АКЭ в период до окончания лог-фазы роста опухоли можно рассматривать как адаптированное к условиям клеточного микроокружения. Очевидно, что эти условия являются наиболее благоприятными для активной пролиферации клеток АКЭ. По мере роста опухоли происходит истощение организма, развитие раковой кахексии. Условия, в которых находятся клетки опухоли, ухудшаются, что отражается на характере протекающих в них метаболических процессов.

Рассмотренные выше результаты свидетельствуют о значительном влиянии опухолевой прогрессии на характер метаболизма клеток иммунной системы и клеток самой опухоли. Учитывая наличие системных эффектов при опухолевом росте, представляется важным изучение особенностей влияния опухоли на органы, обеспечивающие гомеостаз организма, и в частности, на печень. Интересным является и сопоставление происходящих изменений в таких органах с изменениями, происходящими в клетках иммунной системы и опухолевых клетках.

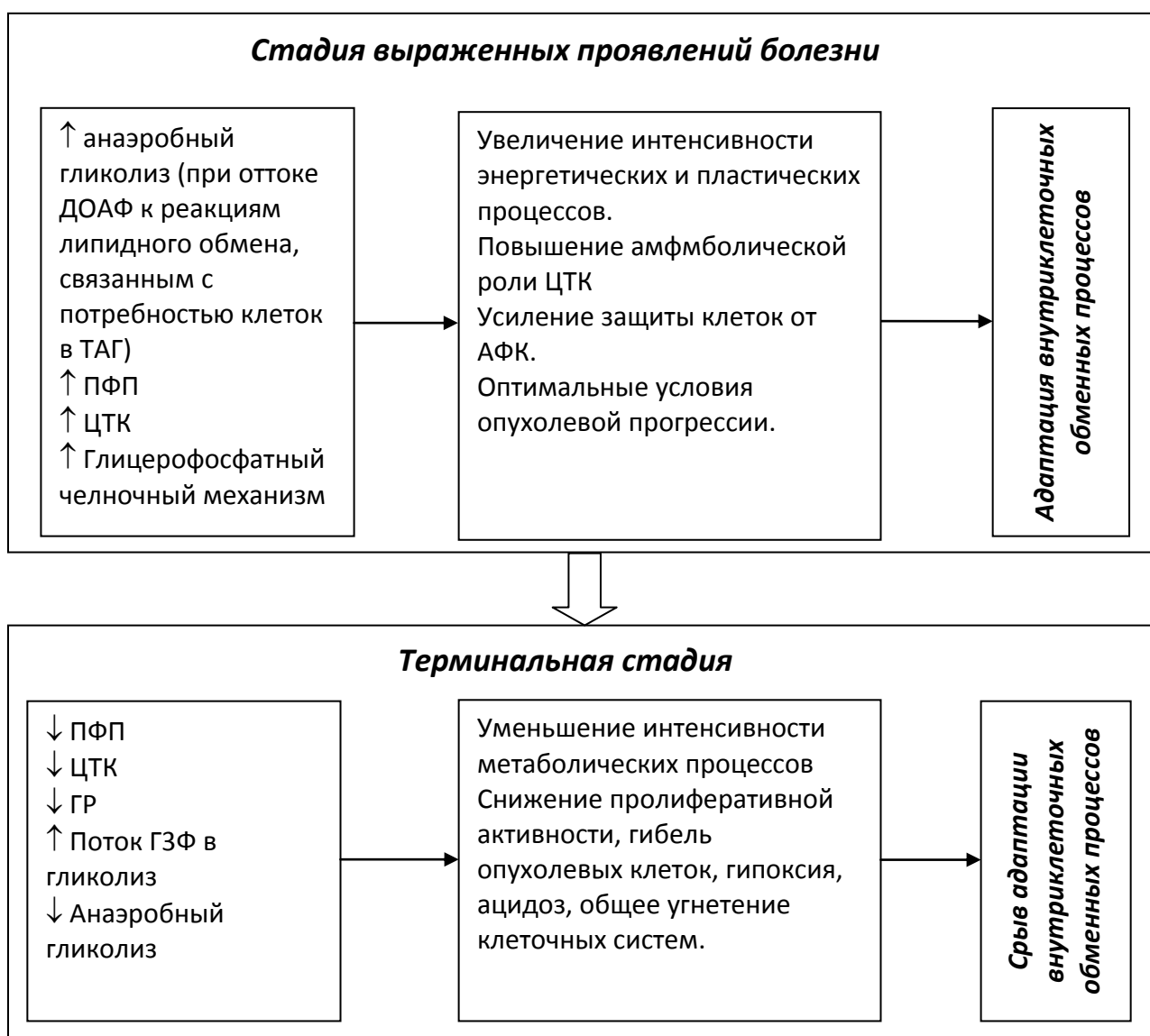


Рисунок 4.3 – Метаболические механизмы адаптации и срыва адаптации клеток АКЭ у мышей в процессе роста опухоли.

Представленные в работе данные по уровню активности НАДИЦДГ, НАДФИЦДГ, НАДМДГ, НАДЛДГ и НАДНЛДГ позволяют утверждать, что в процессе роста АКЭ в гепатоцитах возникают условия для активизации энергетического обмена. Возрастание активности ГЗФДГ свидетельствует об усилении потока субстратов липидного обмена в гликолиз и о формировании условий для увеличения активности глицерофосфатного челночного механизма, что также способствует усилению интенсивности энергетического обмена. Увеличение активности НАДНГДГ и НАДФНГДГ свидетельствует об усилении субстратного потока от ЦТК к синтетическим реакциям белкового обмена.

Выявленное снижение активности Г6ФДГ может обуславливать ослабление интенсивности ПФП и связанных с ним биосинтетических процессов. Рост активности ГР в течение всего рассматриваемого периода свидетельствует об усилении способности клеток к антиоксидантной защите на фоне повышения уровня перекисных процессов.

Учитывая уже обсуждаемые выше результаты, описывающие метаболические изменения клеток иммунной системы и опухоли, такое состояние клеток печени можно считать состоянием адаптации. Вследствие того, что воздействие факторов онкологического процесса на печень осуществляется более опосредованно, чем на клетки крови или клетки самой опухоли, интенсивность их воздействия на этот орган не достигает критического уровня. В течение всего исследованного нами периода, в печени не успевают развиться изменения, которые бы свидетельствовали о срыве адаптации метаболических систем данного органа, за исключением повышения уровня перекисных процессов. На рисунке 4.4 полученные результаты представлены в виде схемы.

Следовательно, характер изменений обменных процессов в различных клетках организма и скорость, с которой развиваются эти изменения в процессе роста опухоли, зависят от интенсивности воздействия на них

факторов опухолевого процесса, что определяется особенностями анатомо-физиологических связей соответствующих органов и тканей с опухолью.

Исходя из представленных результатов можно предположить, что метаболические изменения клеток в организме в условиях роста опухоли носят неспецифический характер по отношению к типу исследуемых клеток и зависят лишь от интенсивности воздействия на них факторов, связанных с присутствием опухоли в организме. Возможно, клетки отвечают сходными неспецифическими изменениями метаболизма и на воздействие других неблагоприятных факторов.



Рисунок 4.4 – Метаболические механизмы адаптации гепатоцитов у мышей с АКЭ в процессе роста опухоли

Так, согласно опубликованным данным, при воздействии на клетки HeLa рентгеновского излучения наблюдали рост активности Г6ФДГ, ЛДГ и

пируваткарбоксилазы, концентрации АТФ и лактата, что расценивалось наряду с повышением уровня утилизации глюкозы и ростом интенсивности гликолиза как метаболические изменения, способствующие повышению уровня радиорезистентности клеток (Bing Z. et al., 2014). Рост активности ПФП, с перераспределением субстратного потока от реакций гликолиза, рассматривается в качестве ответа на окислительный стресс, поскольку приводит к увеличению в клетке соотношения НАДФН/НАДФ, которое имеет важное значение для защиты клеток от окислительных повреждений (Grant C.M., 2008).

Также отметим, что выраженное снижение активности ферментов ПФП и ЦТК, в частности Г6ФДГ, НАДИЦДГ и НАДМДГ, было обнаружено в тромбоцитах пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС) по сравнению с тромбоцитами здоровых людей. Кроме того, в тромбоцитах людей с ИБС был снижен уровень других ферментов клеточного метаболизма, в частности НАДГДГ и НАДФГДГ (в 8.6 и в 18.6 раза соответственно), которые обеспечивают включение в энергетический метаболизм продуктов аминокислотного обмена (Савченко А.А. и др., 2006).

Таким образом, есть основания предполагать, что наблюдаемые нами изменения в обмене веществ в клетках организма мышей с АКЭ в процессе роста опухоли являются неспецифическими не только по отношению к типу исследованных тканей, но и по отношению к типу действующего патогенетического фактора. С позиции фундаментальной науки, представляется важным сопоставить изменения в обменных процессах, которые наблюдаются в клетках организма в процессе роста опухоли, с изменениями, развивающимися в ответ на действие экзогенного экстремального фактора. Это позволило бы обнаружить неспецифические элементы в реагировании клеток на действие неблагоприятных условий.

Ранее мы исследовали метаболические изменения, происходящие в организме в условиях адаптации к действию гипертермии. В качестве объекта исследований была выбрана печень, как орган, играющий важную

роль в поддержании гомеостаза организма. При этом использовали метод управляемой перфузии изолированной печени крысы, а также исследовали активность ферментов.

Животных подвергали гипертермическому воздействию в водяной бане, после чего через 1, 6 и 18 ч осуществляли перфузию изолированной печени с контролем параметров ее жизнедеятельности в течение 90 мин. При этом измеряли интенсивность дыхания органа, скорость поглощения глюкозы, выхода лактата и пирувата. По окончании перфузии в печеночной ткани измеряли активность вышеназванных ферментов. Результаты этих экспериментов представлены в ранее опубликованных работах (Инжеваткин Е.В. и др., 2000а – в).

В соответствии с результатами этих исследований, в первые 1 – 6 часов после гипертермического воздействия в печени животных, в условиях перфузии изолированного органа, происходит снижение скорости дыхания на 10 – 30 % по сравнению с контролем при усилении анаэробного гликолиза и нарушении механизмов регуляции реакций энергетического обмена (Инжеваткин Е.В. и др., 2000а – в). Замедляется субстратный поток в ЦТК, снижается поступление в гликолиз субстратов липидного катаболизма и возникают условия для снижения активности глицерофосфатного челночного механизма. Такие изменения можно трактовать как отражение механизмов срыва адаптации клеточного метаболизма в результате повреждения клеток в экстремальных условиях.

К 18-му часу после гипертермического воздействия в гепатоцитах увеличивается скорость потребления кислорода, приближаясь к контрольным значениям, и уменьшается интенсивность гликолиза, а также возникают условия для усиления биосинтетических процессов, усиливается взаимодействие между реакциями пластического и энергетического обмена с притоком субстратов липидного катаболизма в гликолиз и субстратов аминокислотного обмена в ЦТК (Инжеваткин Е.В. и др., 2000а – в). Такие изменения можно трактовать как отражение адаптации обмена веществ,

направленной на восстановление поврежденных клеточных структур и обеспечение нормального функционирования органа.

Таким образом, если сопоставить друг с другом все обсуждаемые в нашей работе данные, то обнаруживаются выраженные черты сходства в характере метаболических изменений различных клеток у мышей с АКЭ в условиях опухолевого роста. Так, на стадии выраженных проявлений болезни в клетках возникают условия для увеличения интенсивности энергетического обмена и роста активности челночных механизмов транспорта НАДН из цитозоля в митохондрии, а также для усиления антиоксидантной защиты клеток и увеличения интенсивности пластических процессов. Названные изменения можно рассматривать как реакцию адаптации, направленную на обеспечение функций клеток и восстановление клеточных структур, поврежденных действием экстремального фактора.

В терминальный период болезни в клетках снижаются уровень аэробного обмена, активность ферментов, связывающих энергетические и пластические метаболические пути, активность челночных механизмов транспорта НАДН из цитозоля в митохондрии, уменьшаются возможности антиоксидантной защиты, нарушаются механизмы регуляции клеточного метаболизма. Такие изменения можно трактовать как отражение механизмов срыва адаптации.

Известно, что в ответ на действие различных факторов, если их сила превышает определенный порог, в организме реализуется стресс-реакция, или общий адаптационный синдром, открытый Гансом Селье (Selye H., 1950). На основе представленных данных можно предположить, что подобная неспецифическая реакция реализуется и на клеточном уровне независимо от типа клеток и природы действующего фактора.

Мы предлагаем термин «Неспецифическая метаболическая реакция клетки» для обозначения описываемого феномена. Схема этой реакции, применительно к условиям канцерогенеза у мышей с АКЭ, представлена на рисунке 4.5.





Рисунок 4.5 – Концептуальная схема закономерностей изменений

внутриклеточных обменных процессов в условиях канцерогенеза у мышей с АКЭ  
 Примечание – Толщиной контурных стрелок показана интенсивность действия патогенетических факторов. Цветом выделены отдельные типы клеток.

