

## Оценка гликолиза и окислительного метаболизма в злокачественных клетках

Анализ в режиме реального времени позволяет исследователям установить связь между путями метаболизма и онкогенными фенотипами

### ОБЛАСТЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Злокачественное новообразование

Физиология клеток

### ТИП АНАЛИЗА

Потребление энергии: одновременное измерение гликолиза и митохондриального дыхания

### КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА

Гликолиз, митохондрии, дыхание, злокачественное новообразование, OXPHOS

Оценка путей метаболизма злокачественных клеток и их взаимозависимого или компенсаторного взаимодействия играет важную роль для понимания механизмов трансформации и злокачественного роста, устойчивости опухоли к лекарственной терапии и для создания потенциальных относительно специфических для злокачественных клеток лекарственных средств.

В то время как нормальные клетки вырабатывают АТФ и биосинтетические предшественники путем сочетания окислительного и гликолитического метаболизма, злокачественные клетки существенно изменяют свой метаболизм для обеспечения быстрого, инвазивного и метастатического роста. Данное изменение метаболизма происходит в результате активации онкогенов или утраты генов-супрессоров опухоли в многочисленных сигнальных путях и дает конкурентные преимущества измененным клеткам.<sup>1</sup>

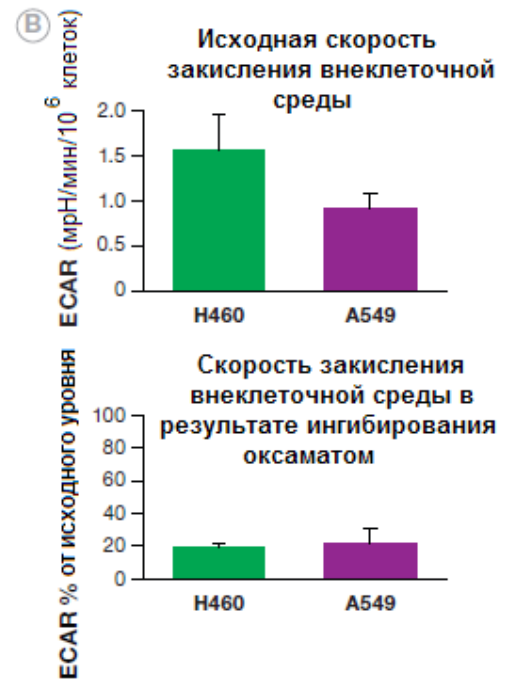
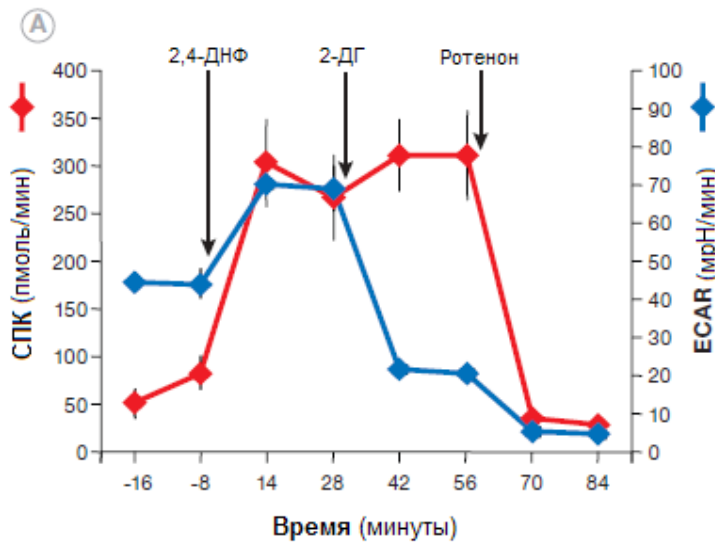
В клетках с гликолитическим фенотипом отмечается значительно более высокий уровень образования протонов (скорость закисления внеклеточной среды), чем в клетках, использующих окислительное фосфорилирование (скорость потребления кислорода). Изменения утилизации и метаболизма субстрата, характерные для злокачественных клеток, можно определить удобно и одновременно посредством оценки скорости потребления кислорода (СПК) для количественного анализа митохондриального дыхания и скорости закисления внеклеточной среды (ECAR, extracellular acidification rate), показателя гликолиза. Подобные измерения могут характеризовать метаболическое программирование отдельных типов злокачественных клеток, их стадию трансформации и прогнозировать их метастатический потенциал.

