

Glucose metabolism in cancer and the role of ketogenic diet

D. Lisii, O. Tagadiuc, *V. Sardari

Department of Biochemistry and Clinical Biochemistry
Nicolae Testemitsanu State University of Medicine and Pharmacy, Chisinau, the Republic of Moldova

*Corresponding author: veronica.sardari@usmf.md. Manuscript received January 13, 2015; accepted April 02, 2015

Abstract

Background: One of the fundamental metabolic characteristics of cancer tissues is high consumption of glucose by cancer cells. The purpose of this article is determination of the features in the energy metabolism of cancer cells, elucidation of energy metabolism due to the major nutritive substrates, such as glucose and glutamine, evaluation of lactate dehydrogenase (LDH) as a potential marker of malignancies, estimation of the ketogenic diet in the treatment of cancer. The cells with higher degree of proliferation have a lower level of reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NADH), confirming the hypothesis: anabolic processes are predominant in cancer. The preferred way of glucose utilization in cancer tissues is the conversion of pyruvate to lactate, a phenomenon known as aerobic glycolysis or Warburg effect. Tumors with a high level of aerobic glycolysis are the most aggressive. The fact that LDHA (which catalyzes the reversible reaction of pyruvate to lactate) reflects the aggressiveness of the tumor and demonstrates the importance of aerobic glycolytic metabolism (the Warburg effect) in the survival of tumor cells.

Conclusions: Multiple studies have mentioned the possibility of using glutamine instead of glucose by the cancer cells. Use of glutamine is another way of generating energy contributing to tumor cell survival. It was established that on substitution of glucose with ketone bodies (ketogenic diet), cancer cells can not adapt and die. Modulation of energy metabolism represents a new stage in the treatment of cancer. The substitution of glucose with lipids in the feed ration (ketogenic diet) is a non-toxic method of cancer management, both in prevention and treatment.

Key words: cancer, aerobic glycolysis, lactate dehydrogenase, the Warburg effect, ketogenic diet.

Metabolismul glucozei în cancer și rolul dietei cetogene

Introducere

În Republica Moldova, ca și în majoritatea țărilor europene, incidența cancerului este într-o ascensiune continuă. Ca și cauză a mortalității, cancerul ocupă locul doi, după afecțiunile

cardiovasculare și locul trei după cauzele de invaliditate [22]. Cancerul pulmonar se plasează pe primul loc după numărul de decese din toate tipurile de cancer. Incidența cancerului pulmonar este de 34,8 pentru bărbați și 5,5 pentru femei la

100 000. Cancerul glandei mamare ocupă primul loc în structura morbidității cancerului la populația feminină (31-36%). Incidența cancerului gastric este 9-17 la 100 000 la bărbați și 5-6 la 100 000 la femei, iar cel colorectal are o frecvență de 7% la populația masculină și 5,2% – printre femei, în timp ce cancerul vezicii biliare reprezintă 1,3% și 5,2%, respectiv. În structura morbidității prin tumori maligne, la copii predomină 3 localizări de bază: hemoblastozele – 43,7%, tumorile țesuturilor moi și oaselor – 20,3% și afecțiunile tumorale ale creierului – 14,9%. Morbiditatea înaltă a cancerului este determinată atât de originea lui multifactorială, cât și de diagnosticul tardiv în lipsa unui tratament adecvat.

Cancerul este definit ca o categorie de boli caracterizate printr-o diviziune necontrolată și eronată a celulelor și capacitatea acestor celule de a invada alte țesuturi din organism, fie prin creștere directă în țesuturi adiacente (invazie) sau prin migrația celulelor spre locuri mai îndepărtate în organism (metastazie). Creșterea este cauzată de anomalități în structura DNA, cum ar fi mutații ale genelor care controlează hiperplazia celulelor. Frecvent, una sau mai multe astfel de mutații pot duce la diviziunea și înmulțirea neregulată a celulelor și geneza unor tumori.

În prezent, problema primordială în oncologie este stabilirea cu mai multă precizie a pronosticului pacienților afectați de cancer și de a propune, dacă este posibil, un tratament stabilit în mod individual pentru pacient în dependență de tipul și caracteristicile de invazivitate ale tumorii, cât și de receptivitatea față de tratamentul propus [32].

Una din caracteristicile metabolice fundamentale ale țesuturilor canceroase este consumul ridicat de glucoză. Rata consumului de glucoză într-o celulă de cancer poate fi mai mare de 10-15 ori decât în celulele normale. Izolarea și cultivarea celulelor tumorale *in vitro* pun în evidență proprietăți, care se asociază cu utilizarea intensivă de glucoză și prezența unui metabolism oxidativ minim, exprimând o creștere a concentrațiilor de lactat în mediul de cultură și o rată redusă a consumului de oxigen [2]. În pofida faptului că glicoliza este sugerată drept o particularitate generală a celulelor maligne și recent identificată ca un posibil factor de contribuție la progresia tumorală [35], mai multe studii pun în evidență caracteristicile metabolice distincte în cazul unor tumori, inclusiv o scădere relativă a avidității față de glucoză sau/și o dependență de glutamină și chiar de lactatul celulelor tumorale proliferative.

