

І.В. Прохорова
Д.Л. Колесник
О.М. Пясковська
Г.І. Соляник

Інститут експериментальної
патології, онкології
і радіобіології
ім. Р.Є. Кавецького
НАН України, Київ, Україна

Ключові слова: метаболізм,
глюкоза, лактат, карцинома
легені Льюїс.

ОСОБЛИВОСТІ МЕТАБОЛІЗМУ ГЛЮКОЗИ У КЛІТИНАХ КАРЦИНОМИ ЛЕГЕНІ ЛЬЮІС З РІЗНИМ МЕТАСТАТИЧНИМ ПОТЕНЦІАЛОМ

Мета: дослідити особливості метаболізму глюкози в пухлинних клітинах двох варіантів карциноми легені Льюїс із різними метастатичним та ангіогенним потенціалами. **Об'єкт і методи:** дослідження проводили на 40 мишах-самках лінії C57Bl/6 віком 2–2,5 міс масою $19,7 \pm 1,1$ г розведення віварію Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України. Як експериментальні моделі використано два варіанти карциноми легені Льюїс, LLC та LLC/R9, які є пухлинами одного генезу, проте відрізняються біологічними властивостями: LLC/R9 порівняно з LLC характеризується вищим проліферативним, ангіогенним та нижчим метастатичним (відповідно до об'єму та кількості легеневих метастазів) потенціалами. У роботі використано методи експериментальної онкології, культури клітин, біохімічні та статистичні методи. **Результати:** виявлено, що клітини LLC/R9 характеризуються на 37,3% ($p < 0,05$) вищою швидкістю споживання глюкози та на 50,6% ($p < 0,05$) вищою швидкістю продукції лактату порівняно з відповідними показниками для клітин LLC. Встановлено, що рівень лактату та пірувату в пухлинній тканині LLC/R9 статистично достовірно нижчий від відповідних показників для LLC — на 24,0% ($p < 0,05$) та 56,0% ($p < 0,05$). Рівень глюкози в крові тварин із LLC статистично достовірно перевищує інтактний та показник у тварин з LLC/R9 — на 30,0% ($p < 0,05$) і 33,5% ($p < 0,05$), а для показника вмісту лактату спостерігається тенденція до зниження. **Висновки:** встановлено, що пухлини одного походження, проте з різними біологічними властивостями відрізняються енергетичним метаболізмом глюкози. Порівняно з LLC клітини LLC/R9 характеризуються високим рівнем споживання глюкози, що зумовлює швидкі темпи їх росту (in vivo) та низький рівень глюкози у крові тварин з LLC/R9.

Зважаючи на результати численних досліджень, можна зробити висновок, що метаболічний фенотип злоякісно трансформованої клітини є критичним аспектом біології раку. Поточні результати свідчать на користь того, що пухлинна клітина (ПК) характеризується підвищеною активністю гліколізу для продукції необхідних їй молекул аденозинтрифосфату навіть у присутності кисню. Це явище, відоме під назвою як ефект Варбурга, надає ПК привілеї до інтенсивного засвоєння глюкози й підвищеного виробництва лактату, що, у свою чергу, впливає на анаболічні процеси, такі як синтез ліпідів та нуклеїнових кислот [1]. Для компенсації власної біомаси та енергетичних потреб, які необхідні під час проліферації, ПК розвиває метаболічну пластичність. Така властивість дозволяє метастатичній ПК адаптуватися до мікросередовища як в первинному місці виникнення, так і у ділянках метастазування [2]. Тому розуміння молекулярних та клітинних особливостей, що зумовлюють метаболічну аномальність

злаякісної клітини, пухлинної та прилеглої тканин, а також утворених метастазів, має вирішальне значення щодо підвищення ефективності протипухлинної терапії та покращення якості життя хворих зі злоякісними новоутвореннями.