## ВЫВОДЫ

1. Реализация различных кинетических моделей роста АКЭ у мышей возможна путем внутрибрюшинного введения различного количества опухолевых клеток. При введении  $3 \times 10^6$  клеток АКЭ на одну мышь, уровень смертности достигает 100 %, при наблюдении в течение 24-х сут. После введения  $1 \times 10^4$  клеток АКЭ, смертность составила 43 % при наблюдении в течение 100 сут.
2. На стадии выраженных проявлений болезни у мышей с АКЭ в лимфоцитах крови наблюдается увеличение активности НАДИЦДГ на 15 %, НАДМДГ на 56 %, ГЗФДГ на 58 %, НАДГДГ на 89 %, ГР на 33 %, возрастает концентрация пирувата на 146 % и глутамата на 78 %, что в совокупности является признаком усиления энергетического обмена и способствует переходу лимфоцитов на новый уровень функциональной адаптации.
3. В терминальном периоде заболевания у мышей с АКЭ в лимфоцитах крови снижается активность НАДФИЦДГ на 27 %, НАДНМДГ на 34 %, ГЗФДГ на 51 %, Г6ФДГ на 37 %, происходит 3-х – кратное снижение активности ГР ( $p < 0,01$ ), 2-х – кратное увеличение содержания МДА ( $p < 0,01$ ), следствием чего является уменьшение интенсивности ЦТК, замедление транспорта энергетических субстратов в митохондрии, снижение эффективности защиты клеток от АФК.
4. В процессе роста АКЭ в макрофагах, инфильтрующей опухоль, снижается активность НАДМДГ на 78 %, НАДНМДГ на 84 %, Г6ФДГ на 79 %, НАДФИЦДГ на 87 %, НАДГДГ на 70 %, НАДИЦДГ на 92 %, НАДФМДГ на 94 %, ГР на 92 %, НАДФГДГ на 98 %, НАДФНГДГ на 60 %, в результате чего в клетках возникают условия для уменьшения интенсивности энергетического обмена, нарушения механизмов регуляции энергетического метаболизма, ослабления защиты от АФК.

5. В клетках АКЭ в начальном периоде заболевания возрастает активность НАДИЦДГ на 67 %, Г6ФДГ на 72 %, НАДФНГДГ на 56 %, ГЗФДГ на 148 %, двукратно повышается уровень НАДФГДГ и НАДНМДГ ( $p < 0,05$ ), многократно увеличиваются концентрации лактата и пирувата ( $p < 0,01$ ) при постоянном снижении уровня малата ( $p < 0,05$ ), что свидетельствует о росте интенсивности гликолиза, усилении роли ЦТК в клеточном обмене веществ, о возникновении условий для интенсификации транспорта субстратов в митохондрии.
6. Терминальная стадия характеризуется снижением в клетках АКЭ активности НАДИЦДГ на 40 %, НАДФИЦДГ на 82 %, НАДМДГ на 48 %, Г6ФДГ на 40 %, ГЗФДГ на 36 %, НАДФГДГ на 70 %, НАДФНГДГ на 63 %, ГР на 43 %, уменьшением содержания глутамата на 39 %, многократным снижением концентрации лактата и пирувата ( $p < 0,01$ ) и ростом уровня НАД<sup>+</sup> ( $p < 0,01$ ), что говорит о замедлении большинства энергетических и пластических процессов обмена веществ.
7. Для солидного варианта карциномы Эрлиха характерна пространственная метаболическая неоднородность. В центральной области наблюдается возрастание активности НАДИЦДГ, НАДМДГ, НАДНМДГ, НАДФМДГ, НАДЛДГ, Г6ФДГ, НАДФГДГ ( $p < 0,05$ ), при понижении активности ГЗФДГ ( $p < 0,05$ ). Это создает предпосылки для усиления энергетического метаболизма, а также для увеличения интенсивности процессов биосинтеза по сравнению с периферическими областями, что говорит о развитии адаптационных процессов в клетках центральной области исследованного фрагмента опухоли.
8. В процессе роста АКЭ в печени мышей наблюдается рост активности НАДИЦДГ, НАДНЛДГ, НАДНМДГ, НАДФМДГ, ГР ( $p < 0,05$ ), НАДЛДГ, НАДМДГ, НАДФИЦДГ, ГЗФДГ ( $p < 0,01$ ), что свидетельствует об усилении интенсивности реакций энергетического обмена, а также о повышении амфиболической роли ЦТК, и отражает метаболические механизмы адаптации клеток к условиям действия факторов

онкологического процесса. В то же время, рост содержания МДА ( $p < 0,05$ ) и интенсивности люминол-зависимой хемилюминесценции ( $p < 0,001$ ), при снижении активности Г6ФДГ на 75 %, отражает усиление в клетках процессов ПОЛ и недостаточность функции антиоксидантной защиты.

9. Скорость, с которой развиваются метаболические изменения в клетках различных тканей организма в процессе роста опухоли, зависит от особенностей их анатомо-физиологических связей с опухолью. Наибольшая скорость изменений среди исследованных клеток характерна для макрофагов, инфильтрующих опухоль, наименьшая – для клеток печени.
10. В условиях канцерогенеза, на стадии выраженных проявлений болезни, в различных клетках организма и в клетках опухоли развиваются изменения обмена веществ, являющиеся неспецифическими по отношению к типу исследуемых клеток. Они включают увеличение интенсивности энергетического обмена и рост активности челночных механизмов транспорта НАДН из цитозоля в митохондрии, а также усиление антиоксидантной защиты клеток и увеличение интенсивности пластических процессов, что является отражением метаболических механизмов клеточной адаптации. При последующем критическом ухудшении условий клеточного микроокружения происходит срыв адаптации, который проявляется в снижении активности большинства исследованных обменных процессов.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АКЭ – асцитная карцинома Эрлиха  
АТФ – аденозин-5`-трифосфат  
АФК – активные формы кислорода  
БТШ – белки теплового шока  
ГЗФ – глицерол-3-фосфат  
ГЗФДГ – глицерол-3-фосфатдегидрогеназа  
Г6Ф – глюкозо-6-фосфат  
Г6ФДГ – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа  
ГР – глутатионредуктаза  
ДОАФ – диоксиацетонфосфат  
ИДО – индоламин 2,3-диоксигеназа  
ИЛ – интерлейкин  
ЛДГ – лактатдегидрогеназа  
МДА – малоновый диальдегид  
МДГ - малатдегидрогеназа  
НАД – никотинамидадениндинуклеотид  
НАДГДГ - НАД-зависимая глутаматдегидрогеназа  
НАДИЦДГ - НАД-зависимая изоцитратдегидрогеназа  
НАДФ - никотинамидадениндинуклеотидфосфат  
НАДФГДГ - НАДФ-зависимая глутаматдегидрогеназа  
НАДФИЦДГ - НАДФ-зависимая изоцитратдегидрогеназа  
НАДФМДГ – НАДФ-зависимая малатдегидрогеназа (малик-фермент)  
о.е. – относительные единицы  
ОАС – общий адаптационный синдром  
ТАГ – триацилглицеролы  
ФНО – фактор некроза опухоли  
ЦОГ – циклооксигеназа  
ЦТК – цикл трикарбоновых кислот

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андреева, Л. И. Модификация метода определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой / Л. И. Андреева, Л. А. Кожемякин, А. А. Кишкун // Лабораторное дело. – 1988. – № 11. – С. 41–43.
2. Артюхов, В.Г. Олигомерные белки: структурно-функциональные модификации и роль субъединичных контактов / Артюхов В.Г., Башарина О.В., Вашанов Г.А. и др. // Воронеж: Изд-во ВГУ, 1997. – 264 с.
3. Гвичия, А.Ш. Морфология поверхности асцитных опухолевых клеток /А.Ш. Гвичия - Тбилиси: Мецинереба. – 1983. – 118с.
4. Горбань, А. Н. Нейроинформатика / А. Н. Горбань, В. Л. Дунин-Барковский, А. Н. Кирдин [и др.]. – Новосибирск : Наука, 1998. – 296 с.
5. Горбань, А. Н. Нейронные сети на персональном компьютере / А. Н. Горбань, Д. А. Россиев. – Новосибирск : Наука, 1996. – 278 с.
6. Горбань, А. Н. Обучение нейронных сетей / А. Н. Горбань. – М. : ПараГраф, 1990. – 160 с.
7. Досон, Р. Справочник биохимика / Р. Досон, Д. Эллиот, У. Эллиот [и др.] ; пер. с англ. В. Л. Друцы, О. Н. Королевой. – М. : Мир, 1991. – 543 с.
8. Захарова, Л. Б. Оценка антропоэкологического напряжения пришлого населения промышленной зоны Заполярья. (Биофиз. аспект) / Л. Б. Захарова, М. Г. Полонская, А. А. Савченко, Е. В. Смирнова. – Красноярск : Ин-т биофизики, 1989. – 51 с. – (Препринт / АН СССР, Сиб. отд-ние, Ин-т биофизики ; № 110Б).
9. Инжеваткин, Е.В. Влияние продолжительности восстановительного периода после кратковременной гипертермии на состояние метаболизма перфузируемой печени крыс / Е.В. Инжеваткин, А.А. Савченко, А.Б. Егорова, А.И. Альбрант, В.П. Нефедов // Бюлл. эксперим. биологии и медицины. – 2000. – Т.129. – № 4. – С.414-416. б

10. Инжеваткин, Е.В. Исследование метаболических изменений печени крыс в динамике восстановительного периода после гипертермического воздействия / Е.В. Инжеваткин, А.А. Савченко, А.И. Альбрант, В.П. Нефедов // Вопросы мед. химии. – 2000. – Т.46. – Вып.2. – С. 135-139. в
11. Инжеваткин, Е.В. Нейросетевая предикция потребления кислорода перфузируемой печенью крыс по активности оксидоредуктаз в динамике восстановительного периода после гипертермического воздействия / Е.В. Инжеваткин, В.П. Нефедов, А.А. Савченко // Вестник новых медицинских технологий. – 2000. – № 1. – С. 25-28. а
12. Инсанов, А. Б. Геногеография наследственного дефицита фермента глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и туберкулеза легких в Азербайджане / А. Б. Инсанов, Ф. М. Абдуллаев, Л. Я. Коцобашвили [и др.] // Проблемы туберкулеза. – 1993. – № 2. – С. 5–8.
13. Калабанова, Е.А. Особенности энергетического метаболизма лимфоцитов крови у больных раком шейки матки с манифестированными метастазами / Е.А. Калабанова, Г.А. Неродо, А.И. Шихлярова и др. // Медицинская наука и образование Урала. – 2011. – Т. 12, № 1. – С. 20–23.
14. Козлов, В. А. Практические аспекты диагностики и лечения иммунных нарушений. Руководство для врачей / В. А. Козлов, А. Г. Борисов, С. В. Смирнова [и др.]. – Новосибирск : Наука, 2009. – 271 с.
15. Кочетов, Г. А. Практическое руководство по энзимологии / Г. А. Кочетов. – 2-е изд., перераб. и доп. – М. : Высшая школа, 1980. – 272 с.
16. Курилова, Л.С., Крутецкая З.И., Лебедев О.Е. и др. Участие актинового цитоскелета во влиянии препаратов глутоксим и моликсан на внутриклеточную концентрацию  $Ca^{2+}$  в макрофагах // Цитология. – 2012. – Т. 54, № 2. – С. 135–142.

17. Куртасова, Л. М. Клинические аспекты функциональных нарушений нейтрофильных гранулоцитов при онкопатологии / Л. М. Куртасова, А. А. Савченко, Е. А. Шкапова. – Новосибирск : Наука, 2009. – 184 с.
18. Лакин, Г. Ф. Биометрия / Г. Ф. Лакин. – 4-е изд., перераб. и доп. – М. : Высшая школа, 1990. – 351 с.
19. Лапешин, П. В. Состояние активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах крови и в клетках здоровой и опухолевой ткани легкого у больных немелкоклеточным раком легкого / П. В. Лапешин, А. А. Савченко, Ю. А. Дыхно и др. // Сиб. онколог. журн. 2005. Т.15. № 3. С. 48–53.
20. Лимфоциты. Методы / под ред. Дж. Клауса ; пер. с англ. А. Н. Маца, А. А. Фельдшеровой. – М. : Мир, 1990. – 395 с.
21. Мальцева, В. Н. Неоднозначность роли нейтрофила в генезе опухоли / В. Н. Мальцева, В. Г. Сафронова // Цитология. – 2009. – Т. 51, № 6. – С. 467–474.
22. Мальцева, В.Н. Наблюдение в динамике модификации функциональной активности периферических нейтрофилов и ее регуляции при росте опухоли *in vivo* / В.Н. Мальцева, Н.В. Авхачева, Б.Ф. Санталов, В.Г. Сафронова // Цитология. – 2006. – Т.48. – № 12. – С. 1000-1009.
23. Меерсон, Ф.З., Пшенникова М.Г. Адаптация к стрессорным ситуациям и физическим нагрузкам. - М.: Медицина, 1988. - 256 с.
24. Митин, Ю.А., Дмитриев В.И., Кузьмич А.Н. и др. Иммунометаболические критерии инфекции ВИЧ / Тез. докл. 1-го съезда иммунологов России, 23–25 июня 1992. – Новосибирск, 1992. – С. 303–304.
25. Нефедов, В. П. Гомеостаз организма и экстремальные состояния / В. П. Нефедов, И. И. Моргулис, О. В. Круглик [и др.] // Коррекция гомеостаза организма при экстремальных состояниях : сб. науч. тр. / отв. ред. В. П. Нефедов. – Новосибирск : Наука, 2000. – С. 5–15 с.