Aplicarea tratamentului prin inhibiția metabolismului glicolitic va implica și *screening*-ul de rutină în profilul tumoral. În acest context, prezintă un mare interes elaborarea unor programe de diagnostic, de tratament, de optimizare a modificărilor metabolice caracteristice cancerului, de monitorizare a pacienților.

Scopul a constat în determinarea particularităților în metabolismul energetic al celulelor canceroase, elucidarea metabolismului energetic în funcție de substraturile nutritive principale, cum ar fi glucoza și glutamina, evaluarea lactat dehidrogenazei (LDH) ca marker potențial al malignizării, estimarea dietei cetogene în tratamentul cancerului.

Tumorile maligne sunt caracterizate printr-un metabolism

creșcut, fapt care condiționează o creștere rapidă determinată nu numai de sinteza compușilor membranari și a acizilor ribonucleici, dar și de generarea intensă a energiei. Metabolismul energetic tumoral reprezintă o caracteristică comună pentru toate tipurile de celule canceroase, de la stadiile precoce de transformare până la invazia tumorală și metastaze, atât *in vitro*, precum și *in vivo*.

Metabolismul intens al glucozei este util în detectarea metastazelor tumorale, a nodurilor limfatici metastazați primar în proximitate sau la distanță de focar, în evaluarea sensibilității la tratamentul prin radiochimioterapie, în depistarea recidivelor tumorale [9]. Metabolismul energetic și, în special, cel al glucozei, depinde de mai mulți factori, atât genetici care vor dicta gradul și tipul de expresie a principalelor enzime implicate în glicoliză, cât și de factori externi, precum concentrația glucozei în mediul extracelular.

Celulele cu grad de proliferare mai înalt au un nivel de NADH mai redus, fapt care confirmă că procesele anabolice sunt predominante în cancer și cantitatea de energie generată este suficientă pentru menținerea gradientilor de ioni transmembranari, sintezei de macromolecule, contracararea stresului oxidativ sau susținerea altor procese energetic dependente [18]. NADH este un echivalent energetic, produs preponderent din activitatea enzimatică a dehidrogenazelor glicolizei aerobe. În cazul în care nivelul oxigenului tisular este scăzut, în special, în tumorile cu un înalt grad de proliferare, fenomenul hipoxiei și al vascularizării imperfecte determină tranziția spre metabolismul energetic predominant glicolitic.

Glucoza oxidată în celule provine fie din degradarea glicogenului propriu, fie din sângele care perfuzează țesutul respectiv. Celulele canceroase continuă să producă până la 80% de ATP în procesul glicolizei, un fenomen care are loc în prezența oxigenului, spre deosebire de celulele proliferante care sunt în stare de hipoxie [40].

Acest fenomen persistent, caracterizat drept o marcă a metabolismului celulelor canceroase a fost descris pentru prima dată de către Otto Warburg, laureat al Premiului Nobel pentru descoperirea proceselor-cheie ale lanțului respirator. Otto Warburg a încercat să explice fenomenul glicolizei aerobe prin apariția disfuncțiilor mitocondriale. Savantul consideră că nașterea celulelor canceroase din celule normale se caracterizează prin două faze:

Prima – apariția daunelor ireversibile în procesul respirației.

A doua – substituirea respirației prin fermentare (Otto Warburg, 1956) [31].

Factorii ce duc la dereglarea respirației tisulare sunt: substanțele cancerigene, radiația, hypoxia, inflamațiile, virusii, mutațiile, oncogenele, vârsta. În rezultat are loc reducerea numărului de mitocondrii, cristoliză, dereglarea proceselor de fosforilare oxidativă.

Insuficiența de energie este compensată prin procesul de fermentare, doar celula posedând capacitatea de fermentare devenind celulă cancerigenă, fiindcă aceasta este unica sursă de dobândire a energiei necesare pentru activitatea pompei Na/K.

Ipoteza unei implicări cauzale a disfuncției mitocondriale

(fig. 1) și glicolizei (fig. 2) în procesul de oncogeneză a fost abandonată ulterior în favoarea teoriei genetice de apariție a cancerului în urma implicării mutațiilor genetice și, în special, a genelor supresoare tumorale. Biologia mitocondriilor și glicoliza aerobă sau fenomenul Warburg revine în vizorul cercetărilor din domeniu odată cu antrenarea mitocondriilor în procesul de apoptoză sau de moarte programată celulară [20, 31].

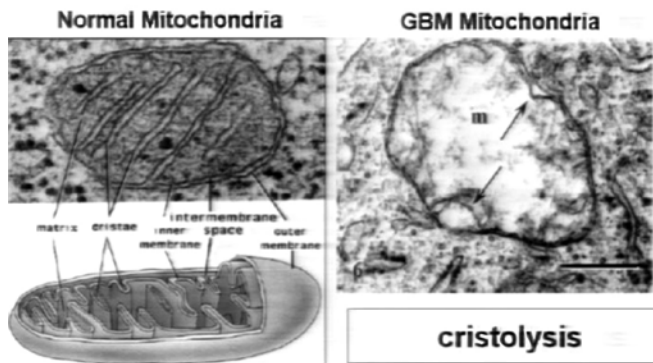


Fig. 1. Mitocondriile intacte (stânga) și alterate (cristoliza) [31].