Wu с соавт. утвердил СПК и ECAR в качестве индикаторов клеточного дыхания и гликолиза соответственно путем измерения их ответов на три точно определенных модулятора митохондриального дыхания и гликолиза в линии клеток злокачественной опухоли человека A549. 2,4-ДНФ разобщает дыхание и синтез АТФ, стимулируя одновременно дыхание и гликолиз. 2-ДГ ингибирует гексокиназу, первый фермент, необходимый для гликолиза, главным образом, подавляя гликолиз. Ротенон ингибирует митохондриальную НАДФ-дегидрогеназу/комплекс I, главным образом, подавляя митохондриальное дыхание. СПК активировалась 2,4-ДНФ и подавлялась ротеноном.

**Рисунок 1 | Валидация СПК и ECAR в качестве показателей клеточного дыхания и гликолиза**

**А.** В клетки A549 последовательно вводили митохондриальный разобщающий агент, 2,4-ДНФ, ингибитор гликолиза 2-ДГ и ингибитор митохондриального комплекса 1 ротенон. СПК активировалась 2,4-ДНФ и подавлялась ротеноном, в то время как ECAR активировалась 2,4-ДНФ и подавлялась 2-ДГ, что подтверждает использование СПК и ECAR в качестве индикаторов клеточного дыхания и гликолиза соответственно.

**В.** Влияние гликолиза на общую скорость закисления внеклеточной среды в клетках H460 и A549 определяли с помощью оксамата. После воздействия оксамата ECAR в клетках обоих типов снижалась до 20% от соответствующих исходных значений.



ECAR активировалась 2,4-ДНФ и подавлялась 2-ДГ. Это показывает, что СПК преимущественно отражает скорость митохондриального дыхания, а ECAR – скорость гликолиза (рисунок 1а).

Мы с соавт.<sup>2</sup> также определяли относительный вклад гликолиза в отношении общей скорости закисления внеклеточной среды в клетках H460 и A549 с оксаматом, ингибитором гликолиза, который действует путем ингибирования лактатдегидрогеназы, чтобы предотвратить превращение пирувата в лактат. Чувствительная к оксамату ECAR отражает скорость гликолиза, а нечувствительная к оксамату ECAR развивается в результате негликолитического закисления, главным образом, за счет углекислого газа.

После воздействия оксамата ECAR обоих клеточных типов снизилась до 20% от их соответствующих исходных значений, указывая на то, что на долю гликолиза приходилось примерно 80% от общей ECAR. ECAR в клетках H460 была значительно выше, чем в клетках A549, что свидетельствует о том, что первые являются более гликолитическими, чем вторые. Известно, что обе линии клеток метастазировали в моделях животных (рисунок 1b).

Таким образом, возможность одновременного измерения митохондриального дыхания и гликолиза в режиме реального времени позволяет определять реакцию данных двух путей на потребление АТФ и опосредованно биосинтетические потребности. В случае злокачественного новообразования становится понятно, что оно неразрывно связано с изменениями в метаболическом программировании.

## Обсуждение

Анализатор XF позволяет оценить параметры гликолиза и митохондриального дыхания без необходимости последовательного отбора проб и спектрофотометрических измерений молочной кислоты.

Wu с соавт.<sup>2</sup> представил профиль метаболического фенотипа двух клеточных линий человека H460 и A549. Было показано, что клетки H460 обладают большей гликолитичностью, чем клетки A549. Содержание АТФ в клетках обоих типов не изменялось под воздействием ротенона (данные не указаны), что свидетельствует о том, что гликолитический синтез АТФ может поддерживать энергетический баланс клетки.

Однако содержание АТФ в клетках H460 и A549 обладало различной чувствительностью к 2,4-ДНФ. Внутриклеточное содержание АТФ в клетках A549 снижалось на 40% в присутствии 2,4-ДНФ по сравнению с необработанным контрольным образцом, в то время как содержание АТФ в клетках H460 существенно не менялось.