26. Нефедов, В. П. Новые технологии медицины в коррекции гомеостаза организма / В. П. Нефедов, В. О. Тимошенко, Е. В. Галкин [и др.] // Новые технологии медицины: коррекция гомеостаза : материалы X междунар. симп. «Концепция гомеостаза: теоретические, экспериментальные и прикладные аспекты» : сб. науч. тр. – Новосибирск : Наука, 2002. – С. 5–10.
27. Пастушенков, В.Л. Иммунометаболический мониторинг инфицированных ВИЧ / В. Л. Пастушенков, Н. В. Бельчесов, Ю. А. Митин [и др.] // Иммунология. – 1990. – № 6. – С. 7–9.
28. Патофизиология : учебник : в 2-х т. / под ред. В. В. Новицкого, Е. Д. Гольдберга, О. И. Уразовой. – 4-е изд., перераб. и доп. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2013. – Т. 1. – 848 с.
29. Патофизиология : учебник : в 2-х т. / под ред. В. В. Новицкого, Е. Д. Гольдберга, О. И. Уразовой. – 4-е изд., перераб. и доп. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2013. – Т. 2. – 640 с.
30. Патофизиология. Курс лекций / под ред. Г. В. Порядина. – М. : ГЭОТАР-Мед, 2014. – 592 с.
31. Рагимов, А. А. Розеткообразующая способность и пролиферативная активность лимфоцитов периферической крови лиц с дефицитом глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы / А.А. Рагимов, И.Э. Байрамалибейли // Лабораторное дело. – 1985. – № 7. – С. 405–408.
32. Савченко, А. А. Билюминесцентное определение активности НАД- и НАДФ-зависимых глутаматдегидрогеназ лимфоцитов / А. А. Савченко // Лабораторное дело. – 1991. – № 11. – С. 22–25.
33. Савченко, А. А. Витамины как основа иммунометаболической терапии / А. А. Савченко, Е. Н. Анисимова, А. Г. Борисов [и др.]. – Красноярск : тип. КрасГМУ, 2011. – 213 с.
34. Савченко, А. А. Высокочувствительное определение активности дегидрогеназ в лимфоцитах периферической крови человека

- биолюминесцентным методом / А. А. Савченко, Л. Н. Сунцова // Лабораторное дело. – 1989. – № 11. – С. 23–25.
35. Савченко, А. А. Метаболические особенности лимфоцитов крови у больных истинной аллергией и псевдоаллергией / А. А. Савченко, С. В. Смирнова, В. И. Пыцкий // Аллергология и иммунология. – 2002. – Т. 3, № 1. – С. 180–187.
36. Савченко, А. А. Метаболический механизм развития иммунной недостаточности при адаптации к условиям Крайнего Севера / А. А. Савченко, В. Т. Манчук // Бюл. СО РАМН. – 2003. – Т. 108, № 2. – С. 98–101.
37. Савченко, А. А. Основы клинической иммунометаболомики / А. А. Савченко, А. Г. Борисов. – Новосибирск: Наука, 2012. – 263 с.
38. Савченко, А. А. Особенности состояния клеточного и гуморального иммунитета у больных с распространенным гнойным перитонитом / А. А. Савченко, Д. Э. Здзитовецкий, А. Г. Борисов [и др.] // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. – 2012. – Т. 85, № 3 (Ч. 2). – С. 159–163.
39. Савченко, А. А. Особенности уровней активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах крови у больных истинной аллергией и псевдоаллергией / А. А. Савченко, С. В. Смирнова // Вестн. новых мед. технологий. – 2001. – № 2. – С. 64–67.
40. Северин, Е. С. Биохимия : учебник / под ред. Е. С. Северина. – 5-е изд., испр. и доп. – М. : ГЭОТАР-Мед, 2012. – 768 с.
41. Смирнова, О. В. Особенности клинических проявлений и характеристика иммунопатогенеза больных хроническим миелолейкозом / О. В. Смирнова, В. Т. Манчук, А. А. Савченко // Сиб. онкол. журн. – 2007. – Т. 23, № 3. – С. 16–22.
42. Соловьева, И. А. Характеристика метаболических процессов в лимфоцитах крови у подростков с хроническими вирусными гепатитами / И. А. Соловьева, Г. П. Мартынова, А. А. Савченко // Сиб. мед. журн. (Иркутск). – 2011. – № 8. – С. 21–25.

43. Тюлькова, Н. А. НАД(Ф)-Н-реагент для биолюминесцентного анализа / Н. А. Тюлькова. – Красноярск : ИБФ, 1991. – 17 с. – (Препринт / АН СССР. Сиб. отд-ние. Ин-т биофизики ; № 157Б).
44. Улитина, Е. В. Статистика / Е. В. Улитина, О. В. Леднева, О. Л. Жирнова. – М. : Синергия, 2013. – 316 с.
45. Филина, Ю.В. Малые G-белки RAS, RAC и RHO в регуляции респираторного ответа нейтрофилов, вызванного формилированным пептидом / Ю.В. Филина, В.Г. Сафронова, А.Г. Габдулхакова // Биол. мембраны: журн. мембран. и клеточн. биологии. – 2011. – Т. 28, № 6. – С. 507-514.
46. Шапот, В.С. Биохимические аспекты опухолевого роста/ В.С. Шапот - М.: Медицина.-1975.-304с.
47. Эмануэль, Н. М. Кинетика экспериментальных опухолевых процессов / Н. М. Эмануэль. – М. : Наука, 1977. – 419 с.
48. Эмануэль, Н. М. Химическая и биологическая кинетика: избр. тр. : Т.2. / Н. М. Эмануэль. – М. : Наука, 2006. – 317 с.
49. Ябров, А. А. К вопросу о механизме клеточного стресса / А. А. Ябров // Цитология. – 1969. – Т.11, № 2. – С. 137–146.
50. Ябров, А. А. Неспецифическая устойчивость клеток к бактериальным токсинам. Понятие о клеточном стрессе / А. А. Ябров // Цитология. – 1967. – Т. 9, № 6. – С. 692–706.
51. Ярилин, А. А. Иммунология / А. А. Ярилин. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 752 с.
52. Afanas'ev, I. reactive oxygen species signaling in cancer: comparison with aging / I. Afanas'ev // Aging Dis. – 2011. – Vol. 2. № 3. – P. 219–230.
53. Aggarwal, N.T. Redox control of cardiac excitability / N.T. Aggarwal, J. C. Makielski // Antioxid. Redox Signal. – 2013. – Vol. 18, № 4. – P. 432–468.
54. Albracht, S. P. The reaction of NADPH with bovine mitochondrial NADH: ubiquinone oxidoreductase revisited: I. Proposed consequences for electron

- transfer in the enzyme / S. P. Albracht // *J. Bioenerg. Biomembr.* –2010. – Vol. 42, № 4. – P. 261–278.
55. Almaguel, F. G. Lipotoxicity-mediated cell dysfunction and death involve lysosomal membrane permeabilization and cathepsin L activity / F. G. Almaguel, J. Liu, F. J. Pacheco [et al.] // *Brain Res.* – 2010. – Vol. 1318. – P. 133–143.
56. Anastasiou, D. Inhibition of pyruvate kinase M2 by reactive oxygen species contributes to cellular antioxidant responses / D. Anastasiou, G. Pouligiannis, J. M. Asara [et al.] // *Science.* – 2011. – Vol. 334, № 6060. – P. 1278–1283.
57. Andersen, M. H. The specific targeting of immune regulation: T-cell responses against Indoleamine 2,3-dioxygenase / M. H. Andersen // *Cancer Immunol. Immunother.* – 2012. – Vol. 61, № 8. – P. 1289–1297.
58. Anderson, A. R. Microenvironment driven invasion: a multiscale multimodel investigation / A. R. Anderson, K. A. Rejniak, P. Gerlee [et al.] // *J. Math. Biol.* – 2009. – Vol. 58, № 4-5. – P. 579–624.
59. Anderson, A. R. Microenvironmental independence associated with tumor progression / A. R. Anderson, M. Hassanein, K. M. Branch [et al.] // *Cancer Res.* – 2009. – Vol. 69, № 22. – P. 8797–8806.
60. Ballatori, N. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases / N. Ballatori, S. M. Krance, S. Notenboom [et al.] // *Biol. Chem.* – 2009. – Vol. 390, № 3. – P. 191–214.
61. 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 [Electronic resource] // *PLoS ONE.* – 2016. – 11(9). – URL: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0162568>.
62. Banerjee Mustafi, S. Heat stress upregulates chaperone heat shock protein 70 and antioxidant manganese superoxide dismutase through reactive oxygen species (ROS), p38MAPK, and Akt / S. Banerjee Mustafi, P. K.

- Chakraborty, R. S. Dey [et al.] // *Cell Stress Chaperones*. – 2009. – Vol. 14, № 6. – P. 579–589.
63. Baratelli, F. PGE2 contributes to TGF- $\beta$  induced T regulatory cell function in human non-small cell lung cancer / F. Baratelli, J. M. Lee, S. Hazra [et al.] // *Am. J. Transl. Res.* – 2010. – Vol. 2, № 4. – P. 356–367.
64. Barry, R. Self-assembling enzymes and the origins of the cytoskeleton / R. Barry, Z. Gitai // *Curr. Opin. Microbiol.* – 2011. – Vol. 14, № 6. – P. 704–711.
65. Bernardi, P. The permeability transition pore as a Ca<sup>2+</sup> release channel: new answers to an old question / P. Bernardi, S. von Stockum // *Cell Calcium*. – 2012. – Vol. 52, № 1. – P. 22–27.
66. Bhatt, A. P. Dysregulation of fatty acid synthesis and glycolysis in non-Hodgkin lymphoma / A. P. Bhatt, S. R. Jacobs, A. J. Freemerman [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2012. – Vol. 109, № 29. – P. 11818–11823.
67. Bing, Z. Proteomic analysis of effects by x-rays and heavy ion in HeLa cells / Z. Bing, G. Yang, Y. Zhang [et al.] // *Radiol. Oncol.* – 2014. – Vol. 48, № 2. – P. 142–154.
68. Birben, E. Oxidative stress and antioxidant defense / E. Birben, U. M. Sahiner, C. Sackesen [et al.] // *World Allergy Organ J.* – 2012. – Vol. 5, № 1. – P. 9–19.
69. Birkenfeld, A. L. Influence of the hepatic eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$  (eIF2 $\alpha$ ) endoplasmic reticulum (ER) stress response pathway on insulin-mediated ER stress and hepatic and peripheral glucose metabolism / A. L. Birkenfeld, H. Y. Lee, S. Majumdar [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2011. – Vol. 286, № 42. – P. 36163–36170.
70. Bishop, T. Abnormal sympathoadrenal development and systemic hypotension in PHD3<sup>-/-</sup> mice / T. Bishop, D. Gallagher, A. Pascual [et al.] // *Mol. Cell. Biol.* – 2008. – Vol. 28, № 10. – P. 3386–400.
71. Bogdan, C. Nitric oxide and the immune response / C. Bogdan // *Nat. Immunol.* – 2001. – Vol. 2, № 10. – P. 907–916.