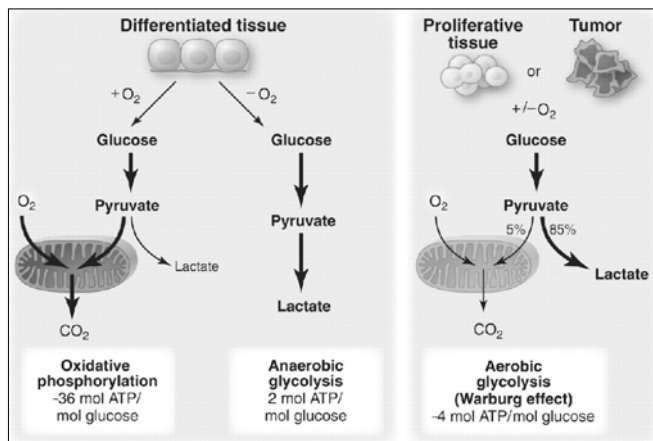


Fig. 2. Calea preferată de utilizare a glucozei în cancer și țesuturi care proliferază este transformarea piruvatului spre lactat, fenomen denumit glicoliza aerobă sau efectul Warburg [38].

Nu se cunoaște pe deplin rolul pe care îl deține efectul Warburg în progresia tumorală. A fost menționat rolul de adaptare la o deficiență de substrat energetic într-o populație de celule care proliferază rapid [10]. Una dintre cauze este, de asemenea, lipsa rețelei vasculare sau a unei angiogeneze, care ar putea satisface necesitățile rapide de creștere a tumorii. S-a stipulat, de asemenea, capacitatea de difuziune a glucozei mult mai înaltă decât cea a oxigenului în țesuturi ca o posibilă cauză de trecere de la metabolismul oxidativ la cel glicolitic. De asemenea, rolul de acidifiere prin generarea de lactat a glicolizei intensive ar putea avea un efect toxic asupra celulelor normale, marcând efectul invaziv al tumorii în expansiune.

Actualmente, inhibiția apoptozei este unul dintre semnele distinctive ale celulelor tumorale. Apoptoza prezintă un mecanism de moarte programată a celulelor canceroase dependent de rezervele energetice ale celulei. Energetica

celulei canceroase și modul de rezistență față de tratamentele propuse a suscitat un adevărat interes în laboratoarele de cercetare modernă.

Se discută mai multe mecanisme pe care le adoptă celula tumorală pentru depășirea cerințelor de energie. Glicoliza ar fi unul dintre mecanismele importante, puse în aplicare de către țesutul tumoral, care i-ar permite să continue proliferarea în condiții de stres energetic.

Glicoliza, ca parte importantă a metabolismului cancerului, este evidențiată, în primul rând, prin absorbția ridicată de 2deoxi-D-glucoză la examenul PET-scan. Un al doilea argument, care susține ipoteza unei glicolize crescute, este amplificarea concentrației de lactat.

Metabolismul celulelor canceroase este asociat cu o producție și o secreție marcantă de lactat în țesuturile peritumorale. În țesuturile, în care absorbția glucozei nu este perturbată, nivelul sporit al lactatului ca produs final al transformării glucozei în piruvat și, ulterior, lactat în condiții anaerobe, reflectă, în primul rând, un nivel crescut al glicolizei.

Lactatul este produsul rebut al glicolizei și care, în mod normal, este absent în țesutul sănătos în condiții normoxice și satisfăcătoare de oxigenare tisulară [40, 41]. În mediul extracelular, se apreciază o acidifiere intensă care este datorată, înainte de toate, acidului lactic (lactat), reprezentând o cotă de 80% (celelalte 20% sunt rezultatul acumulării de CO_2 , generat în ciclul acizilor tricarboxilici. Unii autori atribuie acidității mediului tumoral un rol de factor agresiv în invazia tumorală [25].

În ultimii ani, în literatura de specialitate, semnul distinctiv al metabolismului energetic al tumorii, conform ipotezei cel mai des vehiculate, este predominarea metabolismului glicolitic față de cel al fosforilării oxidative [23]. Degradarea completă a glucozei la CO_2 și H_2O are loc în mitocondrii în timpul procesului numit fosforilare oxidativă, proces desfășurat doar în prezența oxigenului. Glicoliza aerobă va genera 38-36 molecule de ATP. Energia rezultată este generată în: fosforilare oxidativă (mitocondrii) – 89%, fosforilare la nivel de substrat (mitocondrii) – 5,5% și fosforilare la nivel de substrat (citosol) – 5,5%. Glicoliza anaerobă este însoțită de generarea doar a 2 molecule de ATP. Se consideră că glicoliza este modul preferențial de producție a energiei în mai multe celule, cum ar fi cele anoxice, embrionare sau cele care proliferază intens. Aparent paradoxal, chiar și în prezența oxigenului, celulele canceroase preferă să se comporte ca și cum ar avea condiții anaerobe: evită ciclul Krebs și fosforilarea oxidativă, având un randament mult diminuat, provoacă stresul energetic.

Este evident că atât în celulele normale, cât și în cele tumorale, cele din urmă fiind caracterizate printr-o proliferare nedirijată, diferite mecanisme sunt evocate pentru depășirea crizei energetice. Unele dintre mecanismele, care pot fi implicate în metabolismul celulei canceroase, sunt autofagia și angiogeneza.

