

АКТИВНІСТЬ ЛАКТАТДЕГІДРОГЕНАЗИ ТА РІВЕНЬ ЦИНКУ У ПУХЛИНАХ ПЛОСКОКЛІТИННОЇ КАРЦИНОМИ ГОРТАНІ

Вірич П.А. <https://orcid.org/0000-0001-6201-3892>

Чайка С.П. <https://orcid.org/0000-0003-4324-5529>

Карась Г.А. <https://orcid.org/0000-0003-3098-3813>

Вірич П.А. <https://orcid.org/0000-0002-1463-1992>

Сержко Ю.О. <https://orcid.org/0009-0005-7045-3624>

Карась А.Ф. <https://orcid.org/0000-0003-2324-780X>

Лукач Е.В. <https://orcid.org/0000-0003-3262-4996>

*ДУ «Інститут отоларингології імені проф. О.С. Коломійченка НАМН України»,
Київ, Україна*

pavlo.virych@knu.ua

Актуальність. Фізіологічні зміни у ракових клітинах передбачають перебудову метаболізму спрямовану на отримання енергії та реструктуризацію оточуючих тканин. Вони є індикаторами злоякісної трансформації клітин.

Ціль: комплексна оцінка змін рівнів цинку, лактатдегідрогеназної активності та взаємозв'язку між цими показниками у клітинах плоскоклітинної карциноми гортані (ПКГ).

Матеріали та методи. Дослідження тканин 40 пацієнтів з діагнозом плоскоклітинна карцинома гортані проводили після планового хірургічного видалення пухлин. Зрізи тканин фарбували флуоресцентним барвником N-(6-метокси-8-хінолініл)-4-метилбензолсульфонамідом для виявлення цинку, нітротетарзолію блакитного у суміші НАД⁺, лактату натрію для оцінки лактатдегідрогеназної активності.

Результати. Рівень активності лактатдегідрогенази у нормальному епітелії гортані був вищим на 24 % відносно сполучної тканини. Показники активності ЛДГ для зроговіваючої плоскоклітинної карциноми гортані були аналогічними. У тканинах незроговіваючої ПКГ виявлено збільшення становило 32 %. Рівень цинку у ракових клітинах ПКГ збільшувався на 40-60 % відносно оточуючої сполучної тканини, що значно нижче від нормального епітелію гортані, де різниця становила близько 150-170 %. Статистично достовірно вищий вміст цинку (23 %) виявлено в тканинах незроговіваючої ПКГ відносно зроговіваючої ПКГ. Не виявлено залежності між рівнем цинку та активністю лактатдегідрогенази у тканинах ПКГ.

Висновки. Незроговіваюча ПКГ має вищі рівні цинку та активності ЛДГ порівняно з зроговіваючою ПКГ та нормальним епітелієм гортані, що може вказувати на вищий рівень злоякісності цього підтипу раку.

Ключові слова: плоскоклітинна карцинома гортані, цинк, лактатдегідрогеназа

Актуальність. Рак гортані – одне з найпоширеніших злоякісних новоутворень людини. Переважна більшість випадків представлена добре диференційованою плоскоклітинною карциномою гортані (ПКГ) (близько 90 %) [1]. Гетерогенність пухлини перешкоджає точній молекулярній характеристиці та вибору ефективних методів лікування [2]. Найбільш ефективно лікування передбачає хірургічне видалення пухлини. Прогресування ПКГ супроводжується молекулярними змінами клітин та реструктуризацією метаболізму. Метаболічне перепрограмування є наслідком злоякісної клітинної трансформації [3, 4]. Ракові клітини мають високі енергетичні потреби для підтримки свого швидкого росту та проліферації. Аеробний гліколіз є пріоритетним шляхом виробництва енергії в ракових клітинах, навіть за наявності кисню [5]. Лактатдегідрогеназа (ЛДГ) каталізує перетворення пірувату на лактат. Ензим і лактат крові або тканин є онкомаркерами при різних типах раку [6]. ЛДГ є як маркером злоякісності, так і прогностичним показником при плоскоклітинному раку голови та шиї [7].