72. Bonnet, S. A mitochondria-K<sup>+</sup> channel axis is suppressed in cancer and its normalization promotes apoptosis and inhibits cancer growth / S. Bonnet, S. L. Archer, J. Allalunis-Turner [et al.] // *Cancer Cell*. – 2007. – Vol. 11, № 1. – P. 37–51.
73. Brahim-Horn, M. C. Hypoxia and cancer / M. C. Brahim-Horn, J. Chiche, J. Pouyssegur // *J. Mol. Med.* – 2007. – Vol. 85, № 12. – P. 1301–1307.
74. Brahim-Horn, M. C. Hypoxia and energetic tumour metabolism / M. C. Brahim-Horn, G. Bellot, J. Pouyssegur // *Curr. Opin. Genet. Dev.* – 2011. – Vol. 21, № 1. – P. 67–72.
75. Brahim-Horn, M. C. Hypoxia signaling controls metabolic demand / M. C. Brahim-Horn, J. Chiche, J. Pouyssegur // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 2007. – Vol. 19, № 2. – P. 223–229.
76. Brahim-Horn, M. C. Oxygen, a source of life and stress / M. C. Brahim-Horn, J. Pouyssegur // *FEBS Lett.* – 2007. – Vol. 581, № 19. – P. 3582–3591.
77. Brandon, M. Mitochondrial mutations in cancer / M. Brandon, P. Baldi, D. C. Wallace // *Oncogene*. – 2006. – Vol. 25. – P. 4647–4662.
78. Braun, R. D. Comparison of tumor and normal tissue oxygen tension measurements using OxyLite or microelectrodes in rodents / R. D. Braun, J. L. Lanzen, S. A. Snyder [et al.] // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2001. – Vol. 280, № 6. – P. H2533–H2544.
79. Bronte, V. Boosting antitumor responses of T lymphocytes infiltrating human prostate cancers. / V. Bronte, T. Kasic, G. Gri et al. // *J. Exp. Med.* – 2005. – 201 (8). – P. 1257 – 68.
80. Bronte, V. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism / V. Bronte, P. Zanovello // *Nat. Rev. Immunol.* – 2005. – Vol. 5, № 8. – P. 641–654.
81. Burns, J.S., Metabolic Pathways of the Warburg Effect in Health and Disease: Perspectives of Choice, Chain or Chance / J.S. Burns, G. Manda //

- Int. J. Mol. Sci. – 2017 - 18 (12). – 2755. <http://www.mdpi.com/1422-0067/18/12/2755/htm>.
82. Busk, M. Aerobic glycolysis in cancers: implications for the usability of oxygen-responsive genes and fluorodeoxyglucose-PET as markers of tissue hypoxia / M. Busk, M. R. Horsman, P. E. Kristjansen [et al.] // *Int. J. Cancer*. – 2008. – Vol. 122, № 12. – P. 2726–2734.
83. Cairns, R. A. Regulation of cancer cell metabolism / R. A. Cairns, I. S. Harris, T. W. Mak // *Nat. Rev. Cancer*. – 2011. – Vol. 11, № 2. – P. 85–95.
84. Calabrese, V. Cellular stress responses, the hormesis paradigm, and vitagenes: novel targets for therapeutic intervention in neurodegenerative disorders / V. Calabrese, C. Cornelius, A. T. Dinkova-Kostova [et al.] // *Antioxid. Redox Signal*. – 2010. – Vol. 13, № 11. – P. 1763–1811.
85. Cappai, G. Increased prevalence of proliferative retinopathy in patients with type 1 diabetes who are deficient in glucose-6-phosphate dehydrogenase / G. Cappai, M. Songini, A. Doria [et al.] // *Diabetologia*. – 2011. – Vol. 54, № 6. – P. 1539–1542.
86. Caputo, F. Redox modulation of the DNA damage response / F. Caputo, R. Vegliante, L. Ghibelli // *Biochem. Pharmacol.* – 2012. – Vol. 84, № 10. – P. 1292–1306.
87. Carr, W. J. Antioxidant proteins and reactive oxygen species are decreased in a murine epidermal side population with stem cell-like characteristics / W. J. Carr, R. E. Oberley-Deegan, Y. Zhang [et al.] // *Histochem. Cell Biol.* – 2011. – Vol. 135, № 3. – P. 293–304.
88. Chakrabarti, A. A review of the mammalian unfolded protein response / A. Chakrabarti, A. W. Chen, J. D. Varner // *Biotechnol. Bioeng.* – 2011. – Vol. 108, № 12. – P. 2777–2793.
89. Chang, J. C. Regulatory role of mitochondria in oxidative stress and atherosclerosis / J. C. Chang, S. J. Kou, W. T. Lin [et al.] // *World J. Cardiol.* – 2010. – Vol. 2, № 6. – P. 150–159.

90. Chatterjee, A. Mitochondrial DNA mutations in human cancer / A. Chatterjee, E. Mambo, D. Sidransky // *Oncogene*. – 2006. – Vol. 25, № 34. – P. 4663–4674.
91. Chen, J. Q. Regulation of energy metabolism pathways by estrogens and estrogenic chemicals and potential implications in obesity associated with increased exposure to endocrine disruptors / J. Q. Chen, T. R. Brown, J. Russo // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2009. – Vol. 1793, № 7. – P. 1128–1143.
92. Chen, L. Cadmium induction of reactive oxygen species activates mTOR pathway, leading to neuronal cell death / L. Chen, B. Xu, L. Liu [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – 2011. – Vol. 50, № 5. – P. 624–632.
93. Christofk, H. R. The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth / H. R. Christofk, M. G. Vander Heiden, M. H. Harris [et al.] // *Nature*. – 2008. – Vol. 452, № 7184. – P. 230–233.
94. Condeelis, J. Macrophages obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis / J. Condeelis, J.W. Pollard // *Cell* 124, Volume 124, Issue 2, 2006. P. 263-266.
95. Cooper, K. L. Enhanced ROS production and redox signaling with combined arsenite and UVA exposure: contribution of NADPH oxidase / K. L. Cooper, K. J. Liu, L. G. Hudson // *Free Radic. Biol. Med.* – 2009. – Vol. 47, № 4. – P. 381–388.
96. Corcoran, C. Intracellular and extracellular microRNAs in breast cancer / C. Corcoran, A. M. Friel, M. J. Duffy [et al.] // *Clin. Chem.* – 2011. – Vol. 57, № 1. – P. 18–32.
97. Corrêa, R. R. Influence of inflammatory infiltrate and alterations of the blood flow in the etiopathogenesis of the basement membrane of the amniotic epithelium (BMAE) thickening in patients with hypertensive syndromes in pregnancy / R. R. Corrêa, C. S. Guimarães, L. P. Rocha [et al.] // *Arch. Gynecol. Obstet.* – 2012. – Vol. 286, № 5. – P. 1117–1121.



98. Cortes, D. F. Differential gene expression in normal and transformed human mammary epithelial cells in response to oxidative stress / D. F. Cortes, W. Sha, V. Hower [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – 2011. – Vol. 50, № 11. – P. 1565–1574.
99. Cosentino, C. ATM activates the pentose phosphate pathway promoting anti-oxidant defence and DNA repair / C. Cosentino, D. Grieco, V. Costanzo // *EMBO J.* – 2011. – Vol. 30, № 3. – P. 546–555.
100. Cremer, I. Tumor microenvironment in NSCLC suppresses NK cells function / I. Cremer, W. H. Fridman, C. Sautès-Fridman // *Oncoimmunology.* – 2012. – Vol. 1, № 2. – P. 244–246.
101. Croker, B. A. Fas-mediated neutrophil apoptosis is accelerated by Bid, Bak, and Bax and inhibited by Bcl-2 and Mcl-1 / B. A. Croker, J. A. O'Donnell, C. J. Nowell [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2011. – Vol. 108, № 32. – P. 13135–13140.
102. Dang, C. V. Links between metabolism and cancer / C. V. Dang // *Genes Dev.* – 2012. – Vol. 26, № 9. – P. 877–890.
103. Dang, C. V. Rethinking the Warburg effect with Myc micromanaging glutamine metabolism / C. V. Dang // *Cancer Res.* – 2010. – Vol. 70, № 3. – P. 859–862.
104. DeBerardinis, R. J. Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis / R. J. DeBerardinis, A. Mancuso, E. Daikhin [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2007. – Vol. 104, № 49. – P. 19345–19350.
105. DeBerardinis, R. J. Cellular metabolism and disease: what do metabolic outliers teach us? / R. J. De Berardinis, C. B. Thompson // *Cell.* – 2012. – Vol. 148, № 6. – P. 1132–1144.
106. DeBerardinis, R. J. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation / R. J. DeBerardinis, J. J. Lum, G. Hatzivassiliou [et al.] // *Cell Metab.* – 2008. – Vol. 7, № 1. – P. 11–20.

107. Denton, R. M. Regulation of mitochondrial dehydrogenases by calcium ions / R. M. Denton // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2009. – Vol. 1787, № 11. – P. 1309–1316.
108. Desouza, M. The actin cytoskeleton as a sensor and mediator of apoptosis / M. Desouza, P. W. Gunning, J. R. Stehn // *Bioarchitecture.* – 2012. – Vol. 2, № 3. – P. 75–87.
109. Dias, I. H. Activation of the neutrophil respiratory burst by plasma from periodontitis patients is mediated by pro-inflammatory cytokines / I. H. Dias, J. B. Matthews, I. L. Chapple [et al.] // *J. Clin. Periodontol.* – 2011. – Vol. 38, № 1. – P. 1–7.
110. Dias, I. H. Activation of the neutrophil respiratory burst by plasma from periodontitis patients is mediated by pro-inflammatory cytokines / I. H. Dias, J. B. Matthews, I. L. Chapple [et al.] // *J. Clin. Periodontol.* – 2011. – Vol. 38, № 1. – P. 1–7.
111. Diaz-Cano, S. J. Tumor heterogeneity: mechanisms and bases for a reliable application of molecular marker design / S. J. Diaz-Cano // *Int. J. Mol. Sci.* – 2012. – Vol. 13, № 2. – P. 1951–2011.
112. Dobis, D. R. Modulation of lymphocyte proliferation by antioxidants in chronic beryllium disease / D. R. Dobis, R. T. Sawyer, M. M. Gillespie [et al.] // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2008. – Vol. 177, № 9. – P. 1002–1011.
113. Dong, W. Labeling of BSA and imaging of mouse T-lymphocyte as well as mouse spleen tissue by L-glutathione capped CdTe quantum dots / W. Dong, X. Ge, M. Wang [et al.] // *Luminescence.* – 2010. – Vol. 25, № 1. – P. 55–60.
114. Dröse, S. Molecular mechanisms of superoxide production by the mitochondrial respiratory chain / S. Dröse, U. Brandt // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2012. – Vol. 748. – P. 145–169.

115. Enderling, H. Paradoxical dependencies of tumor dormancy and progression on basic cell kinetics / H. Enderling, A. R. Anderson, M. A. Chaplain [et al.] // *Cancer Res.* – 2009. – Vol. 69, № 22. – P. 8814–8821.
116. Enderling, H. Quantitative modeling of tumor dynamics and radiotherapy / H. Enderling, M. A. Chaplain, P. Hahnfeldt // *Acta Biotheor.* – 2010. – Vol. 58, № 4. – P. 341–353.
117. Erler, J. T. Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis / J. T. Erler, K. L. Bennewith, M. Nicolau [et al.] // *Nature.* – 2006. – Vol. 440, № 7088. – P. 1222–1226.
118. Esteban, M. A. Regulation of E-cadherin expression by VHL and hypoxia-inducible factor / M. A. Esteban, M. G. Tran, S. K. Harten [et al.] // *Cancer Res.* – 2006. – Vol. 66, № 7. – P. 3567–3575.
119. Eyassu F., Angione C. Modelling pyruvate dehydrogenase under hypoxia and its role in cancer metabolism. / F. Eyassu, C. Angione // *Royal Society Open Science.* – 2017. – 4 (10):170360. doi:10.1098/rsos.170360.
120. Fan, G. C. Role of heat shock proteins in stem cell behavior / G. C. Fan // *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* – 2012. – Vol. 111. – P. 305–322.
121. Fan, T. Metabolomic and transcriptomic profiling of hepatocellular carcinomas in Hras12V transgenic mice. / T. Fan, Z. Rong, J. Dong, J. Li et al. // *Cancer Medicine.* – 2017. – V. 6 (10) P. 2370–2384.
122. Fang, J. S. Adaptation to hypoxia and acidosis in carcinogenesis and tumor progression / J. S. Fang, R. D. Gillies, R. A. Gatenby // *Semin. Cancer Biol.* – 2008. – Vol. 18, № 5. – P. 330–337.
123. Ferdinande, L. Clinicopathological significance of indoleamine 2,3-dioxygenase 1 expression in colorectal cancer / L. Ferdinande, C. Decaestecker, L. Verset [et al.] // *Br. J. Cancer.* – 2012. – Vol. 106, № 1. – P. 141–147.
124. Fischer, K. Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells / K. Fischer, P. Hoffmann, S. Voelkl [et al.] // *Blood.* – 2007. – Vol. 109, № 9. – P. 3812–3819.

125. Fitowska, A. Protein metabolism in the synovial membrane in the hip osteoarthritis / A. Fitowska, A. Ostałowska, M. Dobrakowski [et al.] // *Pol. Orthop. Traumatol.* – 2012. – Vol. 77. – P. 21–26.
126. Flavin, R. Metabolic alterations and targeted therapies in prostate cancer / R. Flavin, G. Zadra, M. Loda // *J. Pathol.* – 2011. – Vol. 223, № 2. – P. 283–294.
127. Fogg, V. C. Mitochondria in cancer: at the crossroads of life and death / V. C. Fogg, N. J. Lanning, J. P. Mackeigan // *Chin. J. Cancer.* – 2011. – Vol. 30, № 8. – P. 526–539.
128. Földi, M. Transketolase protein TKTL1 overexpression: A potential biomarker and therapeutic target in breast cancer / M. Földi, E. Stickeler, L. Bau [et al.] // *Oncol. Rep.* – 2007. – Vol. 17, № 4. – P. 841–845.
129. Frederiks, W. M. Renal cell carcinoma and oxidative stress: the lack of peroxisomes / W. M. Frederiks, K. S. Bosch, K. A. Hoeben [et al.] // *Acta Histochem.* – 2010. – Vol. 112, № 4. – P. 364–371.
130. Frezza, C. Mitochondria in cancer: Not just innocent bystanders / C. Frezza, E. Gottlieb // *Seminars in Cancer Biology.* – Vol. 19. – Issue 1. – P. 4–11.
131. Fritz, V. Metabolism and proliferation share common regulatory pathways in cancer cells / V. Fritz, L. Fajas // *Oncogene.* – 2010. – Vol. 29, № 31. – P. 4369–4377.
132. Füst, G. Comparison of epitope specificity of anti-heat shock protein 60/65 IgG type antibodies in the sera of healthy subjects, patients with coronary heart disease and inflammatory bowel disease / G. Füst, K. Uray, L. Bene [et al.] // *Cell Stress Chaperones.* – 2012. – Vol. 17, № 2. – P. 215–227.
133. Fujita, R. Hsp-27 induction requires POU4F2/Brn-3b TF in doxorubicin-treated breast cancer cells, whereas phosphorylation alters its cellular localisation following drug treatment / R. Fujita, S. Ounzain, A. C.

