

## ОСОБЕННОСТИ МЕТАБОЛИЗМА ЭПИТЕЛИАЛЬНОЙ ОПУХОЛИ ПРИ ЕЁ МЕЗЕНХИМАЛЬНОМ ПЕРЕХОДЕ

Бакурова Е.М.

Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького  
пр. Ильича, 16, г. Донецк, 283003, ДНР; e-mail: 32023@mail.ru,

Поступила в редакцию 30.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0568

**Аннотация.** Эпителиальные опухоли различных локализаций способны продуцировать активные формы кислорода, стимулирующие их эпителиально-мезенхимальную трансформацию. Для опухолей немелкоклеточного рака легких (НМКРЛ), аденокарцином желудка и кишечника (АКЖК) установлена их метаболическая неоднородность. По результатам анализа в морфологически однородных опухолях одной локализации выделены кластеры, характеризовавшиеся повышением активности ксантиноксидазы, супероксиддисмутазы, снижением активности глутатионпероксидазы (для неё установлена отрицательная связь с патологией ( $\rho = -0,465$ ,  $p < 0,05$ )). Так, во втором кластере АКЖК активность глутатионпероксидазы была минимальной, ниже в 1,4 раза, а в их первом кластере ниже в 1,8 раза, чем в опухолях НМКРЛ соответствующих кластеров. Во втором кластере НМКРЛ она была в 1,5 раза ниже, чем в их первом. На этом фоне активность супероксиддисмутазы в опухолях различных локализаций, вошедших во вторые кластеры, наоборот, нарастала, соответственно в 2 раза при НМКРЛ, в 1,7 раза при АКЖК. Это ведет повышению продукции пероксида водорода в опухоли. Выявленное при этом повышение активности аденозиндезаминазы (установлена положительная сильная связь (ранговый коэффициент корреляции Спирмена  $\rho = 0,805$ ,  $p < 0,01$ ) может сопровождаться снижением уровней аденозина и его регуляторных эффектов, препятствующих развитию агрессивных свойств опухоли. Следовательно, в аденокарциномах желудка и кишечника, опухолях немелкоклеточного рака легких выявлена возможность метаболического стимулирования эпителиально-мезенхимальной трансформации опухоли.

**Ключевые слова:** ферменты, активные формы кислорода, эпителиальные опухоли.

### ВВЕДЕНИЕ

К перспективным современным направлениям в лечении рака относят индивидуальную таргетную терапию сигнальных путей, реализующих опухолевую прогрессию [1]. Рост эпителиальной опухоли активирует ряд онкогенов, контролирующих ангиогенез, резистентность к апоптозу, формирование цитоскелета и межклеточных контактов; продукцию мезенхимальных белков, обеспечивающих подвижность и инвазию. Вместе с тем, эти агрессивные свойства ведут к так называемому эпителиально-мезенхимальному переходу или трансформации опухоли (ЭМТ) [2]. Состоявшийся мезенхимальный переход сопровождается развитием химио- и радиорезистентности, инвазией и метастазированием. В реализацию ЭМТ вовлечены сигнальные пути, стимулируемые активными формами кислорода (АФК), в частности, супероксидным анион-радикалом ( $O_2^{\cdot-}$ ) и пероксидом водорода ( $H_2O_2$ ). Например, это JAK2-STAT1 путь, отвечающий за развитие подвижности опухолевых клеток [1]. Согласно Kumagi S. и соавт., подавление продукции АФК может способствовать гибели трансформированных клеток или стволовых опухолевых клеток, опосредующих агрессивные свойства [3].