Цинк є одним з найважливіших мікроелементів, що беруть участь у численних клітинних процесах. Внутрішньоклітинний гомеостаз цинку регулюється мережею білків родин ZIP, ZnT та MTs. Цинк підтримує енергетичні та біосинтетичні потреби злоякісних клітин [8]. Рівень цинку в крові корелює з активністю антиоксидантної системи та виживанням у пацієнтів з плоскоклітинним раком голови та шиї [9]. Цей показник знижується в міру прогресування раку [10]. Існує обмежена інформація про рівні цинку безпосередньо в тканинах ПКГ. Наразі немає даних про зв'язок між вмістом цинку та активністю ЛДГ у тканинах ПКГ.

Ціль: комплексна оцінка змін рівнів цинку, лактатдегідрогеназної активності та взаємозв'язку між цими показниками у клітинах плоскоклітинної карциноми гортані.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Обстежено групу 40 пацієнтів віком від 43 до 75 років (медіана 67 років) з підтвердженим

діагнозом «незроговівуюча плоскоклітинна карцинома гортані» та «зроговівуюча плоскоклітинна карцинома гортані» гортані 3 стадії. Включені у дану вибірку пацієнти не мали суттєвих порушень метаболізму (діабет), функцій печінки, нирок чи серцево-судинної системи. Дослідження проведено відповідно до принципів Гельсінської декларації і погоджено Етичною комісією ДУ «Інститут отоларингології ім. проф. О.С. Коломійченка НАМНУ» (протокол № 5/23-9 від 9 листопада 2023 р.). Перед оперативним втручанням та лікувальними заходами було отримано інформовану згоду пацієнтів.

Фрагменти тканин пухлин заморожували при -18°C і готували гістологічні зрізи товщиною 10 мкм за допомогою мікротома-кріостата HM525 (Microm, Thermo Fisher Scientific, Волтем, Массачусетс, США). Зрізи тканин фарбували N-(6-метокси-8-хінолініл)-4-метилбензолсульфонамідом (TSQ, Sigma-Aldrich, Берлінгтон, Массачусетс, США) 30 мкМ у фосфатно-сольовому буфері (pH=7,3, Biowest, Франція) протягом 40 хв. при 37°C . Барвник не змивали. Флуоресценцію досліджували за допомогою мікроскопа Olympus BX53 (Olympus Corporation, Японія), оснащеного флуоресцентним блоком XCite Series 120 Q і камерою Olympus DP72. Збудження проводили ультрафіолетовим світлом 365 нм, флуоресценцію реєстрували при 470 нм. Експозиція становила 10 мсек. Для кожного зразка тканини аналізували 5 гістологічних зрізів. Обробку зображень проводили програмним забезпеченням ImageJ. Вимірювали інтегральну яскравість ділянок тканин однакової площі (принаймні 50 ділянок на 5 гістологічних зрізах). Результати представлені як медіана та міжквартильний інтервал (медіана (Me), 25%-75%).

Зрізи пухлинної тканини (10 мкм) готували за допомогою мікротома-кріостата HM525 при -18°C . Оцінку активності лактатдегідрогенази в тканинах проводили за допомогою нітротетразолію блакитного [11]. Готували інкубаційну суміш, що містила 10 мл фосфатно-сольового буферу (PBS, pH 7,4), 20 мл дистильованої води, 5

мг нікотинаденіндинуклеотиду (NAD^+ , Sigma-Aldrich), 5 мг нітротетразолію блакитного хлориду (Merck, Німеччина), 10 мкл натрію лактату (50%). Зразки тканин витримували в суміші протягом 2 годин при 37°C . Промивали сольовим розчином і поміщали в канадський бальзам за стандартною методикою. Тканини досліджували за допомогою мікроскопа Olympus BX53 з камерою Olympus DP72. Усі зразки були сфотографовані за однакових умов освітлення та експозиції. Для одного гістологічного зразка було зареєстровано щонайменше 20 полів зору. Для нівелювання впливу яскравості світла та неспецифічного осадження барвника, розраховували різницю інтенсивності забарвлення між безпосередньо раковою тканиною та здоровою сполучною тканиною. Різницю в фарбуванні оцінювали за допомогою програмного забезпечення ImageJ. Дані були представлені як медіана та міжквартильний інтервал (медіана (Me), 25%-75%).