- Wang [et al.] // *Cell Stress Chaperones*. – 2011. – Vol. 16, № 4. – P. 427–439.
134. Fukuda, R. HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells / R. Fukuda, H. Zhang, J. W. Kim [et al.] // *Cell*. – 2007. – Vol. 129, № 1. – P.111–122.
135. Furuta, E. Metabolic genes in cancer: their roles in tumor progression and clinical implications / E. Furuta, H. Okuda, A. Kobayashi [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2010. – Vol. 1805, № 2. – P. 141–152.
136. Gaba, A. Cutting edge: IL-10-mediated tristetraprolin induction is part of a feedback loop that controls macrophage STAT3 activation and cytokine production / A. Gaba, S. I. Grivennikov, M. V. Do [et al.] // *J. Immunol.* – 2012. – Vol. 189, № 5. – P. 2089–2093.
137. Gallagher, F. A. Magnetic resonance imaging of pH in vivo using hyperpolarized <sup>13</sup>C-labelled bicarbonate / F. A. Gallagher, M. I. Kettunen, S. E. Day [et al.] // *Nature*. – 2008. – Vol. 453, № 7197. – P. 940–943.
138. Gao, P. HIF-dependent antitumorigenic effect of antioxidants in vivo / P. Gao, H. Zhang, R. Dinavahi [et al.] // *Cancer Cell*. – 2007. – Vol. 12, № 3. – P. 230–238.
139. Gasparre, G. Clonal expansion of mutated mitochondrial DNA is associated with tumor formation and complex I deficiency in the benign renal oncocytoma / G. Gasparre, E. Hervouet, E. de Laplanche [et al.] // *Hum. Mol. Genet.* – 2008. – Vol. 17, № 7. – P. 986–995.
140. Glunde, K. Choline kinase alpha in cancer prognosis and treatment / K. Glunde, Z. M. Bhujwalla // *Lancet Oncol.* – 2007. – Vol. 8, № 10. – P. 855–857.
141. Godin-Ethier, J. Human activated T lymphocytes modulate IDO expression in tumors through Th1/Th2 balance / J. Godin-Ethier, S. Pelletier, L. A. Hanafi [et al.] // *J. Immunol.* – 2009. – Vol. 183, № 12. – P. 7752–7760.

142. Gottlieb, E. Mitochondrial tumour suppressors: a genetic and biochemical update / E. Gottlieb, I. P. Tomlinson // *Nat. Rev. Cancer.* – 2005. – Vol. 5, № 11. – P. 857–866.
143. Grant, C. M. Metabolic reconfiguration is a regulated response to oxidative stress / C. M. Grant // *J. Biol.* – 2008. – Vol. 7, № 1. – P. 1.
144. Gruenbacher, G. Mevalonate Metabolism in Immuno-Oncology / G.Gruenbacher, M.Thurnher // *Frontiers in Immunology.* 2017. – 8 : 1714. doi:10.3389/fimmu.2017.01714.
145. Gusarova, G. A. Hypoxia leads to Na,K-ATPase downregulation via Ca(2+) release-activated Ca(2+) channels and AMPK activation / G. A. Gusarova, H. E. Trejo, L. A. Dada [et al.] // *Mol. Cell. Biol.* – 2011. – Vol. 31, № 17. – P. 3546–3556.
146. Guzy, R. D. Loss of the SdhB, but Not the SdhA, subunit of complex II triggers reactive oxygen species-dependent hypoxia-inducible factor activation and tumorigenesis / R. D. Guzy, B. Sharma, E. Bell [et al.] // *Mol. Cell. Biol.* – 2008. – Vol. 28, № 2. – P. 718–731.
147. Hamed, Y. B. 5,6-dihydro-2H-pyranones and 5,6-dihydro-2H-pyridones and their derivatives modulate in vitro human T lymphocyte function / Y. B. Hamed, A. Medjdoub, B. M. Kara [et al.] // *Mol. Cell. Biochem.* – 2012. – Vol. 360, № 1–2. – P. 23–33.
148. Hao, S. Uncharged tRNA and sensing of amino acid deficiency in mammalian piriform cortex / S. Hao, J. W. Sharp, C. M. Ross-Inta [et al.] // *Science.* – 2005. – Vol. 307, № 5716. – P. 1776–1778.
149. Harris, A. L. Hypoxia – a key regulatory factor in tumour growth / A. L. Harris // *Nat. Rev. Cancer.* – 2002. – Vol. 2, № 1. – P. 38–47.
150. Henze, A.T. The impact of hypoxia on tumor-associated macrophages / Henze A.T., Mazzone M. // *J. Clin. Invest.* – 2016. – Vol. 126, № 10. – P. 3672-3679.
151. Hilvo, M. Novel theranostic opportunities offered by characterization of altered membrane lipid metabolism in breast cancer progression / M.

- Hilvo, C. Denkert, L. Lehtinen [et al.] // *Cancer Res.* – 2011. – Vol. 71, № 9. – P. 3236–3245.
152. Holmes, M. D. COX-2 expression predicts worse breast cancer prognosis and does not modify the association with aspirin / M. D. Holmes, W. Y. Chen, S. J. Schnitt [et al.] // *Breast Cancer Res. Treat.* – 2011. – Vol. 130, № 2. – P. 657–662.
153. Hurwitz, M. D. Radiation therapy induces circulating serum Hsp72 in patients with prostate cancer / M. D. Hurwitz, P. Kaur, G. M. Nagaraja [et al.] // *Radiother. Oncol.* – 2010. – Vol. 95, № 3. – P. 350–358.
154. Husain, E. A. Heterogeneous topographic profiles of kinetic and cell cycle regulator microsatellites in atypical (dysplastic) melanocytic nevi / E. A. Husain, C. Mein, L. Pozo [et al.] // *Mod. Pathol.* – 2011. – Vol. 24, № 4. – P. 471–486.
155. Hwang, K. Alteration of the NAD<sup>+</sup>/NADH ratio in CHO cells by stable transfection with human cytosolic glycerol-3-phosphate dehydrogenase: resistance to oxidative stress / K. Hwang, D. W. Jeong, J. W. Lee [et al.] // *Mol. Cells.* – 1999. – Vol. 9, № 4. – P. 429–435.
156. Igney, F. H. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis / F. H. Igney, P. H. Krammer // *Nat. Rev. Cancer.* – 2002. – Vol. 2, № 4. – P. 277–288.
157. Isaacs, J. S. HIF overexpression correlates with biallelic loss of fumarate hydratase in renal cancer: novel role of fumarate in regulation of HIF stability / J. S. Isaacs, Y. J. Jung, D. R. Mole [et al.] // *Cancer Cell.* – 2005. – Vol. 8, № 2. – P. 143–153.
158. Ishikawa, K. ROS-generating mitochondrial DNA mutations can regulate tumor cell metastasis / K. Ishikawa, K. Takenaga, M. Akimoto [et al.] // *Science.* – 2008. – Vol. 320, № 5876. – P. 661–664.
159. Ji, B. COX-2 expression and tumor angiogenesis in thyroid carcinoma patients among northeast Chinese population-result of a single-center study /

- B. Ji, Y. Liu, P. Zhang [et al.] // *Int. J. Med. Sci.* – 2012. – Vol. 9, № 3. – P. 237–242.
160. Jiang, P. p53 regulates biosynthesis through direct inactivation of glucose-6-phosphate dehydrogenase / P. Jiang, W. Du, X. Wang [et al.] // *Nat. Cell Biol.* – 2011. – Vol. 13, № 3. – P. 310–316.
161. Johnson, J.M. MCT1 in invasive ductal carcinoma: monocarboxylate metabolism and aggressive breast cancer / J.M.Johnson, P.Cotzia, R.Fratamico, et al. // *Front. Cell Dev. Biol.* – 2017. – 5:27. doi:10.3389/fcell.2017.00027.
162. Jones, D. P. Mechanisms of pathogenesis in drug hepatotoxicity putting the stress on mitochondria / D. P. Jones, J. J. Lemasters, D. Han [et al.] // *Mol. Interv.* – 2010. – Vol. 10, № 2. – P. 98–111.
163. Kacevska, M. Extrahepatic cancer suppresses nuclear receptor-regulated drug metabolism / M. Kacevska, M. R. Downes, R. Sharma [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 2011. – Vol. 17, № 10. – P. 3170–3180.
164. Kalish, S.V. Macrophages reprogrammed in vitro towards the M1 phenotype and activated with LPS extend lifespan of mice with Ehrlich ascites carcinoma / S.V. Kalish, S.V. Lyamina, E.A. Usanova, E.B. Manukhina, N.P. Larionov, I.Y. Malyshev // *Med Sci Monit Basic Res.* 2015. V. 21. P. 226–234.
165. Kashiwagi, A. Pyruvate improves deleterious effects of high glucose on activation of pentose phosphate pathway and glutathione redox cycle in endothelial cells / A. Kashiwagi, Y. Nishio, T. Asahina [et al.] // *Diabetes.* – 1997. – Vol. 46, № 12. – P. 2088–2094.
166. Kaufmann, T. Fas death receptor signalling: roles of Bid and XIAP / T. Kaufmann, A. Strasser, P. J. Jost // *Cell Death Differ.* – 2012. – Vol. 19, № 1. – P. 42–50.
167. Kaul, G. Role of heat shock proteins in diseases and their therapeutic potential / G. Kaul, H. Thippeswamy // *Indian J. Microbiol.* – 2011. – Vol. 51, № 2. – P. 124–131.



168. Keith, B. HIF1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$ : sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression / B. Keith, R. S. Johnson, M. C. Simon // *Nat. Rev. Cancer.* – 2012. – Vol. 12, № 1. – P. 9–22.
169. Kelly, T. J. A hypoxia-induced positive feedback loop promotes hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  stability through miR-210 suppression of glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1-like / T. J. Kelly, A. L. Souza, C. B. Clish [et al.] // *Mol. Cell. Biol.* – 2011. – Vol. 31, № 13. – P. 2696–2706.
170. Kilburn, L. Glutathione S-transferase polymorphisms are associated with survival in anaplastic glioma patients / L. Kilburn, M. F. Okcu, T. Wang [et al.] // *Cancer.* – 2010. – Vol. 116, № 9. – P. 2242–2249.
171. Kim, J. H. Effect of glutathione administration on serum levels of reactive oxygen metabolites in patients with paraquat intoxication: a pilot study / J. H. Kim, H. W. Gil, J. O. Yang [et al.] // *Korean J. Intern. Med.* – 2010. – Vol. 25, № 3. – P. 282–287.
172. Kim, J. W. Cyclooxygenase and prostaglandin in cancer / J. W. Kim // *J. Korean Soc. Coloproctol.* – 2012. – Vol. 28, № 5. – P. 226–227.
173. Kim, J. W. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia / J. W. Kim, I. Tchernyshyov, G. L. Semenza [et al.] // *Cell Metab.* – 2006. – Vol. 3, № 3. – P. 177–185.
174. Kim, J. W. Hypoxia-inducible factor 1 and dysregulated c-Myc cooperatively induce vascular endothelial growth factor and metabolic switches hexokinase 2 and pyruvate dehydrogenase kinase 1 / J. W. Kim, P. Gao, Y. C. Liu [et al.] // *Mol. Cell. Biol.* – 2007. – Vol. 27, № 21. – P. 7381–7393.
175. Kim, Y. The role of the microenvironment in tumor growth and invasion / Y. Kim, M. A. Stolarska, H. G. Othmer // *Prog. Biophys. Mol. Biol.* – 2011. – Vol. 106, № 2. – P. 353–379.