Autofagia, prin exercitarea rolului său catabolic, permite reciclarea metaboliților organelor disfuncționale sau a compușilor inutili și contribuie, în același timp, la supraviețuirea celulelor tumorale [12]. Astfel, autofagia servește drept efect protector pentru celule, oferind o sursă alternativă de nutri-

enți. Cu toate acestea, pierderea genei care inițiază procesul de autofagie – beclin1 – este frecvent demonstrată în țesuturile tumorale, ceea ce paradoxal i-ar conferi un alt rol autofagiei în mecanismul de creștere tumorală asemănător cu cel al apoptozei [21].

Angiogeneza reprezintă un proces critic în dezvoltarea tumorală și este esențială pentru dezvoltarea leziunilor tumorale, care depășesc diametrul de 1 mm. Achiziția proprietăților de neoangiogenează, documentate prin aspectul histologic de apariție a microvascularizării și reprezentată, de asemenea, prin preluarea de contrast la examenul imagistic RMN (rezonanță magnetică nucleară) sau CT constituie argumentul forte de trecere a tumorii la un grad superior de malignizare. S-a stabilit, că inhibitorii receptorilor VEGFR (receptorul factorului de creștere al endoteliului vascular) cu scop de reducere a neovasculogenezei sunt utilizați în cancerul malign [25].

Factorul supresor tumoral p53, care asigură stabilitatea genomului celulei, intervine în metabolismul energetic tumoral prin stimularea fosforilării oxidative ca rezultat al hipersintezei citocrom c-oxidazei și în diminuarea ratei glicolizei grație inhibiției generării de fructozo-1,6-difosfat. Una dintre principalele enzime, legate atât de glicoliză, cât și de intensitatea fosforilării oxidative și care participă activ la integrarea metabolismului glicolitic este lactat dehidrogenaza (LDH), activitatea căreia depinde riguros de aprovizionarea cu glucoză, de disponibilitatea oxigenului și/sau de acumularea piruvatului în exces [8, 27].

Lactat dehidrogenaza (LDH) este enzima implicată în cataliza reacției de conversiune lactat – piruvat (fig. 3). Molecula LDH este compusă din 2 tipuri de subunități: subunitatea M (codată de gena *LDHA*) și cea H (codată de gena *LDHB*), ale căror combinații din 4 protomeri formează 5 tipuri de izomeri de la LDH-1 (H_4) la LDH-5 (M_4). Localizarea preponderentă a izoenzimelor LDH:

- LDH-1 (H_4) – inimă
- LDH-2 (H_3M_1) – sistem reticuloendotelial
- LDH-3 (H_2M_2) – plămâni
- LDH-4 (HM_3) – rinichi, placentă și pancreas
- LDH-5 (M_4) – ficat și mușchiul striat

Subunitatea M este localizată în cromozomul 11p15.4, pe când subunitatea H – în cromozomul 12p12.2-p12.1.

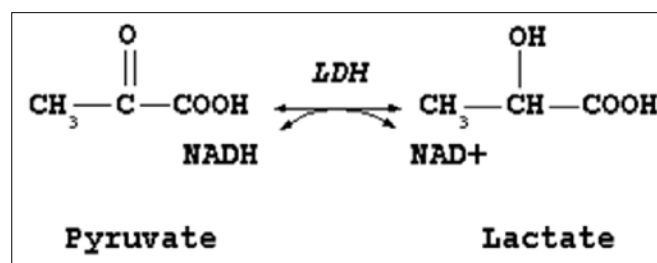


Fig. 3. Reacția reversibilă catalizată de lactat dehidrogenază (LDH).

Potrivit raportului de compoziție, dintre cele 2 subunități într-un tetramer și cele 5 izoenzime *in vivo*, activitatea LDH totale este caracterizată prin proprietăți fizice și catalitice distincte, izoenzimele M_4 și M_3H_1 preferențial reduc piruvatul

la lactat în țesuturile anaerobe, cum ar fi mușchiul striat și ficatul, iar izoenzimele H_4 și H_3M_1 vor oxida lactatul în piruvat în țesuturile aerobe (de exemplu, inima) [40].

Mai multe studii au subliniat faptul că izoenzimele LDH ar putea servi drept indicator biochimic în acidificarea mediului tumoral, ceea ce caracterizează gradul de hipoxie intratumorală și, în consecință, ar prezenta un indice forte al malignizării [9, 11, 40, 41]. Tumorile cu nivel ridicat de proteine c-Myc sunt asociate cu expresia selectivă a *LDH-A* RNA și cu creșterea nivelului enzimatic al acestei subunități, în comparație cu celulele limfoblastoide netransformate, demonstrând că LDH este o țintă directă a factorilor oncogenici de transcripție [34]. Atât nivelurile crescute de LDH serică, cât și expresia unor izoforme de LDH, în special, a subunităților LDHA ar putea indica tendința spre malignizare a tumorii [33].