Статистичну обробку даних проводили за допомогою тестів Краскела-Уолліса ($p < 0,05$). Результати представлені у вигляді медіани та міжквартильного інтервалу (Me, 25–75%).

Кореляційний аналіз проводили за допомогою тесту Спірмена для непараметричних даних ($p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Лактатдегідрогеназа цитоплазматичний фермент, який каталізує перетворення пірувату в лактат. Фермент є одним із діагностичних маркерів гіпоксії тканин та інтенсивності аеробного гліколізу в пухлинах. Руйнування клітин сприяє збільшенню ЛДГ у слині пацієнтів [12]. Значні кількості ЛДГ експресуються в епітеліальних клітинах порожнини рота. Рівень ензиму підвищується при патологіях, включаючи рак [13]. Дослідники виявили підвищення рівня ЛДГ як у слині, так і в пухлинній тканині [14]. Застосування нітротетразолію блакитного дозволяє оцінити активність ЛДГ у клітинах ПКГ (рис. 1).

Оскільки фермент є цитоплазматичним, ядра клітини не забарвлюються, а інтенсивність фарбування ракових клітин значно вище, ніж оточуючих рак асоційованих тканин та сполучної тканини, що не входить до складу

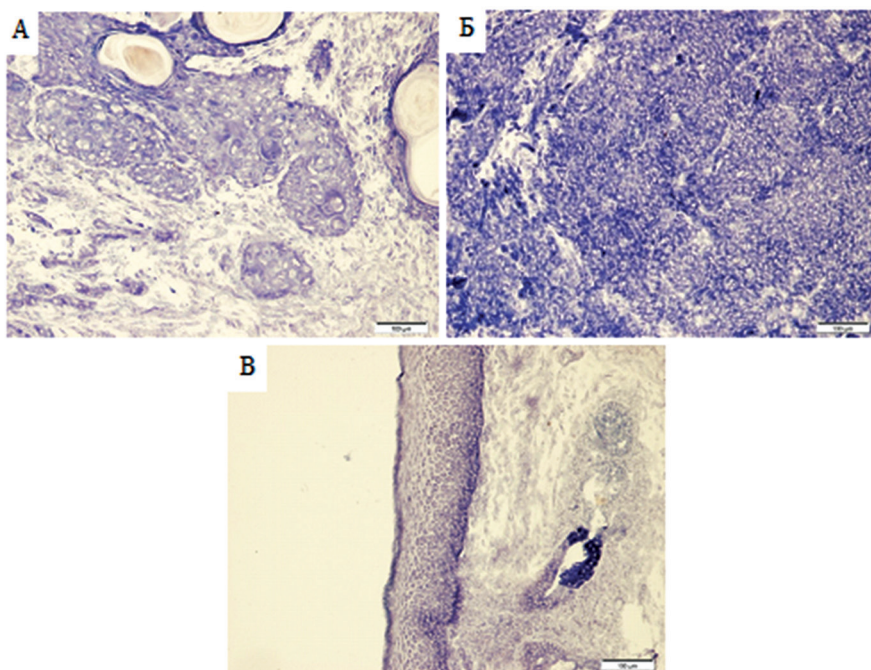


Рис. 1. Активність лактатдегідрогенази при зроговіваючій (А), незроговіваючій (Б) плоскоклітинній карциномі гортані, та нормальному епітелію гортані (В). Фарбування нітротетразолієм блакитним. Масштаб 100 мкм.

пухлин. Активність ЛДГ у нормальному епітелії була вищою відносно сполучної тканини на 24 % (рис. 2). Схожі показники було зареєстровано для зроговівуючої ПКГ. Збільшення становило 23 %. У раковій тканині незроговівуючої ПКГ активність ЛДГ була вищою на 32% відносно сполучної тканини.