Для визначення характеру та параметрів взаємозв'язку між біологічними властивостями злоякісних пухлин та їх метаболічною активністю зручно використовувати експериментальні пухлинні моделі. Особливо якщо біологічні характеристики таких пухлин добре відомі. Так, два варіанти карциноми легені Льюїс, LLC та LLC/R9, є пухлинами одного генезу, проте відрізняються біологічними властивостями: LLC/R9 порівняно з LLC характеризується вищим проліферативним, ангіогенним та нижчим метастатичним (відповідно до об'єму та кількості легеневих метастазів) потенціалами [3, 4]. Крім того, як показано в роботі [5], ріст LLC/R9 і LLC супроводжується порушенням прооксидантно-антиоксидантного балансу в напрямку

домінування першого, більш вираженого у тварин із LLC. Результати дослідження продукції активних форм кисню й азоту (ROS) у клітинах LLC і LLC/R9 *in vitro* [6] показали значно вищий рівень спонтанної генерації вільнорадикальних форм кисню в клітинах LLC порівняно з LLC/R9. Не виключено, що високий рівень ROS може зумовлювати високий метастатичний потенціал клітин LLC, адже оксидативний стрес може бути пов'язаний з рівнем метастазування злоякісних пухлин [7].

Тому у зв'язку з вищенаведеним мета роботи — дослідження особливостей метаболізму глюкози в ПК двох варіантів карциноми легені Льюїс з різним метастатичним та ангіогенним потенціалами.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження виконували на мишах-самках лінії C57Bl/6 (n = 40) віком 2–2,5 міс, масою $19,7 \pm 1,1$ г розведення віварію Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології (ІЕПОР) ім. Р.Є. Кавецького НАН України. Усі дослідження на тваринах здійснювали згідно з вимогами регіонального Комітету з етики роботи з піддослідними тваринами та з додержанням правил гуманного поводження з лабораторними тваринами (Закон України «Про захист тварин від жорстокого поводження», 2006 р.).

Як експериментальні пухлинні моделі використано два варіанти карциноми легені Льюїс — LLC та LLC/R9. Лінію клітин LLC одержано з Національного банку клітинних ліній та пухлинних штамів ІЕПОР ім. Р.Є. Кавецького НАН України. LLC/R9 — модифікований варіант карциноми легені Льюїс, одержаний із вихідного штаму в результаті експериментальної пухлинної прогресії *in vivo* в напрямку формування лікарської резистентності до протипухлинного препарату цисплатину [3, 4].

ПК LLC/R9 та LLC підтримували в середовищі RPMI (Sigma, США) з додаванням 10% ембріональної сироватки теляти (Sigma, США), 2 мМ L-глутаміну та 40 мкг/мл гентаміцину за стандартних умов. Перещеплення ПК мишам проводили внутрішньом'язово у стегно задньої лапи у кількості $1,0 \cdot 10^6$ клітин в 0,1 мл розчину Хенкса.

Забій дослідних та інтактних тварин проводили на 24-ту добу росту пухлин. Розмір пухлини у кожній тварини визначали за допомогою штангенциркуля. Об'єм пухлини вираховували за формулою:

$$V = 3,14 \cdot d^3/8,$$

де V — об'єм пухлини, мм.

Підрахунок кількості метастазів та визначення їх діаметра проводили рутинним методом із використанням біокулярного мікроскопа та міліметрової шкали. Об'єм метастатичного ураження (V) легені розраховували за формулою:

$$V = \sum_i^n \pi d_i^3 / [n_i \cdot 6],$$

де n_i — кількість метастазів з діаметром d_i .

Визначення вмісту лактату та пірувату в тканині пухлини проводили ферментативним методом з використанням лактатдегідрогенази (ЛДГ) [8]. Оцінку активності ЛДГ визначали за допомогою модифікованого методу з використанням пірувату та відновленого НАДН [8].

Вміст глюкози в інкубаційному середовищі визначали ферментативним глюкозооксидантним методом за допомогою набору (Sigma, США) згідно з протоколом виробника. Рівень лактату в середовищі інкубації визначали за допомогою ферментативного методу з використанням ЛДГ (Sigma, США).

Вимірювання рівнів глюкози і лактату в плазмі крові мишей проводили на біохімічному аналізаторі Chem Well (Awareness Technology, США) з використанням стандартних наборів з визначення рівнів досліджуваних метаболітів.

