

УДК 612.461.25:612.396.13-008.9
DOI: 10.26435/UC.V014(41).736

С.А. Зуйков, И.В. Филиппаки, Е.В. Хомутов

ГОО ВПО «Донецкий национальный медицинский университет имени М. Горького», Донецк

ВЛИЯНИЕ МОЧЕВОЙ КИСЛОТЫ НА АКТИВНОСТЬ ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ

Известный феномен патогенеза злокачественно трансформированных клеток – интенсификация гликолиза (эффект Варбурга-Кребтра), с последующей наработкой лактата, признан основным механизмом, обеспечивающим ацидофильность опухоли, при этом ключевым ферментом данного феномена выступает лактатдегидрогеназа (ЛДГ, ЕС 1.1.1.27) [1]. Роль данного фермента в патогенезе злокачественного роста традиционно сводится к его способности изменять концентрацию протонов как в цитоплазме злокачественно трансформированных клеток, так и в опухолевом микроокружении [2]. Именно на изучении активности этого фермента, на тестировании его в качестве мишени для таргетной терапии рака концентрируется внимание многих исследователей [3, 4]. С другой стороны, возникновение и прогрессия опухоли всегда сопровождается нарушениями обмена пуриновых нуклеотидов, которые оказывают влияние не только на состояние злокачественно трансформированных тканей, но и на функциональную активность иммунокомпетентных клеток микроокружения опухоли [5]. Понимая, что оба эти метаболические пути локализованы в цитоплазматическом компартменте, вполне логично предположить наличие между ними взаимодействий. Обоснованность такого предположения подтверждается публикациями о влиянии продуктов пуринового обмена на предпочтительную траекторию и интенсивность реакций гликолитического пути окисления глюкозы [6-8].

Целью настоящего исследования явилось определение возможного влияния мочевиной кислоты на активность ЛДГ.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Обследовано 16 здоровых людей, не имеющих онкологических заболеваний. Исследование изучаемых показателей проводилось в гемолизате эритроцитов, который получали путем двукратного замораживания отмытых эритроцитов. В надосадке гемолизата определяли

содержание гемоглобина с использованием набора «Гемоглобин» (Ольвекс Диагностикум, РФ).

Для оценки влияния мочевиной кислоты на активность ЛДГ эритроцитов гемолизаты каждого пациента делили на 2 серии (контрольную и опытную). По 0,02 мл образцов обеих серий попарно инкубировали при 37 С в течение 10 минут в 0,8 мл буфера, содержащего 2,0 мМ пирувата (контрольная серия) или 2,0 мМ пирувата и 0,9 мМ мочевиной кислоты (опытная серия).

Активность ЛДГ в образцах сравниваемых серий оценивали по скорости убыли НАДН с помощью SPECORD 200 PLUS (Analytik Jena, Германия) при 340 нм, с использованием коммерческого набора «LDH-100» (ERBA LACHEMA, Чехия).

Реакцию восстановления пирувата запускали добавлением в инкубационную смесь 0,2 мл 1,66 мМ раствора НАДН. Расчет показателя активности фермента проводили по коэффициентам уравнений линейной регрессии значений оптической плотности в интервале от 2 до 5 минут протекания реакции. Показатель активности фермента нормировали на содержание гемоглобина в исследуемых образцах.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием лицензионной программы «Statistica 10.0» (StatSoft). Цифровые данные представлены в виде средних арифметических и их стандартных отклонений. Различия между средними величинами считали достоверными при значениях $p < 0,05$. Исследование соответствует этическим принципам клинических испытаний и положениям Хельсинкской декларации Всемирной Медицинской Ассоциации, не нарушает интересов пациента и не вредит его здоровью (Комиссия по биоэтике ГОО ВПО «Донецкого национального медицинского университета им. М. Горького»). Авторы сообщают, что не имеют конкурирующих интересов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сопоставление активности ЛДГ в сравниваемых сериях опытов демонстрирует выраженное ингибирующее влияние мочевой кислоты на активность фермента. В 15 из 16 исследованных гемолизатов эритроцитов показатели активности ЛДГ были ниже в опытной серии, когда анализируемые образцы предварительно инкубировали в реакционной смеси, содержащей мочевую кислоту.

Полученные показатели активности фермента отличаются достаточно высоким разбросом значений даже внутри каждой серии экспериментов. Коэффициент вариации в контрольной серии составил 44,5%, а в опытной – почти 60%. Такая особенность полученных выборок не связана ни с полом обследованных пациентов (средние значения в подгруппе мужчин – $4,02 \pm 3,01$ мкат/г Hb, женщин – $4,39 \pm 2,19$ мкат/г Hb, $p = 0,746$), ни с различиями в их возрасте – коэффициент парной корреляции показателей активности ЛДГ с возрастом пациентов составил всего 0,120 ($p < 0,05$).