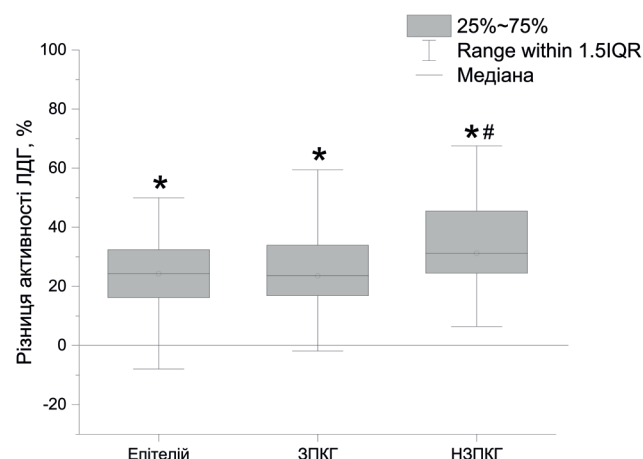


Рис. 2. Різниця в лактатдегідрогеназній активності при зроговівуючій (ЗПКГ) і незроговівуючій (НЗПКГ) плоскоклітинній карциномі гортані. Базовий рівень «0» – активність ЛДГ у неракових тканинах. Тест Краскела-Уолліса, * $p < 0,05$ порівняно сполучною тканинною, # - порівняно з нормальним епітелієм гортані; медіана та міжквартильний інтервал (Me, 25%-75%)

У здорових тканинах вміст цинку відповідає рівню поточної потреби клітин. Цинк приймає участь у різних протиракових механізмах, включаючи репарацію ДНК, окислювальний стрес, імунні реакції та запалення [8]. Зміни концентрації цинку, що виходять за межі клітинної регуляторної здатності, можуть ініціювати злоякісну трансформацію. Рівень цинку сприяє біоенергетичним/синтетичним потребам цих процесів. Цинк-залежний шлях активації мітоген-активованої протеїнкінази важливий для регуляції клітинної проліферації, диференціювання та апоптозу в пухлиногенезі [15]. Цинк відіграє ключову роль у ремоделюванні позаклітинного матриксу. Він є кофактором матричних металопротеїназ (ММР). ММР сприяють клітинній проліферації, міграції, диференціації та беруть участь в апоптозі, ангіогенезі, регенерації тканин та імунній відповіді. Ці ферменти залучені у прогресії пухлини і є одними з маркерів злоякісності. Підвищення рівня цинку виявлено в тканинах ПКГ (рис. 3).

Крім того, рак асоційовані тканини, що містили колаген, мали ділянки з підвищеним рівнем цинку (рис. 3А). У більшості випадків