S-a invocat posibilitatea utilizării nivelului de lactat din sânge, pentru a determina gradul de agresivitate a tumorii, constituind premise pentru o clasificare metabolică a tumorilor de tip variat deja la începutul transformării maligne [25]. Într-o serie de tumori, cum ar fi cancerul la cap și la gât, nivelul crescut de lactat constituie un factor predictiv al metastazelor [24]. Mai multe studii au evaluat capacitatea de acidifiere a mediului de creștere a celulelor tumorale și au demonstrat o corelare semnificativă a acestui indice cu gradul de disfuncție a metabolismului oxidativ mitocondrial [37]. Există o legătură strânsă între fenotipul tumoral, agresivitatea tumorală și nivelul de lactat. Astfel, atât inhibiția expresiei de LDHA, cât și inhibiția activității acesteia a dus la regresivitatea limfomului și a grefonului de cancer pancreatic în model experimental [3].

Faptul că LDHA reflectă agresivitatea tumorală, demonstrează importanța metabolismului glicolitic aerob (efectul Warburg) în supraviețuirea celulelor tumorale [15]. În mod contrar, gena LDHB a fost implicată în alte tipuri de cancer distincte metabolic de cele cu un grad înalt de malignizare și cu un nivel ridicat al glicolizei, pentru care un tratament inhibitor cu anti-LDHA nu ar fi dat rezultate [38]. Toate acestea generează un *screening* riguros al markerilor metabolici pentru o definiție mai exactă a tipului de metabolism energetic, de care celula este potențial dependentă.

Lactat dehidrogenaza de tipul A este indispensabilă desfășurării glicolizei în condițiile anaerobe sau în condițiile unui efect Warburg, deoarece conversia piruvatului în lactat permite regenerarea cantității de NAD^+ necesare pentru reacția de transformare a gliceraldehid-3-fosfatului în 1,3 bisfosfoglicerat.

Creșterea ratei de consum a glucozei în unele tumori, evidențiată prin asimilarea și prin retenția F-2DG (fluoro-2-deoxi-glucoză) a fost corelată cu rata secreției de lactat, determinată prin spectroscopie RMN, *in vitro* și *in vivo* [36]. În mod similar, dar indirect, un nivel crescut al izoenzimei de tipul LDHA, a cărei activitate este soldată cu producția de lactat, a fost depistat în spațiul intercelular și în circuitul de sânge la pacienții cu tumori maligne. Astfel, ambii factori – izoenzima de tip LDHA și cantitatea de lactat – au corelat cu forme mai agresive de cancer determinate histologic și cu un prognostic clinic defavorabil [6, 35, 17].

Valoarea nivelului glicolizei în hipoxie este dependentă de

producția de lactat, care este donatorul de protoni în reacția de conversiune din piruvat în lactat și asigură, astfel, regenerarea NAD^+ . Nivelul de lactat poate fi ușor monitorizat prin MRS (spectroscopia prin rezonanță magnetică) și va reflecta în mod indirect nivelul hipoxiei tisulare [2]. Evaluarea directă a oxigenului este o procedură invazivă și rareori utilizată în practica medicală de rutină. LDH și, mai ales, expresia LDHA prin metoda imunohistochimică, cât și expresia subunității beta-ATPaza reprezintă o altă modalitate în aprecierea preponderenței fluxului glicolitic și, în consecință, în diminuarea activității metabolismului oxidativ și este utilizată ca marker al agresivității tumorale [4].

Stresul energetic este un fenomen aproape constant în cancer. La mamifere, celulele își mențin un echilibru energetic pozitiv și stabil caracterizat printr-un raport de ATP/ADP relativ mare (raportul 10/1). Unii factori din mediu pot perturba echilibrul energetic, cu micșorarea nivelului de ATP. Celulele canceroase, a căror creștere este caracterizată prin proliferarea necontrolată, asociată unui proces de angiogeneză imperfect, sunt adesea supuse stresului metabolic și celui energetic ca răspuns la deficiențele de substanțe nutritive [14].

Echilibrul energetic este unul dintre procesele fundamentale ale organismului. Un rol-cheie în reglarea metabolismului energetic îl are enzima adenozin monofosfat kinaza activă (AMPK). Enzima respectivă este activată de o serie de factori patologici legați de stresul celular, printre care un rol deosebit îl deține deprivarea de glucoză, hipoxia, stresul oxidativ sau diverși hormoni. Drept rezultat, AMPK activează căile de producere a energiei, cum ar fi glicoliza, oxidarea lipidelor, glutaminoliza și inhibă căile de consum al energiei: gluconeogeneza, lipogeneza. Stresul metabolic duce la epuizarea de ATP și la creșterea în AMP; altfel spus, raportul AMP/ATP este reglatorul principal al activității AMPK.

O enzimă cu rol de activare a AMPK este și LKB1 (STK11 serin-treonin kinază 11, cunoscută ca *liver kinase B₁* – kinaza hepatică B₁). Gena *LKB1* este considerată supresor tumoral, constituent activ și funcțional în celule, ale cărei mutații sunt asociate cu sindromul Peutz-Jegher și cu o multitudine de tumori. Pacienții cu sindrom Peutz-Jegher se confruntă cu un risc sporit de a dezvolta diverse malignități epiteliale în urma unor ușoare lovituri. În cancerul sporadic pulmonar, fără celule mici, mutațiile LKB1 sunt depistate în aproape 50% cazuri, dintre care jumătate de pacienți sunt sau au fost fumători. Rolul acestor mutații în transformarea tumorală pare să fie de o importanță majoră, deoarece sunt implicate și depistate precoce în hiperplaziile pulmonare atipice adenomatoase [11].