Влиянием методических погрешностей на этапах подготовки проб на величину дисперсии признака также можно пренебречь, поскольку представленные в работе показатели активности фермента нормированы по содержанию гемоглобина в анализированных пробах. Кроме того, пары показателей, полученные в разных сериях на образцах крови каждого пациента, характеризуются тесной для биологических исследований корреляционной связью: $r = 0,712$ ($p < 0,05$).

Следовательно, наиболее реальной причиной обнаруженной высокой варибельности показателей активности фермента следует считать индивидуальные особенности пациентов, кровь которых использовали при проведении исследования. В этом случае особого внимания заслуживает пациент, активность ЛДГ которого после предварительной инкубации в среде, содержащей мочевую кислоту, в отличие от остальных обследованных повысилась почти на 15%. Этот факт нуждается в дополнительной трактовке.

Среднее значение показателя активности ЛДГ в опытной серии экспериментов оказалось почти на 40% ниже, чем в контроле, когда предварительную инкубацию гемолизата эритроцитов проводили без мочевой кислоты, – $3,40 \pm 2,00$ мкат/г Hb и $5,51 \pm 2,45$ мкат/г Hb соответственно (см. рис.). Обнаруженные различия средних показателей статистически значимы при $p = 0,004$.

Обнаруженное в настоящей статье выраженное (на 40%) ингибирующее влияние мочевой кислоты на активность ЛДГ сказывается не только на предпочтительной траектории окисления углеводов, но и на предполагаемом участии данного фермента в патогенетических механизмах развития и прогрессии злокачественных новообразований [3, 9] и даже на эффективности химиотерапии [10].

Учитывая, что константа термодинамического равновесия катализируемой ЛДГ реакции составляет порядка 105, ее направление резко смещено в сторону восстановления пирувата до лактата [11]. Отсюда следует, что отмеченное нами ингибирование мочевой кислотой ак-

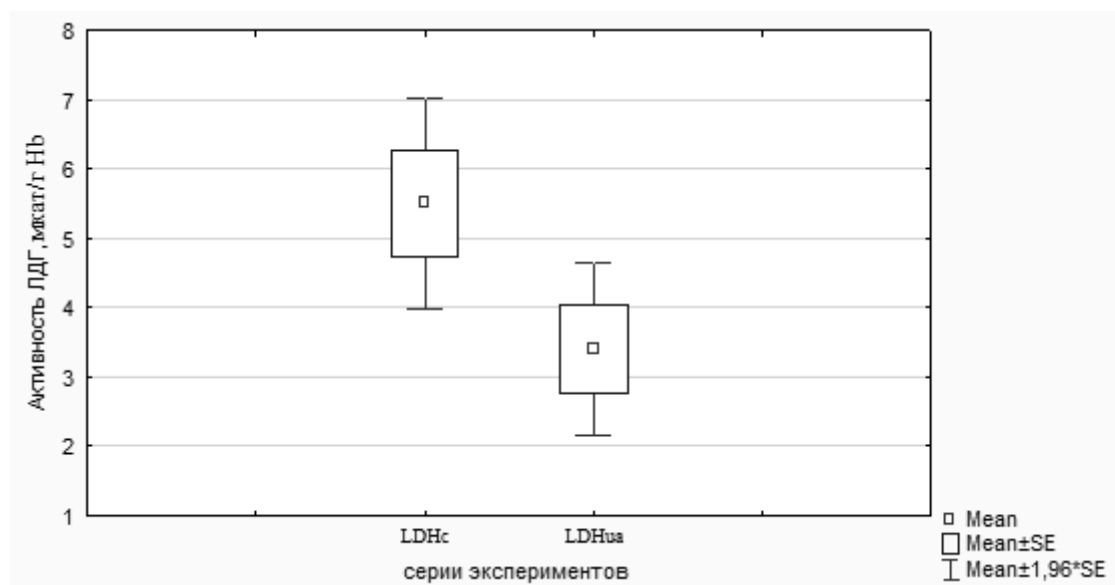


Рис. Статистические характеристики активности ЛДГ в контрольной (LDHc) и опытной (LDHua) сериях экспериментов.

тивности фермента будет тормозить образование лактата и препятствовать регенерации в цитоплазме пула окисленного НАД⁺. Последнее ограничит скорость гликолитического пути окисления глюкозы, интенсификация которого характерна для злокачественно трансформированных клеток [1, 12].

С другой стороны, торможение конверсии пирувата в лактат будет перенаправлять (усилить) ток пирувата в митохондрии, в энергетически высокоэффективные реакции цикла трикарбоновых кислот и окислительного фосфорилирования с соответствующим улучшением энергетического обеспечения клеток.