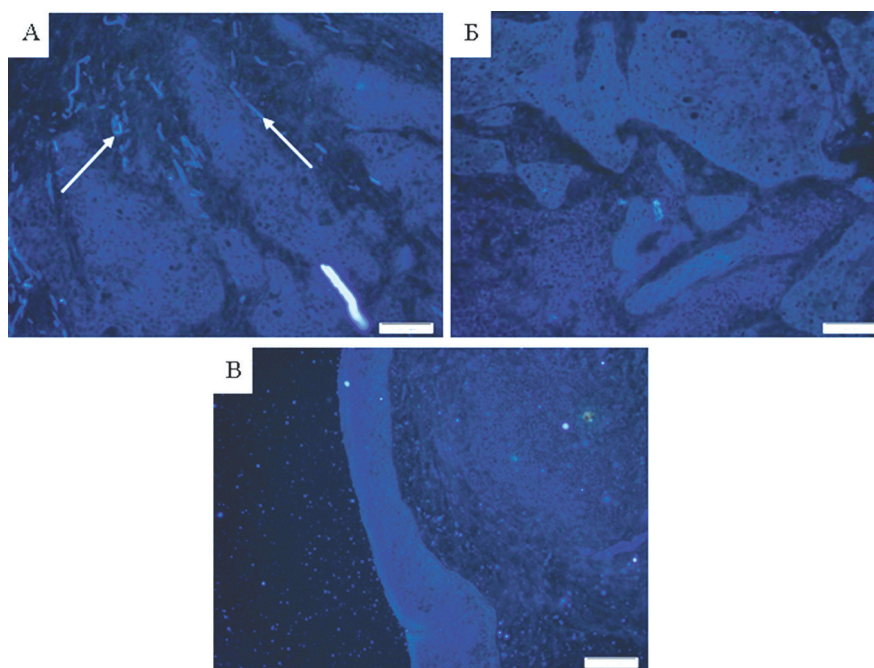


Рис. 3. Рівень цинку в зроговівуючій (А), незроговівуючій (Б) плоскоклітинній карциномі гортані та нормальному епітелії гортані (В) Фарбування ТSQ. Деякі ділянки колагену в тканинах мають підвищений рівень цинку (показано стрілками).

вони відповідали орієнтації колагенових волокон. Ми припускаємо, що підвищений вміст цинку в таких областях пов'язаний з наявністю цинквмісних білків. Важливо відзначити, що ці ділянки не мають ознак запалення або резорбції і знаходяться в безпосередній близькості до острівців ракової тканини.

Загальне підвищення рівня цинку в пухлинах становило 40-60 % відносно сполучної тканини (рис. 4). Статистично достовірно вищий вміст цинку (23 %) виявлено в тканинах незроговіваючої ПКГ відносно незроговіваючої ПКГ. Але, ці показники були значно нижчими відносно нормального епітелію гортані. Рівень цинку становив 150-170 % відносно сполучної тканини.

Таким чином, при злоякісній трансформації відбувається зниження рівня цинку у тканинах ПКГ відносно епітелію гортані.

У оточуючих пухлину тканинах на різних стадіях запалення рівень цинку був високим. Реєструвалося збільшення більше ніж у 2 рази відносно нормальної сполучної тканини. Проте відмінностей у вмісті мікроелемента для різних типів ПКГ не виявлено. (рис. 4).

Таким чином, при розвитку зроговіваючої та незроговіваючої ПКГ було виявлено порушення нормального вмісту і, відповідно, регуляції цинку, як в пухлині, так і в рах асоційованих тканинах (рис. 5).

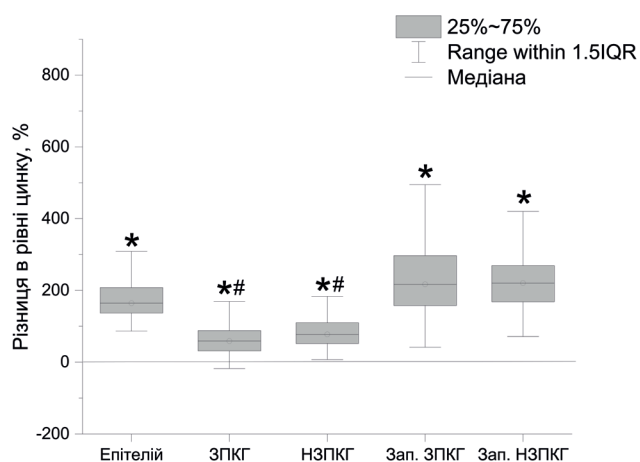


Рис. 4. Зміна рівнів цинку у зроговіваючій (ЗПКГ), незроговіваючій (НЗПКГ) плоскоклітинній карциномі гортані та оточуючими тканинами на різних стадіях запалення (Зап.). Базовий рівень «0» – рівень цинку в нераковій сполучній тканині. Тест Краскела-Уолліса, * $p < 0,05$ порівняно з базовим рівнем, # - $p < 0,05$ порівняно з нормальним епітелієм гортані; медіана та міжквартильний інтервал (Ме, 25%-75%)

Не виявлено залежності між показниками рівнів активності ЛДГ та вмістом цинку у ракових тканинах ПКГ. До розрахунків не було включено пацієнтів з метастазами, рецидивом чи іншими ускладненнями, які можуть додатково впливати на показники рівнів цинку в тканинах. Проте, дослідження в цьому напрямку будуть продовжуватися для охоплення більшої вибірки, а також з'ясування потенційних змін показників в умовах ускладненого перебігу захворювання, резистентності до хіміотерапії тощо.