176. Kimball, S. R. Role of amino acids in the translational control of protein synthesis in mammals / S. R. Kimball, L. S. Jefferson // *Semin. Cell Dev. Biol.* – 2005. – Vol. 16, № 1. – P. 21–27.
177. King, A. Succinate dehydrogenase and fumarate hydratase: linking mitochondrial dysfunction and cancer / A. King, M. A. Selak, E. Gottlieb // *Oncogene.* – 2006. – Vol. 25, № 34. – P. 4675–4682.
178. Kiyatkin, E. A. Expression of heat shock protein (HSP 72 kDa) during acute methamphetamine intoxication depends on brain hyperthermia: neurotoxicity or neuroprotection? / E. A. Kiyatkin, H. S. Sharma // *J. Neural Transm.* – 2011. – Vol. 118, № 1. – P. 47–60.
179. Kochenov, D. A. Approximation of function of C[A,B] class by neural-net predictors (architectures and results) / D. A. Kochenov, D. A. Rossiev // *AMSE Transaction Scientific Siberian, Series A, Exact & Natural Sciences, Neurocomputing.* – AMSE Press, Tassin, France, 1993. – Vol. 6. – P. 189-203.
180. Korkaya, H. Breast cancer stem cells, cytokine networks, and the tumor microenvironment / H. Korkaya, S. Liu, M. S. Wicha // *J. Clin. Invest.* – 2011. – Vol. 121, № 10. – P. 3804–3809.
181. Koukourakis, M. I. Comparison of metabolic pathways between cancer cells and stromal cells in colorectal carcinomas: a metabolic survival role for tumor-associated stroma / M. I. Koukourakis, A. Giatromanolaki, A. L. Harris [et al.] // *Cancer Res.* – 2006. – Vol. 66, № 2. – P. 632–637.
182. Kratochwill, K. Interleukin-1 receptor-mediated inflammation impairs the heat shock response of human mesothelial cells / K. Kratochwill, M. Lechner, A. M. Lichtenauer [et al.] // *Am. J. Pathol.* – 2011. – Vol. 178, № 4. – P. 1544–1555.
183. Kroemer, G. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death / G. Kroemer, L. Galluzzi, C. Brenner // *Physiol. Rev.* – 2007. – Vol. 87, № 1. – P. 99–163.

184. Kroemer, G. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel / G. Kroemer, J. Pouyssegur // *Cancer Cell*. – 2008. – Vol. 13, № 6. – P. 472–482.
185. Kurhanewicz, J. Analysis of cancer metabolism by imaging hyperpolarized nuclei: prospects for translation to clinical research / J. Kurhanewicz, D. B. Vigneron, K. Brindle [et al.] // *Neoplasia*. – 2011. – Vol. 13, № 2. – P. 81–97.
186. Lee, J. Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling / J. Lee, S. Giordano, J. Zhang // *Biochem. J*. – 2012. – Vol. 441, № 2. – P. 523–540.
187. Lee, J. W. G6PD up-regulation promotes pancreatic beta-cell dysfunction / J. W. Lee, A. H. Choi, M. Ham [et al.] // *Endocrinology*. – 2011. – Vol. 152, № 3. – P. 793–803.
188. Lee, S. H. Glutathione s-transferase m1 and t1 polymorphisms and susceptibility to oxidative damage in healthy korean smokers / S. H. Lee, E. Park, Y. K. Park // *Ann. Nutr. Metab*. – 2010. – Vol. 56, № 1. – P. 52–58.
189. Lee, S. Neuronal apoptosis linked to EglN3 prolyl hydroxylase and familial pheochromocytoma genes: developmental culling and cancer / S. Lee, E. Nakamura, H. Yang [et al.] // *Cancer Cell*. – 2005. – Vol. 8, № 2. – P. 155–167.
190. Levine, A. J. The control of the metabolic switch in cancers by oncogenes and tumor suppressor genes / A. J. Levine, A. M. Puzio-Kuter // *Science*. – 2010. – Vol. 330, № 6009. – P. 1340–1344.
191. Li, W. Antioxidant properties of cis-Z,Z'-3a,7a',7a,3a'-dihydroxyiligustilide on human umbilical vein endothelial cells in vitro / W. Li, Y. Wu, X. Liu [et al.] // *Molecules*. – 2013. – Vol. 18, № 1. – P. 520–534.
192. Liao, B. Hypoxia induces intracellular Ca<sup>2+</sup> release by causing reactive oxygen species-mediated dissociation of FK506-binding protein 12.6 from ryanodine receptor 2 in pulmonary artery myocytes / B. Liao, Y.

- M. Zheng, V. R. Yadav [et al.] // *Antioxid. Redox Signal.* – 2011. – Vol. 14, № 1. – P. 37–47.
193. Lima-Junior, J. C. Cells and mediators of inflammation (C-reactive protein, nitric oxide, platelets and neutrophils) in the acute and convalescent phases of uncomplicated *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infection / J. C. Lima-Junior, R. N. Rodrigues-da-Silva, V. A. Pereira [et al.] // *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* – 2012. – Vol. 107, № 8. – P. 1035–1041.
194. Liu, P. Oncogenic PIK3CA-driven mammary tumors frequently recur via PI3K pathway-dependent and PI3K pathway-independent mechanisms / P. Liu, H. Cheng, S. Santiago [et al.] // *Nat. Med.* – 2011. – Vol. 17, № 9. – P. 1116–1120.
195. Lü, J. M. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems / J. M. Lü, P. H. Lin, Q. Yao [et al.] // *J. Cell. Mol. Med.* – 2010. – Vol. 14, № 4. – P. 840–860.
196. MacKenzie, E. D. Cell-permeating alpha-ketoglutarate derivatives alleviate pseudohypoxia in succinate dehydrogenase-deficient cells / E. D. MacKenzie, M. A. Selak, D. A. Tennant [et al.] // *Mol. Cell. Biol.* – 2007. – Vol. 27, № 9. – P. 3282–3289.
197. Mandapathil, M. Targeting human inducible regulatory T cells (Tr1) in patients with cancer: blocking of adenosine-prostaglandin E2 cooperation / M. Mandapathil, T. L. Whiteside // *Expert Opin. Biol. Ther.* – 2011. – Vol. 11, № 9. – P. 1203–1214.
198. Mantovani, A. Macrophage Metabolism Shapes Angiogenesis in Tumors / A. Mantovani, M. Locati // *Cell Metab.* – 2016. – Vol. 24, № 5. – P. 653–654.
199. Marczak, A. Damage to the cell antioxidative system in human erythrocytes incubated with idarubicin and glutaraldehyde / A. Marczak, Z. Józwiak // *Toxicol. In Vitro.* – 2009. – Vol. 23, № 6. – P. 1188–1194.

200. Marí, M. Mitochondrial glutathione, a key survival antioxidant / M. Marí, A. Morales, A. Colell [et al.] // *Antioxid. Redox Signal.* – 2009. – Vol. 11, № 11. – P. 2685–2700.
201. Mariappan, N. TNF-induced mitochondrial damage: a link between mitochondrial complex I activity and left ventricular dysfunction / N. Mariappan, C. M. Elks, B. Fink [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – 2009. – Vol. 46, № 4. – P. 462–470.
202. Martin, L. J. The mitochondrial permeability transition pore in motor neurons: involvement in the pathobiology of ALS mice / L. J. Martin, B. Gertz, Y. Pan [et al.] // *Exp. Neurol.* – 2009. – Vol. 218, № 2. – P. 333–346.
203. Martinez-Outschoorn, U. E. Cancer cells metabolically ‘fertilize’ the tumor microenvironment with hydrogen peroxide, driving the Warburg effect: implications for PET imaging of human tumors / U. E. Martinez-Outschoorn, Z. Lin, C. Trimmer [et al.] // *Cell Cycle.* – 2011. – Vol. 10, № 15. – P. 2504–2520.
204. Matheny, H. E. Lymphocyte migration through monolayers of endothelial cell lines involves VCAM-1 signaling via endothelial cell NADPH oxidase / H. E. Matheny, T. L. Deem, J. M. Cook-Mills // *J. Immunol.* – 2000. – Vol. 164, № 12. – P. 6550–6559.
205. Mathivanan, S. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication / S. Mathivanan, H. Ji, R. J. Simpson // *J. Proteomics.* – 2010. – Vol. 73, № 10. – P. 1907–1920.
206. Matsuda, M. Prevention of UVB radiation-induced epidermal damage by expression of heat shock protein 70 / M. Matsuda, T. Hoshino, Y. Yamashita [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2010. – Vol. 285, № 8. – P. 5848–5858.
207. Menendez, J. A. Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis / J. A. Menendez, R. Lupu // *Nat. Rev. Cancer.* – 2007. – Vol. 7, № 10. – P. 763–777.

208. Mezrich, J. D. An interaction between kynurenine and the aryl hydrocarbon receptor can generate regulatory T cells / J. D. Mezrich, J. H. Fechner, X. Zhang [et al.] // *J. Immunol.* – 2010. – Vol. 185, № 6. – P. 3190–3198.
209. Michor, F. The origins and implications of intratumor heterogeneity / F. Michor, K. Polyak // *Cancer Prev. Res. (Phila).* – 2010. – Vol. 3, № 11. – P. 1361–1364.
210. Mielczarek, M. Arginase as a useful factor for the diagnosis of colorectal cancer liver metastases / M. Mielczarek, A. Chrzanowska, D. Scibior [et al.] // *Int. J. Biol. Markers.* – 2006. – Vol. 21, № 1. – P. 40–44.
211. Mocellin, S. Nitric oxide, a double edged sword in cancer biology: searching for therapeutic opportunities / S. Mocellin, V. Bronte, D. Nitti // *Med. Res. Rev.* – 2007. – Vol. 27, № 3. – P. 317–352.
212. Montero, J. Why do BCL-2 inhibitors work and where should we use them in the clinic? / J. Montero, A. Letai // *Cell Death Differ.* – 2018 – 25 (1) P. 56-64.
213. Moreno-Sánchez, R. Energy metabolism in tumor cells / R. Moreno-Sánchez, S. Rodríguez-Enríquez, A. Marín-Hernández [et al.] // *FEBS J.* – 2007. – Vol. 274, № 6. – P. 1393–1418.
214. Morgan, P. E. Interactions of transmembrane carbonic anhydrase, CAIX, with bicarbonate transporters / P. E. Morgan, S. Pastoreková, A. K. Stuart-Tilley [et al.] // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2007. – Vol. 293, № 2. – P. C738–C748.
215. Morina, K. Engineering the respiratory complex I to energy-converting NADPH: ubiquinone oxidoreductase / K. Morina, M. Schulte, F. Hubrich [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2011. – Vol. 286, № 40. – P. 34627–34634.
216. Mráček, T. The function and the role of the mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase in mammalian tissues / T. Mráček, Z. Drahot, J. Houšťek // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2013. – Vol. 1827, № 3. – P. 401–410.

217. Munn, D. H. Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor-induced tolerance / D. H. Munn, A. L. Mellor // *J. Clin. Invest.* – 2007. – Vol. 117, № 5. – P. 1147–1154.
218. Muralidharan, S. Cellular stress response and innate immune signaling: integrating pathways in host defense and inflammation / S. Muralidharan, P. Mandrekar // *J. Leukoc. Biol.* – 2013. – Vol. 94, № 6. – P. 1167–1184.
219. Nkhoma, E. T. The global prevalence of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: a systematic review and meta-analysis / E. T. Nkhoma, C. Poole, V. Vannappagari [et al.] // *Blood Cells Mol. Dis.* – 2009. – Vol. 42, № 3. – P. 267–278.
220. Nomura, D. K. Monoacylglycerol lipase regulates a fatty acid network that promotes cancer pathogenesis / D. K. Nomura, J. Z. Long, S. Niessen [et al.] // *Cell.* – 2010. – Vol. 140, № 1. – P. 49-61.
221. Norian, L. A. Tumor-infiltrating regulatory dendritic cells inhibit CD8+ T cell function via L-arginine metabolism / L. A. Norian, P. C. Rodriguez, L. A. O'Mara [et al.] // *Cancer Res.* – 2009. – Vol. 69, № 7. – P. 3086–3094.
222. Ogino, S. Cancer immunology – analysis of host and tumor factors for personalized medicine / S. Ogino, J. Galon, C. S. Fuchs [et al.] // *Nat. Rev. Clin. Oncol.* – 2011. – Vol. 8, № 12. – P. 711–719.
223. Ognjanović, B. I. Lipid peroxidative damage on Cisplatin exposure and alterations in antioxidant defense system in rat kidneys: a possible protective effect of selenium / B. I. Ognjanović, N. Z. Djordjević, M. M. Matic [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2012. – Vol. 13, № 2. – P. 1790–1803.
224. Oldenburg, J. Cisplatin-induced long-term hearing impairment is associated with specific glutathione s-transferase genotypes in testicular cancer survivors / J. Oldenburg, S. M. Kraggerud, M. Cvancarova [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2007. – Vol. 25, № 6. – P. 708–714.

225. Olinescu, A. Natural cell-mediated cytotoxicity in Ehrlich ascites tumor-bearing mice / A. Olinescu, S. Hristescu, E. Mazilu // *Neoplasma*. – 1983. – Vol. 30, № 2. – P. 147–152.
226. Ozaslan, M. Ehrlich ascites carcinoma / M. Ozaslan, I. D. Karagoz, I. H. Kilic [et al.] // *Afric. J. Biotechnol.* – 2011. – Vol. 10, № 13. – P. 2375–2378.
227. Papandreou, I. HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption / I. Papandreou, R. A. Cairns, L. Fontana [et al.] // *Cell Metab.* – 2006. – Vol. 3, № 3. – P. 187–197.
228. Patel, V. P. Nuclear transport, oxidative stress, and neurodegeneration / V. P. Patel, C. T. Chu // *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* – 2011. – Vol. 4, № 3. – P. 215–229.
229. Pawaria, S. A role for the Heat Shock Protein-CD91 axis in initiation of immune responses to tumors / S. Pawaria, M. N. Messmer, Y. Zhou [et al.] // *Immunol. Res.* – 2011. – Vol. 50, № 2-3. – P. 255–260.
230. Payen, V.L. Monocarboxylate transporter MCT1 promotes tumor metastasis independently of its activity as a lactate transporter / V.L. Payen, M.Y. Hsu, K.S. Rådecke et al. // *Therapeutics, Targets, and Chemical Biology*. – 2017. – V. 77. – Issue 20. – P. 5591-5601.
231. Pedersen, P. L. Warburg, me and Hexokinase 2: Multiple discoveries of key molecular events underlying one of cancers' most common phenotypes, the “Warburg Effect”, i.e., elevated glycolysis in the presence of oxygen / P. L. Pedersen // *J. Bioenerg. Biomembr.* – 2007. – Vol. 39. – P. 211–222.
232. Peixoto, P. M. The therapeutic potential of mitochondrial channels in cancer, ischemia-reperfusion injury, and neurodegeneration / P. M. Peixoto, L. M. Dejean, K. W. Kinnally // *Mitochondrion*. – 2012. – Vol. 12, № 1. – P. 14–23.