Tandemul LKB1-AMPK reprezintă senzorul energetic al celulei, reacționând la semnalele generate de schimbarea stării energetice a celulei [9]. AMPK activează funcțiile de oxidare în mitocondrii și, prin urmare, crește rata consumului de oxigen, activează citrat sintaza, induce gene metabolice cheie: carnitin palmitoiltransferaza 1A (responsabilă de transportul acizilor grași prin membrana mitocondrială în procesul de beta-oxidare), citocromul c (CYTC), izocitrat dehidrogenaza 3 (IDH 3) – enzimă cu rol reglator în ciclul acizilor tricarboxilici. AMPK controlează și procesele relevante în dezvoltarea tumorii precum progresia ciclului celular, sinteza proteinelor și supraviețuirea celulară [34].

În condiții de deprivare de glucoză, AMPK activează prin fosforilare proteina supresoare tumorală p53, aceasta din urmă va dispune oprirea ciclului celular în faza G1-S. Altă cale importantă de semnalizare, deseori activată în cancer, este calea PI3-AKT, pe care AMPK o inhibă prin complexul mTORC1 sau prin fosforilarea reziduurilor de serină pe TSC2 (gena sau proteina sclerozei tuberoase, o alta genă supresoare de tumori, diferită de calea AKT).

AMPK suprimă proliferarea celulară prin inhibiția semnalizării mTOR și prin reactivarea axei p53-p21 [19]. Celulele normale își adaptează metabolismul la schimbările, care au loc în mediul exterior.

Una dintre enzimele-cheie, implicate în reglarea glicolizei, a cărei expresie este semnificativ crescută în celulele canceroase, este hexokinaza de tipul II [44]. Această enzimă este asociată la nivel de membrană mitocondrială cu VDAC receptorii (canal ionic voltaj dependent, care participă la sinteza ATP), fapt care îi permite să recruteze cu ușurință cantitatea necesară de ATP pentru reacția de fosforilare a glucozei în glucozo-6-fosfat. Proprietatea expusă este esențială, demonstrând în mod clar colaborarea între complexe enzimatice în celulă. De asemenea, ea servește drept confirmare pentru faptul că *in vivo* hexokinaza de tipul II este mai activă decât hexokinaza de tipul I; în condiții egale *in vitro* fiind demonstrat contrariul.

Posibilitatea blocării glicolizei prin 2-DG (2-Dezoxi-2-Dglucoza), care se leagă ireversibil de hexokinază, este una dintre posibilitățile de a exploata metabolismul excesiv al glucozei în celulele tumorale, evocat de unii autori, care au observat o descreștere tumorală după examenul imagistic al PET-scan (tomografie cu emisie de pozitroni). Compusul 2dezoxi-D-glucoza este un antimetabolit și reprezintă o glucoză, a cărei grupă 2-hidroxil este înlocuită cu hidrogen, din care rezultă o acțiune de inhibiție competitivă cu glucoza asupra enzimei hexokinaza. Astfel, captarea 2dezoxi-D-glucozei reflectă activitatea hexokinazei, enzimă care inițiază glicoliza și, deci, exprimă nivelul ei, în special în celulele consumatoare și dependente de glucoză (cu excepția ficatului și a rinichilor).

Prin inhibiția hexokinazei, compusul 2DG este considerat un antimetabolit, în special în celulele dependente de glicoliză, precum este și cancerul. Acest efect este uneori evocat pe lângă cel de bază de vizualizare a tumorilor și a metastazelor la captarea 2DG, marcată cu fluor radioactiv în PET-scan.

Sinteza precursorilor de acizi dezoxiribonucleici și regenerarea echivalentelor reductoare sunt cele două funcții esențiale, pe care le asigură ciclul pentozofosfat în celulele, care proliferază rapid. În prima etapă de oxidare a glucozo-6-fosfatului, sub controlul enzimei-cheie glucozo-6-fosfat dehidrogenaza (G-6-PDH) sunt generate două molecule de NADPH. Ulterior, în faza nonoxidativă, în urma unei serii de izomerizare sau reorganizare, este produsă ribozo-5-fosfat, necesară pentru sinteza ADN-ului și ARN-ului. Expresia atât a transcetolazei de tipul I, cât și a G-6-PDH este semnificativ crescută în cancer și a fost corelată cu intensitatea invaziei tumorale, gradul de malignitate și un prognostic nefavorabil [26].

O enzimă cu o activitate diversă, dar cu un rol foarte important, cum ar fi aldehyd-dehidrogenaza, s-a dovedit a fi, atât un marker al celulelor imature de diferențiere astrocitară din

sistemul nervos central, cât și un marker de prognostic. În ceea ce se referă la capacitatea de a determina evoluția tumorală la pacienții cu tumori ale sistemului nervos central, rolul aldehyd-dehidrogenazei este incert, invocat drept un factor de prognostic favorabil de către unii [1] sau nefavorabil – de către alții [13].