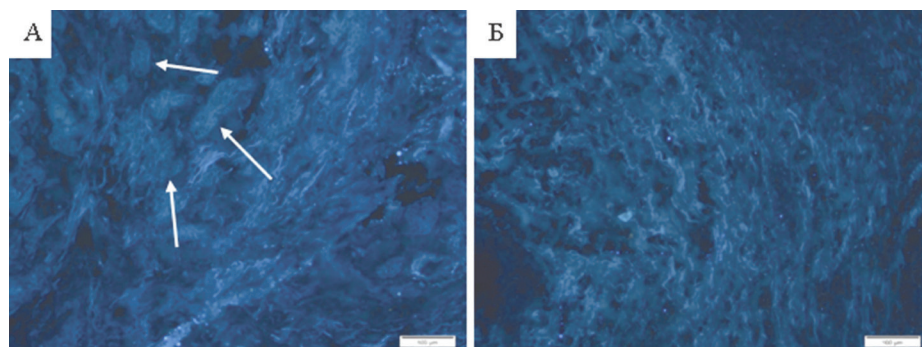


Рис. 5. Рівень цинку в запалених тканинах навколо зроговіваючої (А) та незроговіваючої (Б) плоскоклітинної карциноми гортані. Фарбування TSQ. Стрілки вказують на острівці ракової тканини.

ВИСНОВКИ

1. Виявлено збільшення лактатдегідрогеназної активності у зроговіваючій плоскоклітинній карциномі гортані на 23 %, що відповідає аналогічним показникам нормального епітелію гортані. У тканинах незроговіваючої ПКГ виявлено зростання показника на 32 %, що вказує на більш високі енергетичні потреби тканин пухлин цього типу і, ймовірно, вищий рівень злоякісності.
2. Рівень цинку у ракових клітинах ПКГ збільшувався на 40-60 % відносно оточуючої сполучної тканини, що значно нижче він нормального епітелію гортані, де різниця становила близько 150-170 %. Статистично достовірно вищий вміст цинку (23 %) виявлено в тканинах незроговіваючої ПКГ відносно зроговіваючої ПКГ.
3. Не виявлено кореляції між рівнем активності лактатдегідрогенази та вмістом цинку у тканинах плоскоклітинної карциноми гортані. Це може бути свідченням відсутності прямого зв'язку між цими показниками.

Відмова від відповідальності. Автори заявляють, що висловлені у поданій статті думки є їх власними, а не офіційними позиціями установи.

Конфлікт інтересів. Автори підтверджують відсутність конфлікту інтересів протягом виконання дослідження та написання рукопису.

Джерела фінансування. Дослідження виконано за тематикою «Дослідити особливості перебігу злоякісних новоутворень верхніх дихальних шляхів у хворих після COVID-19 для підвищення ефективності їх лікування» ДУ «Інститут отоларингології імені проф. О.С. Коломійченка НАМН України», Київ, Україна.