233. Pennacchietti, S. Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met protooncogene / S. Pennacchietti, P. Michieli, M. Galluzzo [et al.] // *Cancer Cell*. – 2003. – Vol. 3, № 4. – P. 347–361.
234. Perl, A. Oxidative stress, inflammation and carcinogenesis are controlled through the pentose phosphate pathway by transaldolase / A. Perl, R. Hanczko, T. Telarico [et al.] // *Trends Mol. Med.* – 2011. – Vol. 17, № 7. – P. 395–403.
235. Peterson, C. W. An extended Myc network contributes to glucose homeostasis in cancer and diabetes / C. W. Peterson, D. E. Ayer // *Front. Biosci.* – 2012. – Vol. 17. – P. 2206–2223.
236. Plathow, C. Tumor cell metabolism imaging / C. Plathow, W. A. Weber // *J. Nucl. Med.* – 2008. – Vol. 49, Suppl. 2. – P. 43S–63S.
237. Pollard, P. J. Accumulation of Krebs cycle intermediates and over-expression of HIF1alpha in tumours which result from germline FH and SDH mutations / P. J. Pollard, J. J. Briere, N. A. Alam [et al.] // *Hum. Mol. Genet.* – 2005. – Vol. 14, № 15. – P. P. 2231–2239.
238. Polyak K. Co-evolution of tumor cells and their microenvironment / K. Polyak, I. Haviv, I.G. Campbell // *Trends Genet.* 2009, 25, 30–38.
239. Polyak, K. Heterogeneity in breast cancer / K. Polyak // *J. Clin. Invest.* – 2011. – Vol. 121, № 10. – P. 3786–3788.
240. Pouyssegur, J. Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression / J. Pouyssegur, F. Dayan, N. M. Mazure // *Nature*. – 2006. – Vol. 441, № 7092. – P. 437–443.
241. Puccetti, P. IDO and regulatory T cells: a role for reverse signalling and non-canonical NF-kappaB activation / P. Puccetti, U. Grohmann // *Nat. Rev. Immunol.* – 2007. – Vol. 7. – P. 817–823.
242. Qin, Z. Extracellular Hsp90 serves as a co-factor for MAPK activation and latent viral gene expression during de novo infection by KSHV / Z. Qin, M. DeFee, J. Isaacs [et al.] // *Virology*. – 2010. – Vol. 403, № 1. – P. 92–102.

243. Rabinovich, G. A. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells / G. A. Rabinovich, D. Gabilovich, E. M. Sotomayor // *Annu. Rev. Immunol.* – 2007. – Vol. 25. – P. 267-296.
244. Raghavamenon, A.  $\alpha$ -Tocopherol is Ineffective in preventing the decomposition of preformed lipid peroxides and may promote the accumulation of toxic aldehydes: a potential explanation for the failure of antioxidants to affect human atherosclerosis / A. Raghavamenon, M. Garelnabi, S. Babu [et al.] // *Antioxid. Redox Signal.* – 2009. – Vol. 11, № 6. – P. 1237–1248.
245. Ray, P. D. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling / P. D. Ray, B. W. Huang, Y. Tsuji // *Cell. Signal.* – 2012. – Vol. 24, № 5. – P. 981–990.
246. Raz, D.J. Editorial on “Transcription factor SPZ1 promotes TWIST-mediated epithelial—mesenchymal transition and oncogenesis in human liver cancer” / D.J. Raz // *J. Thorac Dis.* – 2017 – 9 (11) – P.4143-4145.
247. Reitman, Z. J. Isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations in cancer: alterations at a crossroads of cellular metabolism / Z. J. Reitman, H. Yan // *J. Natl Cancer Inst.* – 2010. – Vol. 102, № 13. – P. 932–941.
248. Rendon, B. Mechanisms of macrophage migration inhibitory factor (MIF)-dependent tumor microenvironmental adaptation / B. Rendon, S. S. Willer, W. Zundel [et al.] // *Exp. Mol. Pathol.* – 2009. – Vol. 86, № 3. – P. 180–185.
249. Rodriguez, P. C. T cell dysfunction in cancer: role of myeloid cells and tumor cells regulating amino acid availability and oxidative stress / P. C. Rodriguez, A. C. Ochoa // *Semin. Cancer Biol.* – 2006. – Vol. 16, № 1. – P. 66–72.
250. Rose, M. L. Kupffer cell oxidant production is central to the mechanism of peroxisome proliferators / M. L. Rose, C. A. Rivera, B. U. Bradford [et al.] // *Carcinogenesis.* – 1999. – Vol. 20, № 1. – P. 27–33.

251. Rysman, E. De novo lipogenesis protects cancer cells from free radicals and chemotherapeutics by promoting membrane lipid saturation / E. Rysman, K. Brusselmans, K. Scheys [et al.] // *Cancer Re.* – 2010. – Vol. 70, № 20. – P. 8117–8126.
252. Ryu, K. Y. Role of TGF- $\beta$  in Survival of Phagocytizing Microglia: Autocrine Suppression of TNF- $\alpha$  Production and Oxidative Stress / K. Y. Ryu, G. S. Cho, H. Z. Piao [et al.] // *Exp. Neurobiol.* – 2012. – Vol. 21, № 4. – P.151–157.
253. Samudio, I. Pharmacologic inhibition of fatty acid oxidation sensitizes human leukemia cells to apoptosis induction / I. Samudio, R. Harmancey, M. Fiegl [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2010. – Vol.120, № 1. – P.142–156.
254. Sánchez-Valle, V. Role of oxidative stress and molecular changes in liver fibrosis: a review / V. Sánchez-Valle, N. C. Chávez-Tapia, M. Uribe [et al.] // *Curr. Med. Chem.* 2012. – Vol. 19, № 28. – P. 4850–4860.
255. Santa-Cecília, F.V. 7-epiclusianone, the natural prenylated benzophenone, inhibits superoxide anions in the neutrophil respiratory burst / F. V. Santa-Cecília, G. B. Santos, C. N. Fuzissaki [et al.] // *J. Med. Food.* – 2012. – Vol. 15, № 2. – P. 200–205.
256. Schlisser, A. E. Teratogen-induced oxidative stress targets glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in the organogenesis stage mouse embryo / A. E. Schlisser, J. Yan, B. F. Hales // *Toxicol. Sci.* – 2010. – Vol. 118, № 2. – P. 686–695.
257. Selak, M. A. Redox stress is not essential for the pseudohypoxic phenotype of succinate dehydrogenase deficient cells / M. A. Selak, R. V. Duran, E. Gottlieb // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2006. – Vol. 1757, № 5–6. – P. 567–572.
258. Selak, M. A. Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF- $\alpha$  prolyl hydroxylase / M. A. Selak, S. M. Armour, E. D. MacKenzie [et al.] // *Cancer Cell.* – 2005. – Vol. 7, № 1. – P. 77–85.

259. Selye, H. Stress and the general adaptation syndrome / H. Selye // *Br. Med. J.* –1950. – Vol. 1, № 4667. – P. 1383–1392.
260. Semenza, G. L. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine / G. L. Semenza // *Cell.* – 2012. – Vol. 148, № 3. – P. 399–408.
261. Serafini, P. Myeloid suppressor cells in cancer: recruitment, phenotype, properties, and mechanisms of immune suppression / P. Serafini, I. Borrello, V. Bronte // *Semin. Cancer Biol.* – 2006. – Vol.16, № 1. – P. 53–65.
262. Shah, D. Association between T-lymphocyte sub-sets apoptosis and peripheral blood mononuclear cells oxidative stress in systemic lupus erythematosus / D. Shah, A. Aggarwal, A. Bhatnagar [et al.] // *Free Radic. Res.* – 2011. – Vol. 45, № 5. – P. 559–567.
263. Sharma, S. Tumor cyclooxygenase-2/prostaglandin E2-dependent promotion of FOXP3 expression and CD4+CD25+ T regulatory cell activities in lung cancer / S. Sharma, S. C. Yang, L. Zhu [et al.] // *Cancer Res.* – 2005. – Vol. 65, № 12. – P. 5211–5220.
264. Shaw, R. J. Glucose metabolism and cancer / R. J. Shaw // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 2006. – Vol. 18, № 6. – P. 598–608.
265. Shaw, R. J. Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth / R. J. Shaw, L. C. Cantley // *Nature.* – 2006. – Vol. 441, № 7092. – P. 424–430.
266. Shiao, S. L. Immune microenvironments in solid tumors: new targets for therapy / S. L. Shiao, A. P. Ganesan, H. S. Rugo [et al.] // *Genes Dev.* – 2011. – Vol. 25, № 24. – P. 2559–2572.
267. Shiroki, T. Enhanced expression of the M2 isoform of pyruvate kinase is involved in gastric cancer development by regulating cancer-specific metabolism / T. Shiroki, M. Yokoyama, N. Tanuma, et al. // *Cancer Science.* – 2017 – V. 108(5) – P. 931-940.
268. Simar, D. Heat shock proteins induction reduces stress kinases activation, potentially improving insulin signalling in monocytes from obese

- subjects / D. Simar, A. Jacques, C. Caillaud // *Cell Stress Chaperones*. – 2012. – Vol. 17, № 5. – P. 615–621.
269. Simpkins, W. Mitochondrial mechanisms of estrogen neuroprotection / W. Simpkins, K. D. Yi, S. H. Yang [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2010. – Vol. 1800, № 10. – P. 1113–1120.
270. Singh, D. Overexpression of hypoxia-inducible factor and metabolic pathways: possible targets of cancer / D. Singh, R. Arora, P. Kaur, B. Singh et al. // *Cell & Bioscience*. – 2017. – 7:62. doi:10.1186/s13578-017-0190-2.
271. Sirotkin, A. V. Heat shock proteins in porcine ovary: synthesis, accumulation and regulation by stress and hormones / A. V. Sirotkin, M. Bauer // *Cell Stress Chaperones*. – 2011. – Vol. 16, № 4. – P. 379–387.
272. Sivina, M. CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ) plasma levels and the risk for disease progression in chronic lymphocytic leukemia / M. Sivina, E. Hartmann, T. J. Kipps [et al.] // *Blood*. – 2011. – Vol. 117, № 5. – P. 1662–1669.
273. Sivitz, W. I. Mitochondrial dysfunction in diabetes: from molecular mechanisms to functional significance and therapeutic opportunities / W. I. Sivitz, M. A. Yorek // *Antioxid. Redox Signal*. – 2010. – Vol. 12, № 4. – P. 537–577.
274. Smolkova, K. The role of mitochondrial NADPH-Dependent isocitrate dehydrogenase in cancer cells [Electronic resource] / K. Smolkova, P. Jezek // *Int. J. Cell Biol*. – 2012. – URL: <http://www.hindawi.com/journals/ijcb/2012/273947/>.
275. Soave, D.F. The Fate of the Tumor in the Hands of Microenvironment: Role of TAMs and mTOR Pathway [Electronic resource] / D.F. Soave, M.P. Miguel, F.D Tomé. L.B. de Menezes, P.R. Nagib, M.R. Celes // *Mediators of Inflammation*. – 2016. – Vol. 2016. URL: <https://www.hindawi.com/journals/mi/2016/8910520>.
276. Sorensen, R. B. Indoleamine 2,3-dioxygenase specific, cytotoxic T cells as immune regulators / R. B. Sorensen, S. R. Hadrup, I. M. Svane [et al.] // *Blood*. – 2011/ – Vol. 117, № 7. – P. 2200–2210.