Funcția primară, atribuită kinazei 3β glicogen sintazei, este reglarea negativă a sintezei glicogenului prin fosforilarea și inactivarea glicogen sintazei. În același timp, studii recente au descoperit implicarea kinazei 3β glicogen sintazei în căile de reglare a principalelor funcții celulare cum ar fi: proliferarea, diferențierea, migrarea și supraviețuirea celulelor. Unul dintre principalii reglatori ai kinazei 3β glicogen sintazei este calea clasică a cascadei MAPK (proteinkinaza activată de mitogeni), cu o acțiune inhibitoare prin fosforilarea Ser39 [5]. De asemenea, kinaza 3β glicogen sintazei posedă funcția de proteină supresoare în calea Wnt de semnalizare. Aceasta deține un rol esențial în dezvoltarea embrionară și în progresia cancerului. Beta-catenina din calea Wnt de semnalizare, în absența kinazei 3β glicogen sintazei nu mai poate fi marcată prin ubiquitină, ceea ce duce la acumularea și, în final, la transportul acesteia în nucleu, pentru a acționa pe genele țintă cum ar fi oncoproteina, prin acest mecanism – kinaza 3β glicogen sintazei este considerată ca proteină supresoare tumorală [43]. În realitate, rolul exact al acestei proteine nu se cunoaște pe deplin din cauza modelelor diferite tumorale.

Modificările genetice constitutive determină în celulele canceroase expresia predominantă a echipamentului enzimatic specific căii glicolitice și, în paralel, a reducerii căii oxidativ mitocondriale. Aceste mecanisme genetice nu sunt totuși reductorii, dar oferă o oarecare capacitate de readaptare. Astfel, unele studii au reușit să identifice mecanisme de adaptare a celulelor canceroase la disponibilitatea substratului din mediu, demonstrând pe baza liniei celulelor transformate HeLas o trecere forțată de producere a NADH din cel glicolitic în mod exclusiv glutaminolitic [7].

Mai multe studii au evocat posibilitatea utilizării glutaminei în loc de glucoză de către celulele canceroase, fenomen care ar putea explica rezistența cancerului la administrarea antimetaboliților cum ar fi 2DG, utilizat atât în scop de diagnosticare, cât și de inhibiție a creșterii tumorale [8, 33].

Glutamina (Gln) deține un rol important în mai multe funcții biochimice: este unul dintre cei 20 de aminoacizi proteinogeni, este un reglator al echilibrului acido-bazic în rinichi prin producerea de amoniu; ca sursă de energie pentru celulă are o valoare mai mică, o moleculă de Gln generează 24 de molecule de ATP; se consideră un donator cardinal al grupei amino (NH_2) pentru procesele anabolice și altele. Din aceleași motive și având o concentrație de 500-900 $\mu\text{mol/L}$, glutamina este considerată aminoacidul cel mai abundent din sânge. În mediile de cultură ale celulelor stem, pentru asigurarea proliferării celulare, glutamina se găsește în concentrații relativ mari, în medie de 2 mmol/L .

Constituind sursa principală de azot și de carbon, glutamina este indispensabilă celulelor intens proliferante și, în consecință, viabilității celulelor tumorale. Efectul de retardare a creșterii în modelele de tumori experimentale din

care glutamina a fost sustrasă, demonstrează acest fapt [19]. Deoarece atât glucoza, cât și glutamina participă la sinteza de hexozamine, dintre care N-acetilglucozamina, această etapă deține un rol important în modificările posttranslaționale ale proteinelor și este una de integrare a metabolismului glucozei cu cel proteic [9].

În procesul numit anaplerotic, glutamina furnizează scheletul de carbon ciclului acizilor tricarboxilici, transformându-se în glutamat și apoi α -cetoglutarat. Astfel, când o mare parte din intermediari sunt deviați pentru sinteza de lipide în celulele tumorale, funcția anaplerotică este menținută în cea mai mare parte de glutamină [11].

Toate argumentele aduse susțin și ipoteza avantajului energetic prin aportul crescut al glutaminei în celulele canceroase. Implicarea glutaminei în metabolismul energetic tumoral a fost evaluată chiar de la primele cercetări ale dependenței tumorale de nutrienți energetici, surprinzător stabilind faptul că glutamina deține rolul principal, depășindu-l chiar pe cel al glucozei [25, 30]. Ulterior, acest aspect, dar și alte funcții ale glutaminei au motivat utilizarea ei ca marker metabolic în imagistica tumorală, în special cea a radiodiagnosticului prin PET-scan în completare sau chiar spre a substitui ^{18}F -2DG PET [16]. Prin astfel de metode, ar fi posibilă depistarea celulelor canceroase cu un nivel sporit al metabolismului glutaminei și, în consecință, de elaborat un plan strategic al tratamentului, care ar viza aceste particularități metabolice.

Implicarea glutaminei în metabolismul energetic al celulei tumorale a fost invocată în repetate rânduri, atribuindu-i un rol de supraviețuire în cazul în care concentrația glucozei în țesuturi este insuficientă. Metabolismul preponderent glutaminic n-a fost însă demonstrat decât în câteva studii [24, 3]. Absența argumentelor pentru un metabolism crescut al glucozei la utilizarea metodelor imagistice ar fi putut sugera o posibilă afinitate față de glutamină în aceste tumori. În schema de mai jos este reprezentată calea glutaminolizei, unde glutamina este metabolizată până la intermediarul ciclului Krebs – α -cetoglutarat și transformată la final în lactat.