Другими словами, представленные результаты можно рассматривать в качестве естественного механизма ограничения выраженности характерного для злокачественно трансформиро-

ванных тканей эффекта Варбурга-Кребтри. Высказанные выше соображения и интерпретации обнаруженного феномена торможения мочевой кислотой активности ЛДГ носят предположительный характер. Их справедливость нуждается в дополнительных доказательствах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют, что предварительная 10-минутная инкубация гемолизата эритроцитов в присутствии мочевой кислоты в концентрации 0,9 мМ приводит к статистически значимому угнетению активности ЛДГ. Обнаруженный эффект мочевой кислоты отмечается в подавляющем большинстве (90%) использованных образцов периферической крови.

С.А. Зуйков, И.В. Филиппаки, Е.В. Хомутов

ГОО ВПО «Донецкий национальный медицинский университет имени М. Горького», Донецк

ВЛИЯНИЕ МОЧЕВОЙ КИСЛОТЫ НА АКТИВНОСТЬ ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ

Данная статья посвящена результатам исследования особенностей изменения активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ) эритроцитов, а также изучению влияния мочевой кислоты на активность ферментов углеводного обмена (анаэробного окисления глюкозы). Материалы и методы. Для подтверждения возможного взаимодействия между реакциями гликолиза и пуринового обмена в опытах *in vitro* оценили влияние мочевой кислоты на активность ЛДГ из эритроцитов цельной крови 16-ти условно здоровых людей. Результаты. Показано, что предварительная инкубация (10 минут при 37°C) ЛДГ в присутствии 0,9 мМ моче-

вой кислоты в 90% случаев приводит к снижению ее активности почти на 40% ($p < 0,004$). Снижение активности фермента, а также степень его чувствительности к мочевой кислоте не связаны с возрастом пациентов. Заключение. Полученные новые данные дополняют сведения о лактатдегидрогеназе эритроцитов и могут быть использованы в дальнейших исследованиях влияния мочевой кислоты на активность ферментов гликолиза онкологических больных.

Ключевые слова: лактатдегидрогеназа, гликолиз, эффекта Варбурга-Кребтри, пуриновый обмен, мочевая кислота, онкология.

S.A. Zuikov, I.V. Filippaki, E.V. Khomutov

SEI HPE «M. Gorky Donetsk National Medical University», Donetsk

INFLUENCE OF URIC ACID ON LACTATE DEHYDROGENASE ACTIVITY

This article is devoted to the results of a study of the characteristics of changes in the activity of lactate dehydrogenase (LDH) of erythrocytes and the expansion of ideas about the role of uric acid and its influence on the work of carbohydrate metabolism enzymes, in particular, anaerobic oxidation of glucose. Materials and methods. The effect of uric acid on the activity of lactate dehydrogenase (LDH) from red blood cells of whole blood of 16 conditionally healthy people was evaluated to confirm the possible interaction between glycolysis and purine metabolism *in vitro*. Results. Pre-incubation (10 minutes at 37 C) LDH in the presence of 0,9 mM of uric

acid in 90% of cases leads to decreasing its activity by almost 40% ($p < 0.004$). The decrease in enzyme activity or the degree of its sensitivity to uric acid is not associated with the patients' age. Conclusions. The obtained new data supplement the information on lactate dehydrogenase of erythrocytes and can be used in further studies of the effect of uric acid on the activity of glycolysis enzymes in oncological patients.

Key words: lactate dehydrogenase, glycolysis, Warburg-Crabtree effect, purine metabolism, uric acid, cancer.