Статистичну обробку отриманих даних проводили за допомогою описативних методів, кореляційного аналізу, нелінійного регресійного аналізу, t-критерію Стьюдента, U-критерію Манна — Уїтні з використанням Microsoft Excel, Microcal Origin і Statistica. Дані подано як $M \pm m$, де M — середнє значення, m — стандартне відхилення.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У проведеному дослідженні отримані результати підтверджують описані раніше [3, 4] характеристики пухлин. Як видно з таблиці, на 24-ту добу росту об'єм пухлини LLC/R9 достовірно перевищував такий для LLC (на 37,3%; $p < 0,05$), а показники кількості й об'єму метастатичного ураження в легенях відповідно були меншими майже на 78 і 72% ($p < 0,05$).

Таблиця

Показники об'єму і метастазування пухлин LLC/R9 і LLC

| Пухлина | Доба після перещеплення | Об'єм пухлини (мм ³) | Кількість метастазів | Об'єм метастазів (мм ³) |
|---------|-------------------------|----------------------------------|----------------------|-------------------------------------|
| LLC | 24-та | 794,00 ± 42,30 | 41,18 ± 4,51 | 62,89 ± 14,69 |
| LLC/R9 | 24-та | 1089,80 ± 153,20* | 9,20 ± 2,83* | 17,58 ± 7,16* |

* $p < 0,05$ порівняно з відповідним показником LLC.

Різні біологічні властивості двох варіантів карциноми легені Льюїс, які зумовили відмінність у проліферативному та метастатичному потенціалах, вочевидь, пов'язані з особливістю метаболізму ПК. На це вказують отримані *in vitro* результати дослідження обміну глюкози. Як видно з рис. 1, клітини LLC/R9 характеризувалися на 37,3% ($p < 0,05$) вищою швидкістю споживання глюкози та на 50,6% ($p < 0,05$) вищою швидкістю продукції лактату порівняно з відповідними показниками у клітинах LLC. Вважається, що підвищене поглинання глюкози зумовлено посиленням гліколізу, який можна кількісно оцінити [9, 10]. Тому можна зробити висновок, що ПК LLC/R9 характеризуються вищим рівнем гліколізу порівняно з клітинами LLC. Таким чином, значна необхідність у поживних речовинах, що

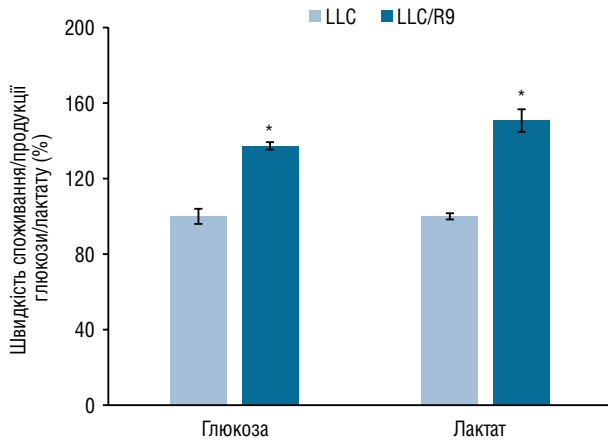


Рис. 1. Показники швидкості споживання глюкози та продукції лактату клітинами LLC/R9 у відсотках від відповідних показників клітин LLC. * $p < 0,05$ порівняно з відповідним показником для LLC

притаманна для високоангіогенного варіанта карциноми легені Льюїс, пов'язана з посиленням процесом гліколізу в клітинах і пояснює високу чутливість пухлини LLC/R9 до антиангіогенної/антиметаболічної терапії [11].

Як відомо, злаякісні клітини впливають на навколишні нетрансформовані клітини, формуючи специфічне мікросередовище, що допомагає пухлині прогресувати [12]. Ця дія зумовлена онкогенними мутаціями ПК та їх аномальним клітинним метаболізмом. З іншого боку, утворені під впливом пухлини фактори мікрооточення (такі як доступність поживних речовин, фізичні властивості позаклітинного матриксу та взаємодія зі стромальними клітинами) теж здатні впливати на властивості прогресуючої пухлини [13]. Тому метаболічний фенотип пухлини залежить від усіх клітин, включаючи й нормальні.

При дослідженні рівнів внутрішньопухлинних метаболітів у тканинах двох варіантів карциноми легені Льюїс, взятих на термінальній стадії росту, виявлено, що незважаючи на швидкий обмін речовин, який демонстрували *in vitro* клітини LLC/R9, метаболічний потенціал пухлини LLC *in vivo* виявився вищим. Так, рівні лактату та пірувату в пухлині LLC/R9 достовірно були нижчими від таких для LLC (на 24 та 56% відповідно; $p < 0,05$). При цьому активність ферменту ЛДГ для обох пухлин суттєво не відрізнялася, хоча й спостерігалася тенденція до його зниження в пухлині LLC/R9 (рис. 2).