Учитывая вовлеченность АФК в канцерогенез, т.ч. развитие ЭМТ, актуально исследование особенностей их продукции в опухолях эпителиального генеза. Известно, что клеточные уровни  $O_2^{\cdot-}$  и  $H_2O_2$  во многом зависят от активности ксантиноксидазы, завершающей клеточный катаболизм пуринов. Эта флавиносодержащая оксидоредуктаза может реализовывать окисление гипоксантина и ксантина до мочевой кислоты, что сопровождается образованием  $O_2^{\cdot-}$ , а затем пероксида водорода  $H_2O_2$ . Уровни этих АФК также зависят от активности ферментов антиоксидантов. Среди последних важную роль играют супероксиддисмутаза (СОД), продуцирующая  $H_2O_2$  при обезвреживании  $O_2^{\cdot-}$ , а также обезвреживающая  $H_2O_2$  глутатионпероксидаза (ГПО). Так, связь СОД с продукцией пероксида водорода позволила W. Li и соавт. считать, что фермент непосредственно участвует в развитии ЭМТ [4].

Цель исследования: определить особенности тканевой активности ферментов катаболизма пуринов и антиоксидантной системы в эпителиальных опухолях различной локализации.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выполнено сравнительное изучение особенностей активности ферментов в гомогенатах эпителиальных опухолей различной локализации. Среди них 25 образцов немелкоклеточного рака легких (НМКРЛ) и 22 случая аденокарцином желудка и кишечника (АКЖК). По уровню инвазии опухоли соответствовали T<sub>2</sub>N<sub>0-х</sub>M<sub>0</sub> и T<sub>3</sub>N<sub>0-х</sub>M<sub>0</sub> стадиям. Особенности метаболизма опухоли в каждом случае исследовали в сопоставлении с индивидуальным контролем - визуально нетрансформированными тканями края резекции, удаленными от неё не менее, чем на 1 см.

Активность аденозиндезаминазы исследовали спектрофотометрически по снижению оптической плотности аденозина при 265 нм, активность ксантиноксидазы - по повышению продукции мочевой кислоты, регистрировавшейся при 283 нм на фиолетовом светофильтре [5,6]. Активность СОД определяли по торможению самопроизвольного окисления адреналина в щелочной среде [5]. За 1 условную единицу активности СОД принимали активность, замедлявшую его самоокисление в 2 раза. Активность глутатионпероксидазы (ГПО) оценивали по изменению содержания восстановленного глутатиона, определяя его конъюгаты с 2-нитро-5-тиобензоатом [5].

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с использованием специализированной для биологических исследований программы «MedStat» (Альфа) и программы «Statistica 5.5» (StatSoft). Данные, не подчинявшиеся закону нормального распределения, представлены в виде медианного значения данных (Me) и интервала между 25-м и 75-м процентилями (первый и третий квартили ( $Q_1$ ;  $Q_3$ )). Различия между тремя и более группами устанавливали с помощью критерия множественных сравнений Краскела-Уоллиса. Для сравнения двух независимых выборок использовали U-критерий Манна-Уитни. Корреляционную взаимосвязь между признаками анализировали, рассчитывая ранговый коэффициент корреляции Спирмена.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что помимо  $O_2^{\cdot -}$  и  $H_2O_2$ , аденозин также является сигнальной молекулой. В частности, он влияет на активность «запасных путей» синтеза нуклеотидов, активация которых сопряжена с интенсивностью клеточной пролиферации. Также описаны его антиапоптозные эффекты, он стимулирует синтез белков антиоксидантной системы, препятствует опухолевой прогрессии, метастазированию [6]. Аденозиндезаминаза (АДА) контролирует клеточные уровни аденозина, запуская его деградацию до мочевой кислоты. При исследовании выявлено повышение опухолевой активности АДА. В образцах НМКРЛ её медианные значения 202,30 (первый и третий квартили ( $Q_1$ ;  $Q_3$ ): 181,14; 231,12 нмоль/мин·мг). В контрольных нетрансформированных тканях краев резекции, соответственно, 122,30 (103,22; 149,11) нмоль/мин·мг. В образцах АКЖК 234,40 (164,63; 276,22); в контрольных образцах: 125,60 (107,44; 139,52) нмоль/мин·мг. В гомогенатах НМКРЛ она превышала активность в контроле в 1,7 раза ( $p = 0,001$ ), а в опухолях желудка и кишечника еще значительно – в 1,9 раза ( $p = 0,001$ ). Повышение опухолевой активности АДА может быть универсальным свойством карцином исследуемых локализаций, согласно рисунку 1.