277. Sotgia, F. Mitochondrial metabolism in cancer metastasis: Visualizing tumor cell mitochondria and the “reverse Warburg effect” in positive lymph node tissue / F. Sotgia, D. Whitaker-Menezes, U. E. Martinez-Outschoorn [et al.] // *Cell Cycle*. – 2012. – Vol. 11, № 7. – P. 1445–1454.
278. Stankowski, J. N. C-terminus of heat shock cognate 70 interacting protein increases following stroke and impairs survival against acute oxidative stress / J. N. Stankowski, S. L. Zeiger, E. L. Cohen [et al.] // *Antioxid. Redox Signal*. – 2011. – Vol. 14, № 10. – P. 1787–1801.
279. Stanton, R. C. Glucose-6-phosphate dehydrogenase, NADPH, and cell survival / R. C. Stanton // *IUBMB Life*. – 2012. – Vol. 64, № 5. – P. 362–369.
280. Stice, J. P. 17 $\beta$ -Estradiol, aging, inflammation, and the stress response in the female heart / J. P. Stice, L. Chen, S. C. Kim [et al.] // *Endocrinology*. – 2011. – Vol. 152, № 4. – P. 1589–1598.
281. Sucher, R. IDO-Mediated Tryptophan Degradation in the pathogenesis of Malignant Tumor Disease / R. Sucher, K. Kurz, G. Weiss [et al.] // *Int. J. Tryptophan Res.* – 2010. – Vol. 3. – P. 113–120.
282. Sugadev, R. Structural analysis of NADPH depleted bovine liver catalase and its inhibitor complexes / R. Sugadev, M. N. Ponnuswamy, K. Sekar [et al.] // *Int. J. Biochem. Mol. Biol.* – 2011. – Vol. 2, № 1. – P. 67–77.
283. Suliman, H. B. Nitric oxide synthase-2 regulates mitochondrial hsp60 chaperone function during bacterial peritonitis in mice / H. B. Suliman, A. Babiker, C. M. Withers [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – 2010. – Vol. 48, № 5. – P. 736–746.
284. Swierczynski, J. Role of abnormal lipid metabolism in development, progression, diagnosis and therapy of pancreatic cancer / J. Swierczynski, A. Hebanowska, T. Sledzinski // *World J. Gastroenterol.* – 2014. – Vol. 20, № 9. – P. 2279-2303.

285. Swietach, P. Regulation of tumor pH and the role of carbonic anhydrase 9 / P. Swietach, R. D. Vaughan-Jones, A. L. Harris // *Cancer Metastasis Rev.* – 2007. – Vol. 26, № 2. – P. 299–310.
286. Tarricone, E. Cellular distribution of Hsp70 expression in rat skeletal muscles. Effects of moderate exercise training and chronic hypoxia / E. Tarricone, C. Scapin, M. Vitadello [et al.] // *Cell Stress Chaperones.* – 2008. – Vol.13, № 4. – P. 483–495.
287. Taylor, C. T. Oxygen, hypoxia, and stress / C. T. Taylor, J. Pouyssegur // *Ann. N Y Acad. Sci.* – 2007. – Vol.1113. – P. 87–94.
288. Tennant, D. A. Targeting metabolic transformation for cancer therapy / D. A. Tennant, R. V. Durán, E. Gottlieb // *Nat. Rev. Cancer.* – 2010. – Vol. 10, № 4. – P. 267–277.
289. Tew, K. D. Glutathione-s-transferases as determinants of cell survival and death / K. D. Tew, D. M. Townsend // *Antioxid. Redox Signal.* – 2012. – Vol. 17, № 12. – P. 1728–1737.
290. Tissières, A. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs / A. Tissières, H. K. Mitchell, U. M. Tracy // *J. Mol. Biol.* – 1974. – Vol. 84, № 3. – P. 389–398.
291. Toldi G. Human Th1 and Th2 lymphocytes are distinguished by calcium flux regulation during the first 10 min of lymphocyte activation / G. Toldi, A. Kaposi, Á. Zsembery [et al.] // *Immunobiology.* – 2012. – Vol. 217, № 1. – P. 37–43.
292. Tomiyama, A. Critical role for mitochondrial oxidative phosphorylation in the activation of tumor suppressors Bax and Bak / A. Tomiyama, S. Serizawa, K. Tachibana [et al.] // *J. Natl. Cancer Inst.* – 2006. – Vol. 98, № 20. – P. 1462–1473.
293. Tong, X. The molecular determinants of de novo nucleotide biosynthesis in cancer cells / X. Tong, F. Zhao, C. B. Thompson // *Curr. Opin. Genet. Dev.* – 2009. – Vol. 19, № 1. – P. 32–37.

294. Toschi, A. Phospholipase D-mTOR requirement for the Warburg effect in human cancer cells / A. Toschi, E. Lee, S. Thompson [et al.] // *Cancer Lett.* – 2010. – Vol. 299, № 1. – P. 72–79.
295. Uriarte, S. M. Granule exocytosis contributes to priming and activation of the human neutrophil respiratory burst / S. M. Uriarte, M. J. Rane, G. C. Luerman [et al.] // *J. Immunol.* – 2011. – Vol. 187, № 1. – P. 391–400.
296. Vamecq, J. Mitochondrial dysfunction and lipid homeostasis / J. Vamecq, A. F. Dessen, M. Fontaine [et al.] // *Curr. Drug Metab.* – 2012. – Vol. 13, № 10. – P. 1388–1400.
297. van Riggelen, J. MYC as a regulator of ribosome biogenesis and protein synthesis / J. van Riggelen, A. Yetil, D. W. Felsher // *Nat. Rev. Cancer.* – 2010. – Vol. 10, № 4. – P. 301–309.
298. Vatrinet, R. The  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase complex in cancer metabolic plasticity / R. Vatrinet, G. Leone, M. De Luise, G. Girolimetti et al. / *Cancer & Metabolism.* – 2017. – 5:3. <http://doi.org/10.1186/s40170-017-0165-0>.
299. Viola, A. Metabolic mechanisms of cancer-induced inhibition of immune responses / A. Viola, V. Bronte // *Semin. Cancer Biol.* – 2007. – Vol. 17, № 4. – P. 309–316.
300. Wang, C. L. Extracellular polysaccharides produced by *Ganoderma formosanum* stimulate macrophage activation via multiple pattern-recognition receptors / C. L. Wang, C. Y. Lu, C. C. Pi [et al.] // *BMC Complement. Altern. Med.* – 2012. – Vol. 12, № 1. – P. 119.
301. Wang, D. Eicosanoids and cancer / D. Wang, R. N. DuBois // *Nat. Rev. Cancer.* – 2010. – Vol. 10, № 3. – P. 181–193.
302. Wang, G. Endoplasmic reticulum stress response in cancer: molecular mechanism and therapeutic potential / G. Wang, Z. Yang, K. Zhang // *Am. J. Transl. Res.* – 2010. – Vol. 2, № 1. – P. 65–74.



303. Wang, H. Q. Positive feedback regulation between AKT activation and fatty acid synthase expression in ovarian carcinoma cells / H. Q. Wang, D. A. Altomare, K. L. Skele [et al.] // *Oncogene*. – 2005. – Vol. 24, № 22. – P. 3574–3582.
304. Wang, S. Dynamic effect of heat shock pretreatment on apoptotic responses to TNF-alpha in liver cells / S. Wang, P. C. Chen, F. Berthiaume [et al.] // *J. Biomech. Eng.* – 2009. – Vol. 131, № 7. – P. 071003.
305. Wang, X. Mdm2 and MdmX partner to regulate p53 / X. Wang, X. Jiang // *FEBS Lett.* – 2012. – Vol. 586, № 10. – P. 1390–1396.
306. Warburg, O. On the origin of cancer cells / O. Warburg // *Science*. – 1956. – Vol. 123, № 3191. – P. 309–314.
307. Warburg, O. Uber den Stoffwechsel der Tumoren / O. Warburg, K. Posener, E. Negelein // *Biochem. Z.* – 1924. – Vol. 152. – P. 319–344.
308. Wei, J. M1 to M2 Macrophage Polarization in HB-EGF Therapy for NEC / J. Wei, G.E. Besner // *The Journal of surgical research*. 2015. – Vol. 197, № 1. – P. 126-138.
309. Weinhouse, S. On respiratory impairment in cancer cells / S. Weinhouse // *Science*. – 1956. – Vol. 124, № 3215. – P. 267–269.
310. Wellen, K. E. Cellular metabolic stress: considering how cells respond to nutrient excess / K. E. Wellen, C. B. Thompson // *Mol. Cell*. – 2010. – Vol. 40, № 2. – P. 323–332.
311. Wenger, J. B. Combination therapy targeting cancer metabolism / J. B. Wenger, S. Y. Chun, D. T. Dang [et al.] // *Med. Hypotheses*. – 2011. – Vol. 76, № 2. – P. 169–172.
312. White, K. L. Ovarian cancer risk associated with inherited inflammation-related variants / K. L. White, J. M. Schildkraut, R. T. Palmieri [et al.] // *Cancer Res*. – 2012. – Vol. 72, № 5. – P. 1064–1069.
313. Wood, K. L. The role of heat shock protein 27 in bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation / K. L. Wood, D. R. Nunley,

- S. Moffatt-Bruce [et al.] // *J. Heart Lung Transplant.* – 2010. – Vol. 29, № 7. – P. 786–791.
314. Wu, X. H. Expression and significance of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  and glucose transporter-1 in laryngeal carcinoma / X. H. Wu, S. P. Shen, J. Y. Mao [et al.] // *Oncol. Lett.* – 2013. – Vol. 5, № 1. – P. 261–266.
315. Xiao H., Wang J., Yan W., Cui Y. et al. GLUT1 regulates cell glycolysis and proliferation in prostate cancer / H. Xiao, J. Wang, W. Yan, Y. Cui et al. // *Prostate.* – 2018 – 78 (2) – P. 86-94.
316. Xu, J. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) competes with 20S proteasome for binding with C/EBP $\alpha$  leading to its stabilization and protection against radiation-induced myeloproliferative disease / J. Xu, A. K. Jaiswal // *J. Biol. Chem.* – 2012. – Vol. 287, № 50. – P. 41608–41618.
317. Xu, Y. Glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient mice have increased renal oxidative stress and increased albuminuria / Y. Xu, Z. Zhang, J. Hu [et al.] // *FASEB J.* – 2010. – Vol. 24, № 2. – P. 609–616.
318. Yan, S. Functional interplay between ATM/ATR-mediated DNA damage response and DNA repair pathways in oxidative stress / S. Yan, M. Sorrell, Z. Berman // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2014. – Vol. 71, № 20. – P. 3951–3967.
319. Yang, M. H. Direct regulation of TWIST by HIF-1 $\alpha$  promotes metastasis / M. H. Yang, M. Z. Wu, S. H. Chiou [et al.] // *Nat. Cell Biol.* – 2008. – Vol. 10, № 3. – P. 295–305.
320. Yang, Z. J. Autophagy modulation for cancer therapy / Z. J. Yang, C. E. Chee, S. Huang [et al.] // *Cancer Biol. Ther.* – 2011. – Vol. 11, № 2. – P. 169–176.
321. Zakharchenko, M. V. Burst of succinate dehydrogenase and  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase activity in concert with the expression of genes coding for respiratory chain proteins underlies short-term beneficial physiological stress in mitochondria / M. V. Zakharchenko, A. V.

- Zakharchenko, N. V. Khunderyakova [et al.] // *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* – 2013. – Vol. 45, № 1. – P. 190–200.
322. Zhang, F. Dysregulated lipid metabolism in cancer / F. Zhang, G. Du // *World J. Biol. Chem.* – 2012. – Vol. 3, № 8. – P. 167–174.
323. Zhang, H. HIF-1 inhibits mitochondrial biogenesis and cellular respiration in VHL-deficient renal cell carcinoma by repression of C-MYC activity / H. Zhang, P. Gao, R. Fukuda [et al.] // *Cancer Cell.* – 2007. – Vol. 11, № 5. – P. 407–420.
324. Zhang, Z. High glucose inhibits glucose-6-phosphate dehydrogenase, leading to increased oxidative stress and  $\beta$ -cell apoptosis / Z. Zhang, C.W.Liew, D.E.Handy [et al.]//*FASEB J.* – 2010. V.24, №5. – P.1497–1505.
325. Zhao, Y. Effects of glutathione reductase inhibition on cellular thiol redox state and related systems / Y. Zhao, T. Seefeldt, W. Chen [et al.] // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2009. – Vol. 485, № 1. – P. 56–62.
326. Zheng, F.-J. Repressing malic enzyme 1 redirects glucose metabolism, unbalances the redox state, and attenuates migratory and invasive abilities in nasopharyngeal carcinoma cell lines / F.-J. Zheng, H.-B. Ye, M.-S. Wu, Y.-F. Lian, C.-N. Qian, Y.-X. Zeng // *Chinese Journal of Cancer.* 2012. Vol. 31. Issue 11. P. 519-531.
327. Zhou, L. Dynamic modulation of Ca<sup>2+</sup> sparks by mitochondrial oscillations in isolated guinea pig cardiomyocytes under oxidative stress / L. Zhou, M. A. Aon, T. Liu [et al.] // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2011. – Vol. 51, № 5. – P. 632–639.
328. Zhou, S. Frequency and phenotypic implications of mitochondrial DNA mutations in human squamous cell cancers of the head and neck / S. Zhou, S. Kachhap, W. Sun [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2007. – Vol. 104, № 18. – P. 7540–7545.
329. Zhu H., Luo H., Zhu X. et al. Pyruvate kinase M2 (PKM2) expression correlates with prognosis in solid cancers: a meta-analysis / H.Zhu, H.Luo, X.Zhu et al. // *Oncotarget.* – 2017. – V. 8 (1) – P. 1628-1640.