Зазначимо, що різний метаболічний фенотип пухлин LLC та LLC/R9 корелює з різним рівнем внутрішньопухлинної гіпоксії. За допомогою показника співвідношення лактат/піруват [14] показано, що рівень гіпоксії в пухлинній тканині LLC/R9 у два рази вищий ($p < 0,01$) за такий для LLC (рис. 3).

Прийнято вважати, що гіпоксія впливає на метаболізм глюкози. Однак, як свідчать дані літератури [15], деякі гіпоксичні пухлини можуть мати незначний метаболізм глюкози, тоді як інші ви-

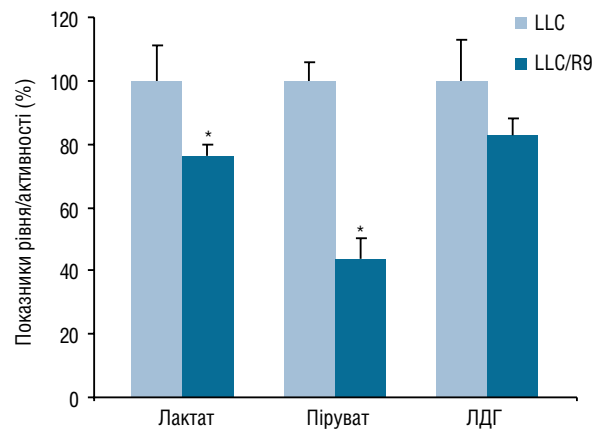


Рис. 2. Показники вмісту лактату, пірувату та активності ЛДГ в пухлинній тканині LLC/R9 у відсотках від відповідних показників пухлини LLC. * $p < 0,05$ порівняно з відповідним показником для LLC

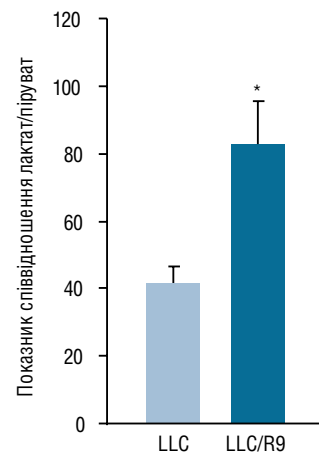


Рис. 3. Показник співвідношення лактат/піруват у тканині пухлин LLC та LLC/R9. * $p < 0,01$ порівняно з відповідним показником для LLC

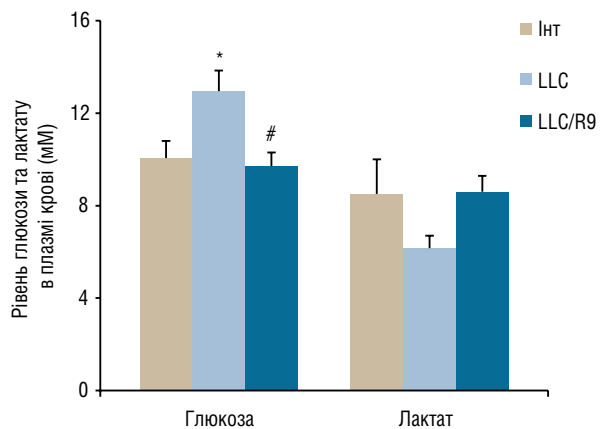


Рис. 4. Концентрація глюкози та лактату в плазмі мишей з LLC та LLC/R9. * $p < 0,05$ порівняно з інтактним контролем (Інт); # $p < 0,05$ порівняно з відповідним показником для LLC

сокометаболічні пухлини не є гіпоксичними, що демонструє розбіжну специфіку впливу гіпоксії на пухлини різного типу. У проведеному нами дослідженні видно, що низький енергетичний метабо-

лізм у пухлині LLC/R9 асоціюється з високим рівнем гіпоксії в ній. Беручи до уваги добре відомий факт, що гіпоксія стимулює процес ангиогенезу, стає зрозумілим, що високий ангиогенний потенціал пухлини LLC/R9, очевидно, сформувався у відповідь на високий рівень гіпоксії в ній.