В отличие от активности АДА изменения активности ксантиноксидазы в гомогенатах опухолей менялись не однонаправленно. Действительно, в большинстве случаев НМКРЛ (18 из 25, 72%), и в АКЖК (17 из 22, 77%) установлено повышение активности КСО по сравнению с нетрансформированными тканями, соответственно в 2,2 раза ( $p = 0,01$ ) и в 1,9 раза ( $p = 0,001$ ). Поскольку  $O_2^{\cdot -}$ , трансформирующийся затем в  $H_2O_2$  – продукты её реакции, можем предположить эквивалентное нарастание их уровней на фоне повышения активности КСО. В тоже время, в ряде случаев, в образцах опухолей изучаемых локализаций достоверных различий между активностью КСО в опухоли по сравнению с индивидуальным контролем не выявлено. На первый взгляд, это противоречит установленному повышению активности АДА. В тоже время, известно об активации «запасных путей синтеза» нуклеотидов и пролиферации при опухолевом росте. Следовательно, можем предположить активное потребление продукта реакции, катализируемой АДА, в «запасных путях» ресинтеза нуклеотидов.

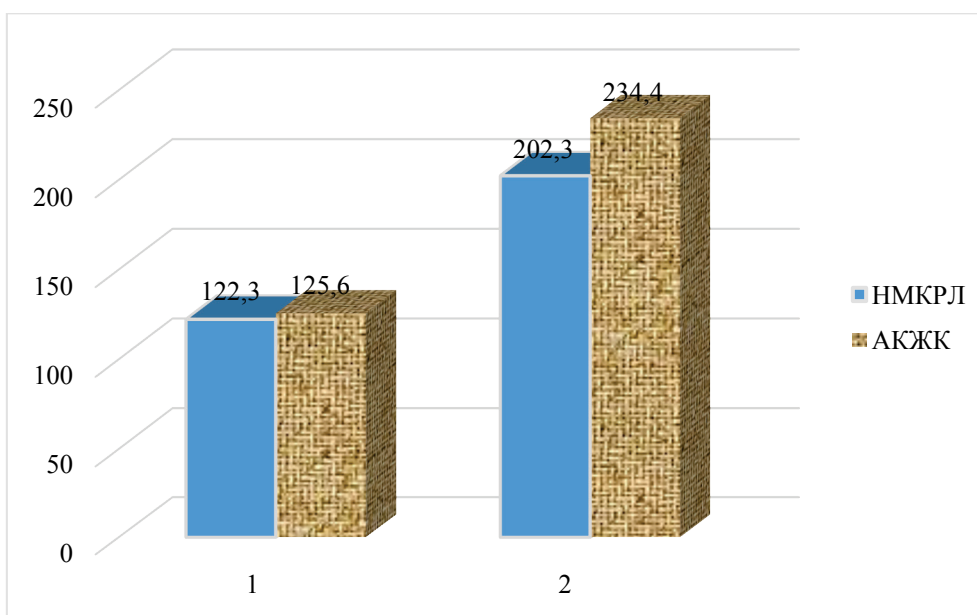


Рисунок 1. Медианные значения активности аденозиндезаминазы в нетрансформированных тканях (1) и в опухолях (2); нмоль/мин·мг