Delgado и соавт.<sup>3</sup> использовали анализатор XF для демонстрации того, что вирус герпеса, связанный с саркомой Капоши (KSHV) (возбудитель саркомы Капоши) приводит к повышению ECAR и снижению СПК в инфицированных клетках. Они пришли к выводу, что эффект Варбурга необходим для поддержания KSHV в латентном состоянии и приспособлению инфицированных клеток к микроокружению опухоли, позволяя проводить посев злокачественных клеток саркомы Капоши.

DeGroof с соавт.<sup>4</sup> проанализировал взаимосвязь между метаболизмом и злокачественной трансформацией на различных стадиях онкогенного прогрессирования. Трансформация H-RasV12/E1A приводила к увеличению СПК, сопровождалась гибелью клеток при низком количестве пассажей, а также повышала скорость роста и потенциал формирования опухоли при высоком количестве пассажей. В клетках высокого пассажа происходило снижение СПК, несмотря на увеличение гликолитического потока (ECAR) в соответствии с эффектом Варбурга.

Gohil с соавт.<sup>5</sup> использовал чувствительную к питательным веществам стратегию скрининга для выявления лекарственных препаратов, изменяющих энергетический обмен клетки. Культуры клеток, использующие галактозу в качестве единственного источника сахара, заставляют клетки использовать окислительное фосфорилирование. Путем скрининга химической библиотеки, включавшей соединения лекарственных препаратов, одобренных FDA, которые избирательно ингибируют рост и пролиферацию в средах с галактозой, связанной с глюкозой, исследователи выявили несколько соединений, перенаправлявших окислительный метаболизм на гликолиз, в том числе отпускаемый без рецепта противорвотный препарат меклизин. Исследователи подтвердили результаты первичных анализов жизнеспособности, используемых для начального скрининга лекарственных препаратов путем оценки СПК и ECAR. Меклизин вызывал дозозависимое снижение СПК в клетках, культивируемых в среде, обогащенной глюкозой, с сопутствующим повышением ECAR. Авторы предположили, что их метод скрининга может найти применение в скрининге больших библиотек соединений в рамках энергетического гомеостаза клеток.

**Измерение скорости закисления внеклеточной среды (ECAR) представляет собой удобный метод обнаружения и количественного определения гликолитического потока в злокачественных клетках в ответ на генетические изменения или лекарственные препараты.**

**Анализатор XF проводит одновременное измерение СПК и ECAR, обеспечивая более полную оценку биоэнергетических процессов в клетке и анализ динамического взаимодействия между двумя основными энергообеспечивающими путями в злокачественных клетках и других типах клеток.**

## Материалы и методы

**Клетки и соединения:** клетки H460 и A 549 выдерживали в питательной среде, состоящей из RPMI 1640, 10% ФБС, пенициллина и стрептомицина (компания Invitrogen) и производили посев (20000 клеток в каждую лунку) в 24-луночные клеточные культуральные микропланшеты. Концентрированные растворы 1,000мМ 2-ДГ готовили в среде для проведения анализа. Концентрированные растворы 2,4-ДНФ и ротенона готовили в ДМСО. 2,4-ДНФ разводили до достижения 10x рабочей концентрации в среде для анализа и доводили pH до 7,4. Ротенон разводили до 13x рабочей концентрации в среде анализа.