На сьогодні у ряді робіт показано, що для своїх енергетичних потреб ПК використовують активніше лактат із крові, ніж глюкозу. Загалом молочну кислоту розглядають практично як єдину метаболічну сполуку, що бере участь у всіх необхідних процесах канцерогенезу: ангиогенезі, імунній втечі, міграції клітин, метастазуванні та самоконтрольованому метаболізмі ПК [16]. Тому деякі дослідники встановили асоціативний зв'язок між рівнем лактату в крові та прогнозом розвитку деяких видів раку [17]. Проте зрозуміло, що таке твердження потребує більш конкретної доказової бази.

Результати проведених досліджень свідчать, що вміст глюкози та лактату в крові тварин з LLC/R9 перебуває на рівні інтактного контролю. При цьому рівень глюкози в плазмі крові тварин із високометастатичним варіантом карциноми легені Льюїс достовірно ($p < 0,05$) перевищував показник інтактних тварин і тварин з LLC/R9 (майже на 30,0 і 33,5% відповідно), а для показника вмісту лактату спостерігалася тенденція до зниження (рис. 4).

Варто звернути увагу, що в пухлинній тканині LLC в ці терміни спостерігається підвищення вмісту лактату, не виключено, що за рахунок активного залучення його із крові. Зважаючи на це, можна зробити висновок про наявність асоціації між кінетикою росту первинної пухлини та/чи її метастатичним потенціалом і показниками рівнів глюкози і лактату в крові мишей-пухлиноносіїв. Проте для деталізації висновку необхідно провести додаткові дослідження в цьому напрямку.

ВИСНОВКИ

1. У дослідженнях *in vitro* показано, що пухлинні клітини LLC/R9 порівняно з LLC характеризуються високим метаболізмом глюкози, що проявляється як у вищій швидкості продукції лактату, так і вищому рівні споживання глюкози.

2. Високий рівень метаболізму глюкози в клітинах LLC/R9 зумовлює високу швидкість їх росту *in vivo* та низький рівень глюкози в крові тварин з LLC/R9.

3. Низький рівень пірувату та лактату в пухлинах LLC/R9 (порівняно з LLC) свідчить про можливість інтенсифікацію окисного фосфорилування в цих клітинах із залученням лактату як енергетичного субстрату.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Liberti MV, Locasale JW. The warburg effect: how does it benefit cancer cells? Trends Biochem Sci 2016; **41** (3): 211–18.
2. Gouirand V, Guillaumond F, Vasseur S. Influence of the tumor microenvironment on cancer cells metabolic reprogramming. Front Oncol 2018; **8**: doi: 10.3389/fonc.2018.00117.

3. Solyanik GI, Pyaskovskaya ON, Garmanchuk LV. Cisplatin-resistant Lewis lung carcinoma cells possess increased level of VEGF secretion. Exp Oncol 2003; **4**: 260–5.

4. Pyaskovskaya ON, Dasyukevich OI, Kolesnik DL, et al. Changes in VEGF level and tumor growth characteristics during Lewis lung carcinoma progression towards cis-DDP resistance. Exp Oncol 2007; **29** (3): 197–202.

5. Sorokina LV, Boichuk IV, Melnikov OR, et al. Peculiarities of the antioxidant system of blood plasma in mice with highly angiogenic Lewis lung carcinoma. Rep NASU 2012; **1**: 174–9 (in Ukrainian).

6. Pyaskovskaya ON, Sorokina LV, Kolesnik DL, et al. Dynamics of changes of antioxidant system indexes during the growth of two Lewis lung carcinoma variants. Exp Oncol 2012; **36** (1): 29–33.

7. Kumari S, Badana AK, G MM, et al. Reactive oxygen species: a key constituent in cancer survival. Biomark Insights 2018; **13**: 1177271918755391.

8. Rezyapkin VI, Slyshenkov VS, Breeder IB, et al. Laboratory practice in biochemistry and biophysics. Grodno: GrSU, 2009. 175 p (in Russian).

9. Stokkel MP, Broek FW, van Rijk PP. The role of FDG PET in the clinical management of head and neck cancer. Oral Oncol 1998; **34**: 466–71.