В исследуемых образцах НМКРЛ и АКЖК опухолевая активность ферментов антиоксидантной системы (АОС) или не отличалась достоверно от контроля (СОД), или снижалась (ГПО). При статистической обработке результатов выявлена корреляция ферментативной активности с патологией. Для АДА установлена положительная сильная связь (ранговый коэффициент корреляции Спирмена  $\rho = 0,805$ ,  $p < 0,01$ ) для активности ГПО связь с патологией отрицательная ( $\rho = -0,465$ ,  $p < 0,05$ ). В опухолях НМКРЛ медианные значения ГПО составляли 2,92 ( $Q_1$ ;  $Q_3$ ), соответственно: 1,91; 4,20 нмоль/мин·мг). Это было достоверно ниже, чем в нетрансформированной контрольной ткани (3,40 (2,30; 5,10) нмоль/мин·мг;  $p < 0,05$ ). В АКЖК опухолевая активность фермента составила: 1,61 (1,10; 2,11) нмоль/мин·мг; в контроле: 2,19 (1,63; 3,15) нмоль/мин·мг. Причем опухолевая активность ГПО в АКЖК была ниже, чем в образцах НМКРЛ ( $p = 0,002$ ). Согласно критериям множественных сравнений Краскела–Уоллиса (H) и медианного теста ( $\chi^2$ ) выявили, что активность ГПО органоспецифична и связана с локализацией опухоли:  $H = 9,31$  ( $p = 0,003$ ),  $\chi^2 = 9,09$  ( $p = 0,002$ ). Для других ферментов связь особенности активности с локализацией опухоли не выявлена.

Кластерный анализ абсолютных значений активности ферментов АОС выявил их неоднородность. Опухоли одной локализации статистически распределялись в 2 кластера как при НМКРЛ, так и при АКЖК; данные приведены в таблице 1.

Для дальнейшей обработки данных были выбраны кластеры активности СОД, данные по другим ферментам соответствовали каждому индивидуальному образцу, отнесенному в определенный кластер по активности СОД. Так, из 25 опухолей НМКРЛ 11 статистически были отнесены во второй кластер, из 22 образцов АКЖК во второй кластер вошли 10 аденокарцином.

Установили, что во 2-х кластерах как при НМКРЛ, так и в АКЖК на фоне повышения активности СОД, активность ГПО, наоборот, была низкой и не только в опухоли, но и в нетрансформированных тканях края резекции. Так, во 2-м кластере АКЖК на фоне максимальной активности СОД ( $p = 0,009$ ), активность ГПО была минимальной ( $U = 14,00$ ,  $Z = -3,05$ ,  $p = 0,002$  по сравнению с 1-м кластером и кластерами НМКРЛ). Установленные разнонаправленные изменения активности СОД и ГПО ведут к повышению уровня  $H_2O_2$ . Эти ферментативные особенности были более выражены во 2-х кластерах НМКРЛ и АКЖК.

Активность АДА, согласно кластерам, в опухолях НМКРЛ: 1-й кластер 192,48 (153,45; 207,69), 2-й кластер 223,19 (199,11; 287,39) нмоль/мин·мг. Соответственно, для АКЖК: 1-й кластер 203,68 (133,88; 267,91), 2-й кластер 237,17 (167,36; 335,33) нмоль/мин·мг. Опухолевая активность фермента, оставаясь выше контрольных значений в каждом кластере, имела тенденцию к повышению во вторых кластерах для каждой локализации. Эта тенденция выявлена и для КСО.

Таким образом, в образцах эпителиального рака различных локализаций выявлена метаболическая неоднородность по активности ферментов катаболизма пуринов и АОС среди опухолей одного морфологического типа. В частности, для кластеров с повышенной активностью СОД было характерно снижение активности ГПО и повышение опухолевой активности АДА и КСО. Выявленные особенности ферментативной активности способствуют продукции таких АФК, как  $O_2^-$  и  $H_2O_2$ . Это создает условия для стимулирования данными АФК их сигнальных путей. Как уже отмечалось,  $H_2O_2$  активирует ряд чувствительных онкогенов, способствующих опухолевой прогрессии, реализации ЭМТ, метастазированию [4,7]. Так, пероксид водорода, угнетая экспрессию Е-кадгерина, отвечающего за межклеточные контакты, стимулирует экспрессию мезенхимальных маркеров – виментина,  $\alpha$ -актина гладких мышц. Клетки опухоли приобретают подвижность. Стимулирующие эффекты  $H_2O_2$  на экспрессию матриксных металлопротеиназ также способствуют инвазии и метастазированию. Экспрессируя мезенхимальные маркеры, и снижая, или даже теряя способность экспрессировать эпителиальные маркеры, опухоли реализуют ЭМТ. Возможно, формированию агрессивных свойств опухоли также способствует снижение уровней аденозина на фоне повышения активности АДА.