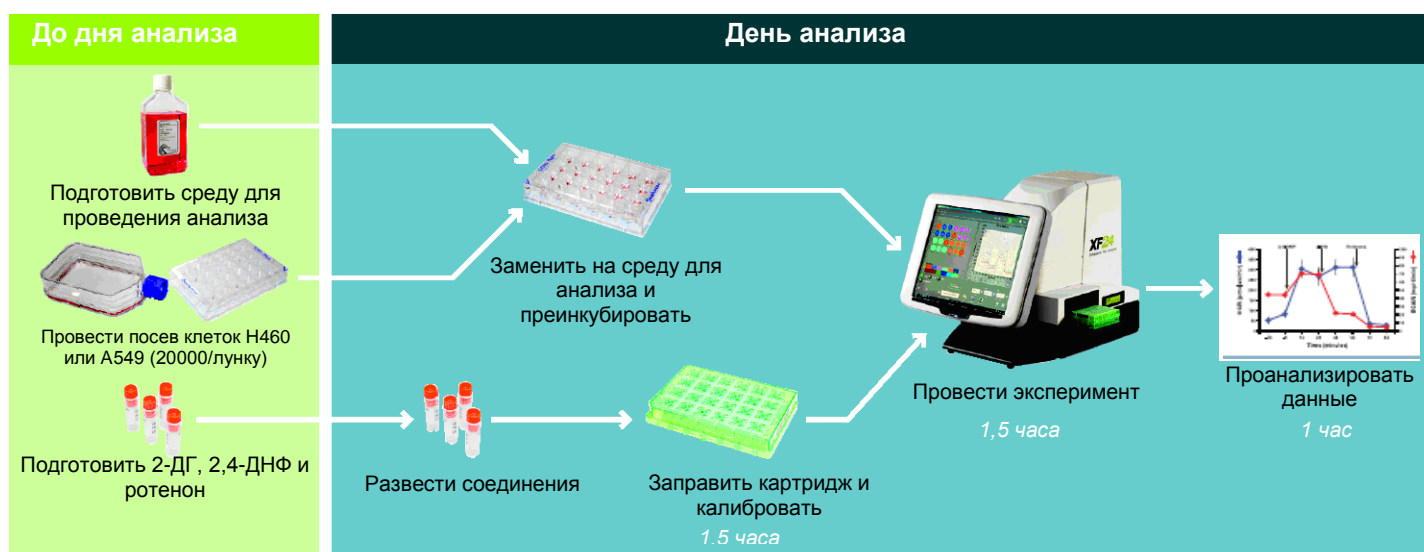
## Анализ XF

Анализы XF проводили с использованием анализатора внеклеточного потока XF (Seahorse Bioscience), полностью интегрированного, многолуночного прибора, измеряющего поглощение и выведение конечных

продуктов метаболизма в режиме реального времени. СПК и ECAR измеряли с помощью набора для проведения анализа XF. Данный одноразовый набор для анализа содержит 24 или 96 твердотельных, двухфлуоресцентных биологических датчиков ( $O_2$  и pH). Каждый датчик также оснащен 4 инъекционными портами (на лунку) для доставки тестируемых препаратов в лунки во время анализа. СПК измеряется в пмоль/мин, ECAR - в мрН/мин.

Для подготовки к анализу, как показано на рисунке 2, обработанные и необработанные клетки H460 или A549 переносили из культуральной питательной среды в среду для анализа (низкобуферный раствор RPMI 1640, содержащий 1 мМ фосфата). После исходных измерений 75 нл тестируемого препарата, приготовленного в среде для анализа, вводили в каждую лунку для достижения конечных рабочих концентраций. После 5 минут перемешивания, обеспечивающего воздействие тестовых реагентов на клетки, измеряли СПК и ECAR. Для экспериментов с временным разрешением в указанные моменты времени проводили многократные введения соединений.

**Рисунок 2 | Схема проведения анализа XF**



### Ссылки

1. Barger JF, Plas DR. *Balancing biosynthesis and bioenergetics: metabolic programs in oncogenesis*. Endocr Relat Cancer. 2010 Sep 23;17(4):R287-304. Print 2010.
2. Wu M, et al. *Multiparameter metabolic analysis reveals a close link between attenuated mitochondrial bioenergetic function and enhanced glycolysis dependency in human tumor cells*. Am J Physiol Cell Physiol. 2007 Jan;292(1):C125-36. Epub 2006 Sep 13.
3. Delgado T, et al. *Induction of the Warburg effect by Kaposi's sarcoma herpesvirus is required for the maintenance of latently infected endothelial cells*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Jun 8;107(23):10696-701. Epub 2010 May 24.
4. de Groof AJ, et al. *Increased OXPHOS activity precedes rise in glycolytic rate in H-RasV12/E1A transformed fibroblasts that develop a Warburg phenotype*. Mol Cancer. 2009 Jul 31;8:54.
5. Gohil VM, et al. *Nutrient-sensitized screening for drugs that shift energy metabolism from mitochondrial respiration to glycolysis*. 2010 Mar;28(3):249-55. Epub 2010 Feb 14.

### Дополнительная литература

1. Slomiany MG, et al. *Hyaluronan, CD44, and emmprin regulate lactate efflux and membrane localization of monocarboxylate transporters in human breast carcinoma cells*. Cancer Res. 2009 Feb 15;69(4):1293-301. Epub 2009 Jan 27.