10. Visser FC. Imaging of cardiac metabolism using radio-labelled glucose, fatty acids and acetate. Coron Artery Dis 2001; **12** (1): 12–8.

11. Kolesnik DL, Pyaskovskaya ON, Dasyukevich OI, et al. Significant antimetastatic efficacy of metronomic low-dose oral cyclophosphamide against highly angiogenic variant of Lewis lung carcinoma/International conference «Tumor and host: Novel aspects of old problem», Kiev, 21–24 September, 2010. Exp Oncol 2011; **33** (1): 94.

12. Wegiel B, Vuerich M, Daneshmandi S, et al. Metabolic switch in the tumor microenvironment determines immune responses to anti-cancer therapy. Front Oncol 2018; **8**: 284.

13. Muir A, Danai LV, G M. et al. Microenvironmental regulation of cancer cell metabolism: implications for experimental design and translational studies. Dis Model Mech 2018; **11** (8): dmm035758.

14. Rimachi R, Bruzzi de Carvahlo F, Orellano-Jimenez C, et al. Lactate/pyruvate ratio as a marker of tissue hypoxia in circulatory and septic shock. Anaesth Intensive Care 2012; **40** (3): 427–32.

15. Rajendran JG, Mankoff DA, O'Sullivan F, et al. Hypoxia and glucose metabolism in malignant tumors: evaluation by [18f] fluoromisonidazole and [18f] fluorodeoxyglucose positron emission tomography imaging. Clin Cancer Res 2004; **10**: 2245–52.

16. San-Millán I, Brooks GA. Reexamining cancer metabolism: lactate production for carcinogenesis could be the purpose and explanation of the Warburg Effect. Carcinogenesis 2017; **38** (2): 119–33.

17. Wu Yo, Dong Yu, Atefi M, et al. Lactate, a neglected factor for diabetes and cancer interaction. Mediators Inflamm 2016; 6456018.

PECULIARITIES OF GLUCOSE METABOLISM IN LEWIS LUNG CARCINOMA CELLS WITH DIFFERENT METASTATIC POTENTIAL

I.V. Prokhorova, D.L. Kolesnik,
O.N. Pyaskovskaya, G.I. Solyanik

R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology,
Oncology and Radiobiology, NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

Summary. Aim: to study the peculiarities of glucose metabolism in tumor cells of two variants of Lewis lung carcinoma with different metastatic and angiogenic poten-

*tials. **Object and methods:** in vitro study was carried out using cultured LLC and LLC/R9 cell lines, and in vivo on C57/BL6 female mice. There were a total of 40 animals used. It is known that two variants of Lewis lung carcinoma, LLC and LLC/R9, are tumors of the same genesis, but have different biological properties: LLC/R9 in comparison with LLC is characterized by higher proliferative, angiogenic and lower metastatic (according to the volume and number of pulmonary metastases) potentials. Methods of experimental oncology, cell culture, biochemical and statistical methods have been used. **Results:** it was revealed that LLC/R9 cells characterized by 37.3% ($p < 0.05$) higher rate of glucose consumption and in 50.6% ($p < 0.05$) higher lactate production rate in comparison with corresponding high-metastatic variant of Lewis lung carcinoma cells. The lactate and pyruvate levels in the tumor tissue of high-angiogenic variant of Lewis lung carcinoma were found to be significantly lower than the respective rates for the high-metastatic variant by 24.0% ($p < 0.05$) and 56.0% ($p < 0.05$).*

*It was shown that blood glucose level in LLC-bearing animals exceeded intact and LLC/R9 index by 30.0% ($p < 0.05$) and 33.5% ($p < 0.05$), respectively, and the rate of lactate tended to decrease. **Conclusions:** it was found that glucose metabolism of LLC cells considerably differ from that of LLC/R9 cells. As compared to LLC, LLC/R9 cells are characterized by high levels of glucose consumption, which results in their rapid in vivo growth and low blood glucose level in LLC/R9-bearing mice.*

Key Words: metabolism, glucose, lactate, Lewis lung carcinoma.

Адреса для листування:

Прохорова І.В.
03022, Київ, вул. Васильківська, 45
Інститут експериментальної патології,
онкології і радіобіології
ім. Р.Є. Кавецького НАН України
E-mail: oncom@online.ua

Одержано 12.11.19