Действительно, при проводившемся параллельно морфологическом исследовании именно в образцах опухолей, вошедших во вторые кластеры, регистрировали развитие ЭМТ [8]. Согласно данным, опубликованным ранее, её регистрировали в 100 % опухолей НМКРЛ и 80 % АКЖК, составлявших вторые кластеры. В этих образцах наблюдалось снижение пролиферативной активности, усиление ангиогенеза, признаки инвазии.

**Таблица 1.** Активность ферментов АОС в опухолях различной локализации, нмоль/мин·мг; (Me; ( $Q_1$ ;  $Q_3$ ))

Фермент кластер	СОД		ГПО	
	1-й кластер	2-й кластер	1-й кластер	2-й кластер
НМКРЛ (n = 25)	<b>0,69</b> (0,55; 0,75) */ 0,80 (0,74; 0,98)	<b>1,38</b> (1,20; 1,46)/ 1,14 (1,01; 1,38)	<b>3,30</b> (2,11; 4,00) */ 5,12 (2,61; 5,91)	<b>2,16</b> (1,45; 4,22)/ 3,03(1,80; 4,00)
АКЖК (n = 22)	<b>1,00</b> (0,63; 1,13) */ 1,08 (0,75; 1,33)	<b>1,72</b> (1,33; 2,26) */ 1,41 (0,96; 1,57)	<b>1,88</b> (1,03; 2,23)/ 2,22 (1,40; 3,04)	<b>1,52</b> (1,11; 2,00)/ 2,23 (1,96; 2,99)

Примечание: /курсив - данные по контролю; \* -  $p < 0,05$  по сравнению с контролем

Последние были обусловлены появлением двигательной активности трансформированных опухолевых клеток, что подтверждалось экспрессией в них  $\alpha$ -актина гладких мышц. Эти клетки экспрессировали и другие мезенхимальные маркеры. В сосудах наблюдались эмболы опухолевых клеток, что указывало на возможность метастазирования.

Следовательно, среди опухолей одной локализации и морфологии была выявлена их метаболическая неоднородность, характеризующаяся повышением продукции  $H_2O_2$ , а также снижением уровней аденозина. Предполагаем, это может способствовать активации сигнальных путей, реализующих программы ЭМТ.