ЛИТЕРАТУРА

1. Eichenlaub T., Villadsen R., Freitas F. et al. Warburg Effect Metabolism Drives Neoplasia in a Drosophila Genetic Model of Epithelial Cancer. *Current Biology*. 2018; 28 (20): 3220-3228. doi: 10.1016/j.cub.2018.08.035
2. Кобляков В.А. 2. Роль протонных помп при злокачественном росте. *Биохимия*. 2017; 82, 4: 557-571.
3. Fiume L., Manerba M., Vettrai M., Di S.G. Inhibition of lactate dehydrogenase activity as an approach to cancer therapy. *Future. Med. Chem.* 2014; 6 (4): 429-445. doi: 10.1159/000493110
4. Ping W., Senyan H., Li G., Yan C., Long L. Increased Lactate in Gastric Cancer Tumor-Infiltrating Lymphocytes Is Related to Impaired T Cell Function Due to miR-34a Downregulated Lactate Dehydrogenase. *Cell Physiol Biochem*. 2018; 49 (2): 828-836. doi: 10.4155/fmc.13.206
5. Yin J., Ren W., Huang X., Deng J., Li T., Yin Y. Potential Mechanisms Connecting Purine Metabolism and Cancer Therapy. *Front Immunol*. 2018; 9: 1697. doi: 10.3389/fimmu.2018.01697
6. Kukko V., Kaipia A., Talala K. et al. Allopurinol and risk of benign prostatic hyperplasia in a Finnish population-based cohort. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2018; 21 (3): 373-378. doi: 10.1038/s41391-017-0031-8
7. Li W.M., Pasaribu N., Lee S.S. et al. Risk of incident benign prostatic hyperplasia in patients with gout: a retrospective cohort study. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2018; 21 (2): 277-286. doi: 10.1038/s41391-018-0047-8
8. Richette P., Clerson P., Perissin L., Flipo R.M., Bardin T. Revisiting comorbidities in gout: a cluster analysis. *Ann. Rheum. Dis.* 2015; 74(1): 142-147. doi: 10.1136/annrheumdis-2013-203779
9. Rong Y., Wu W., Ni X. et al. Lactate dehydrogenase A is overexpressed in pancreatic cancer and promotes the growth of pancreatic cancer cells. *Tumour Biol.* 2013; 34 (3): 1523-1530. doi: 10.1007/s13277-013-0679-1
10. Zhou M., Zhao Y., Ding Y. et al. Warburg effect in chemosensitivity: targeting lactate dehydrogenase-A re-sensitizes Taxol-resistant cancer cells to Taxol. *Mol. Cancer*. 2010; 9: 33.
11. Valenti D., de B.L., Atlante A., Passarella S. L-Lactate transport into rat heart mitochondria and reconstruction of the L-lactate/pyruvate shuttle. *Biochem. J.* 2002; 364 (1): 101-104.
12. Sanderson S.M., Locasale J.W. Revisiting the Warburg Effect: Some Tumors Hold Their Breath. *Cell Metab.* 2018; 28 (5): 669-670. doi: 10.1016/j.cmet.2018.10.011

REFERENCES

1. Eichenlaub T., Villadsen R., Freitas F. et al. Warburg Effect Metabolism Drives Neoplasia in a Drosophila Genetic Model of Epithelial Cancer. *Current Biology*. 2018; 28 (20): 3220-3228. doi: 10.1016/j.cub.2018.08.035
2. Koblyakov V.A. 2. Rol' protonnykh pomp pri zlokachestvennom roste. *Biokhimiya*. 2017; 82, 4: 557-571.
3. Fiume L., Manerba M., Vettrai M., Di S.G. Inhibition of lactate dehydrogenase activity as an approach to cancer therapy. *Future. Med. Chem.* 2014; 6 (4): 429-445. doi: 10.1159/000493110
4. Ping W., Senyan H., Li G., Yan C., Long L. Increased Lactate in Gastric Cancer Tumor-Infiltrating Lymphocytes Is Related to Impaired T Cell Function Due to miR-34a Downregulated Lactate Dehydrogenase. *Cell Physiol Biochem*. 2018; 49 (2): 828-836. doi: 10.4155/fmc.13.206
5. Yin J., Ren W., Huang X., Deng J., Li T., Yin Y. Potential Mechanisms Connecting Purine Metabolism and Cancer Therapy. *Front Immunol*. 2018; 9: 1697. doi: 10.3389/fimmu.2018.01697
6. Kukko V., Kaipia A., Talala K. et al. Allopurinol and risk of benign prostatic hyperplasia in a Finnish population-based cohort. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2018; 21 (3): 373-378. doi: 10.1038/s41391-017-0031-8
7. Li W.M., Pasaribu N., Lee S.S. et al. Risk of incident benign prostatic hyperplasia in patients with gout: a retrospective cohort study. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2018; 21 (2): 277-286. doi: 10.1038/s41391-018-0047-8
8. Richette P., Clerson P., Perissin L., Flipo R.M., Bardin T. Revisiting comorbidities in gout: a cluster analysis. *Ann. Rheum. Dis.* 2015; 74(1): 142-147. doi: 10.1136/annrheumdis-2013-203779
9. Rong Y., Wu W., Ni X. et al. Lactate dehydrogenase A is overexpressed in pancreatic cancer and promotes the growth of pancreatic cancer cells. *Tumour Biol.* 2013; 34 (3): 1523-1530. doi: 10.1007/s13277-013-0679-1
10. Zhou M., Zhao Y., Ding Y. et al. Warburg effect in chemosensitivity: targeting lactate dehydrogenase-A re-sensitizes Taxol-resistant cancer cells to Taxol. *Mol. Cancer*. 2010; 9: 33.
11. Valenti D., de B.L., Atlante A., Passarella S. L-Lactate transport into rat heart mitochondria and reconstruction of the L-lactate/pyruvate shuttle. *Biochem. J.* 2002; 364 (1): 101-104.
12. Sanderson S.M., Locasale J.W. Revisiting the Warburg Effect: Some Tumors Hold Their Breath. *Cell Metab.* 2018; 28 (5): 669-670. doi: 10.1016/j.cmet.2018.10.011