REFERENCES

1. Liberale C, Soloperto D, Marchioni A, Monzani D, Sacchetto L. Updates on Larynx Cancer: Risk Factors and Oncogenesis. *Int J Mol Sci*. 2023;24(16):12913. DOI: 10.3390/ijms241612913.
2. Johnson DE, Burtneß B, Leemans CR, Lui VWY, Bauman JE, Grandis JR. Head and neck squamous cell carcinoma. *Nat Rev Dis Primers*. 2023;9(1):4. DOI:10.1038/s41572-023-00418-5.
3. Guo S, Wang X, Wang Y, Bai J, Liu Y, Shao Z. The potential therapeutic targets of glutamine metabolism in head and neck squamous cell carcinoma. *Biomed Pharmacother*. 2024;176:116906. DOI:10.1016/j.biopha.2024.116906.
4. Wang Y, Zhang X, Wang S, et al. Identification of Metabolism-Associated Biomarkers for Early and Precise Diagnosis of Oral Squamous Cell Carcinoma. *Biomolecules*. 2022;12(3):400. DOI:10.3390/biom12030400.
5. Zhou D, Duan Z, Li Z, Ge F, Wei R, Kong L. The significance of glycolysis in tumor progression and its relationship with the tumor microenvironment. *Front Pharmacol*. 2022;13:1091779. DOI: 10.3389/fphar.2022.1091779.
6. Chen J, Huang Z, Chen Y, Tian H, Chai P, Shen Y, Yao Y, Xu S, Ge S, Jia R. Lactate and lactylation in cancer. *Signal Transduct Target Ther*. 2025;10(1):38. DOI: 10.1038/s41392-024-02082-x.
7. Abedi N, Maleki L, Tarrahi MJ, Khalesi S. Evaluation of changes in Salivary Lactate Dehydrogenase Level for detection of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: A Systematic Review and Meta-Analysis Study. *Int J Prev Med*. 2023;14:50. DOI: 10.4103/ijpvm.ijpvm_452_21.
8. Chen B, Yu P, Chan WN, Xie F, Zhang Y, Liang L, Leung KT, Lo KW, Yu J, Tse GMK, Kang W, To KF. Cellular zinc metabolism and zinc signaling: from biological functions to diseases and therapeutic targets. *Signal Transduct Target Ther*. 2024;9(1):6. DOI: 10.1038/s41392-023-01679-y.
9. Lubiński J, Jaworowska E, Derkacz R, Marciniak W, Białkowska K, Baszuk P, Scott RJ, Lubiński JA. Survival of Laryngeal Cancer Patients Depending on Zinc Serum Level and Oxidative Stress Genotypes. *Biomolecules*. 2021;11(6):865. DOI: 10.3390/biom11060865.
10. Büntzel J, Bruns F, Glatzel M, Garayev A, Mücke R, Kisters K, Schäfer U, Schönekaes K, Micke O. Zinc concentrations in serum during head and neck cancer progression. *Anticancer Res*. 2007;27(4A):1941-3. URL: <https://ar.iiar->

journals.org/content/anticancer/27/4A/1941.full.pdf

11. Landino L, Boike L, Lain T. Inhibition of lactate dehydrogenase-A by singlet oxygen and hypochlorous acid via cysteine oxidation and irreversible conformational changes. *BioChem.* 2024;4(1):18–37. DOI:10.3390/biochem4010002.
12. Sivaramakrishnan M, Sivapathasundharam B, Jananni M. Evaluation of lactate dehydrogenase enzyme activity in saliva and serum of oral sub-mucous fibrosis patients. *J Oral Pathol Med.* 2015;44(6):449-52. DOI: 10.1111/jop.12246.
13. Granchi C, Roy S, Giacomelli C, Macchia M, Tuccinardi T, Martinelli A, Lanza M, Betti L, Giannaccini G, Lucacchini A, Funel N, León LG, Giovannetti E, Peters GJ, Palchaudhuri R, Calvaresi EC, Hergenrother PJ, Minutolo F. Discovery of N-hydroxyindole-based inhibitors of human lactate dehydrogenase isoform A (LDH-A) as starvation agents against cancer cells. *J Med Chem.* 2011;54(6):1599-612. DOI: 10.1021/jm101007q.
14. Mohajertehran F, Ayatollahi H, Jafarian AH, Khazaeni K, Soukhtanloo M, Shakeri MT, Mohtasham N. Overexpression of Lactate Dehydrogenase in the Saliva and Tissues of Patients with Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Rep Biochem Mol Biol.* 2019;7(2):142-149. URL: <https://rbmb.net/article-1-224-en.pdf>
15. Ren X, Feng C, Wang Y, Chen P, Wang S, Wang J, Cao H, Li Y, Ji M, Hou P. SLC39A10 promotes malignant phenotypes of gastric cancer cells by activating the CK2-mediated MAPK/ERK and PI3K/AKT pathways. *Exp Mol Med.* 2023;55(8):1757-1769. DOI: 10.1038/s12276-023-01062-5.