#### Список литературы / References:

1. Liu J., Qu L., Meng L., Shou C. Topoisomerase Inhibitors Promote Cancer Cell Motility via ROS-Mediated Activation of JAK2-STAT1-CXCL1 Pathway. *J. Exp. Clin Cancer Res*, 2019, vol. 38, no. 1, pp. 370-375, doi: 10.1186/s13046-019-1353-2.
2. Vasilenko I.V., Kondratyuk R.B., Grekov I.S., Yarkov A.M. Epithelial-mesenchymal transition in main types of gastric carcinoma. *Clin. Exp Morphol*, 2021, vol. 10, no. 2, pp. 13-20, doi: 10.31088/CEM2021.10.2.13-20.
3. Kumari S., Badana A.K., G M.M., Shailender G., Malla R.R. Reactive oxygen species: a key constituent in cancer survival. *Biomark Insights*, 2018, vol. 13, pp. 1-9, doi: 10.1177/1177271918755391.
4. Li W., Cao L., Han L., Xu Q., Ma Q. Superoxide dismutase promotes the epithelial-mesenchymal transition of pancreatic cancer cells via activation of the  $H_2O_2$ /ERK/NF- $\kappa$ B axis. *Int J Oncol*, 2015, vol. 46, no. 6, pp. 2613-2620, doi: 10.3892/ijo.2015.2938.
5. Бакурова Е.М. Особенности энергетического метаболома эритроцитов у больных раком распространенных стадий. *Актуальные вопросы биологической физики и химии. БФФХ-2016: материалы XI международной научн-технич. конференции*, г. Севастополь, 25-29 апреля 2016 г.: в 2 т. 2, Севастополь: Севастопольский государственный университет, 2016, 226 с. [Bakurova E.M. The Energy Metabolom of Red Blood Cells Features in Patients with Advanced Tumors. *Modern Trends in Biological Physics and Chemistry. BPPC-2016: Proceedings of XI International Science-Technical Conference*, Sevastopol, 25-29 of April, 2016, vol. 2, Sevastopol: Sevastopol State University, 2016, 226 p. (In Russ.)]
6. Зуйков С.А., Бакурова Е.М., Турсунова Ю.Д., Хомутов Е.В. Повышение активности ферментов катаболизма пуринов как один из факторов патогенеза злокачественных новообразований. *«Новообразование» (Neoplasm)*, 2021, т. 13, № 2 (33), с. 86-90. [Zuikov S.A., Bakurova E.M., Tursunova Y.D., Khomutov E.V. Increasing the activity of purine catabolism enzymes as one of the pathogenesis factors of malignant neoplasms. *Neoplasm*, 2021, vol. 13, no. 2 (33), pp. 86-90. (In Russ.)]
7. Zeng J., Li M., Xu J.-Y., Xiao H., Yang X., Fan J.-X., Wu K., Chen Sh. Aberrant ROS mediate cell cycle and motility in colorectal cancer cells through an oncogenic CXCL14 signaling pathway. *Front Pharmacol*, 2021, no. 12, doi: 10.3389/fphar.2021.764015.
8. Бакурова Е.М., Василенко И.В., Турсунова Ю.Д., Добаева Н.М., Борзенко Б.Г., Ельский В.Н. Особенности активности ферментов обмена нуклеозидов и антиоксидантной системы в солидных опухолях. *Российский биотерапевтический журнал*, 2022, т. 21, № 2, с. 73-81. [Bakurova E.M., Vasilenko I.V., Tursunova Yu.D., Dobaeva N.M., Borzenko B.G., Yelsky V.N. The features of enzymes activity to nucleoside and antioxidant systems in solid tumors. *Russian Journal of Biotherapy*, 2022, vol. 21, no. 2, pp. 73-81, doi: 10.17650/1726-9784-2022-21-2-73-81. (In Russ.)]

#### THE EPITHELIAL TUMOR METABOLISM FEATURES DURING ITS MESENCHYMAL TRANSITION

Bakurova E.M.

Maksim Gorky National Medical University,  
pr. Il'icha, 16, Donetsk, 283003, DPR; e-mail: 32023@mail.ru  
Received 30.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbp.2022.0568

**Abstract.** The epithelial tumors of various localizations are capable of producing reactive oxygen species that stimulate their epithelial-mesenchymal transformation. For tumors of non-small cell lung cancer (NSCLC), gastric and intestinal adenocarcinomas (GIAC) their metabolic heterogeneity was established. By the results of analysis in morphologically homogeneous tumors of the same localization we detected clusters of tumors characterized by increased activity of xanthine oxidase, superoxide dismutase, decreased activity of glutathione peroxidase (negative relation with pathology ( $\rho = -0,465$ ,  $p < 0,05$ )). Thus, glutathione peroxidase activity was minimal in the second GIAC cluster, 1.4-fold lower, and 1.8-fold lower in their first cluster than in NSCLC tumors of the corresponding clusters. In the second NSCLC cluster, it was 1.5-fold lower than in their first cluster. Against this background, superoxide dismutase activity in tumors of different localizations included in the second clusters, on the contrary, increased 2-fold in NSCLC and 1.7-fold in GIAC, respectively. It leads to increased production of hydrogen peroxide in the tumor. Increase of adenosine deaminase activity detected (positive strong correlation (Spearman rank correlation coefficient  $\rho = 0,805$ ,  $p < 0.01$ )) may be accompanied by a decrease of adenosine levels and its regulatory effects preventing tumor aggressive properties. Correlation of enzymatic activity with pathology was established. In different localization tumors the possibility of metabolic stimulation of tumor epithelial-mesenchymal transformation was revealed.

**Key words:** enzymes, reactive oxygen species, epithelial tumors.