Glutamina nu este doar o sursă de carbon și de azot din procesul anabolic, dar și o cale de generare a energiei, contribuind la supraviețuirea celulelor tumorale în mod analogic cu cel al glicolizei. Rolul glutaminei ca sursă alternativă de energie poate fi reprezentat schematic prin figurile 4 și 5.

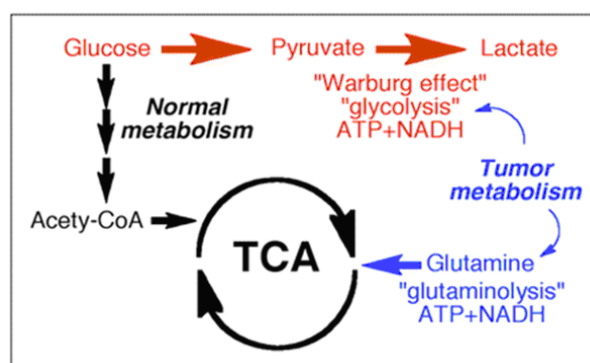


Fig. 5. Glutamina ca sursă alternativă de generare a energiei în tumori. Schema reprezintă rolul glutaminei în metabolismul energetic tumoral [25].

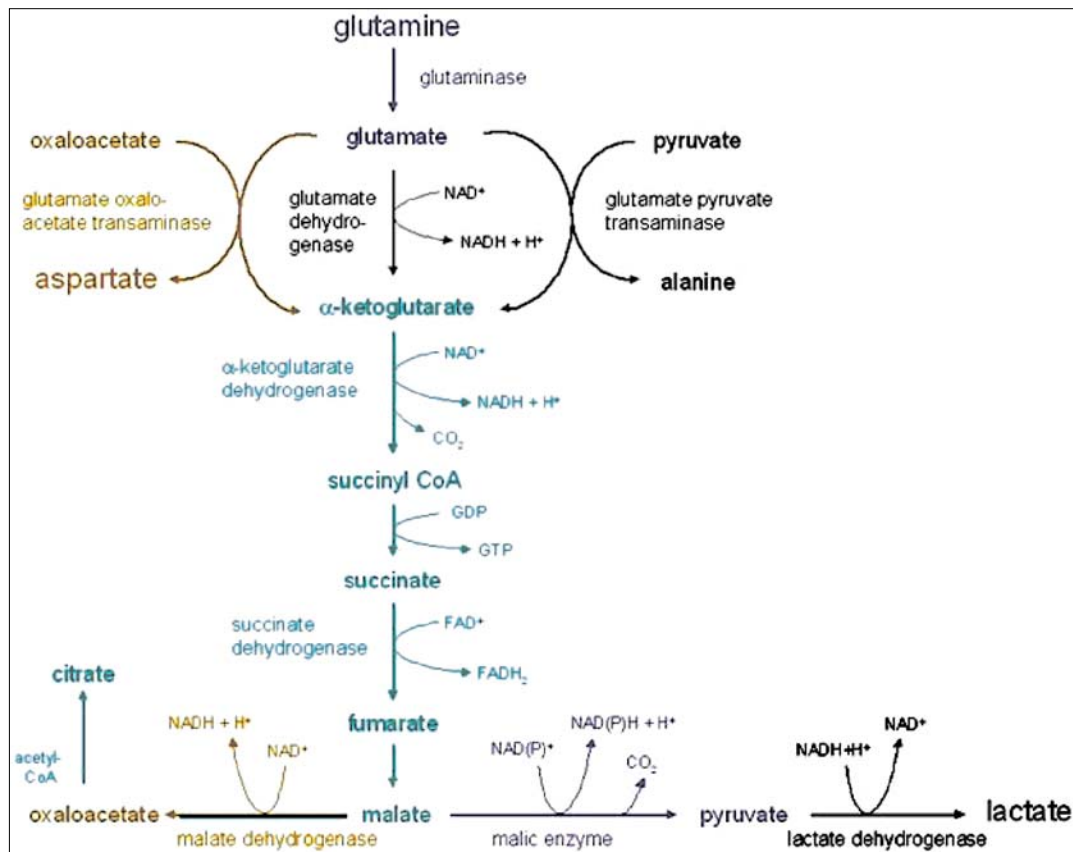


Fig. 4. Glutaminoliza: cale de producere a energiei. În culori albastre este reprezentată calea glutaminolizei, determinând glutamina să intre în ciclul Krebs prin α -cetoglutarat; în culori oranj este reprezentat sistemul navetă malat-aspartat [25].

Principalele direcții ale oncogenezei, care implică metabolismul energetic, includ și studiul căilor de semnalizare cu un rol major în geneza tumorală. În mod frecvent, se atestă căile Myc, Akt și factori cum ar fi *HIF* (factorul indus de hipoxie), cu implicare în reglarea glicolizei prin creșterea expresiei unor enzime cum ar fi: hexokinaza; piruvat kinaza; kinaza piruvat dehidrogenaza; dar și unele izoforme de transportatori din familia celor transmembranari *GLUT* [42].

Proteina Myc aparține unei familii de factori de transcripție care include, de asemenea, genele N-Myc și L-Myc. Această genă suportă deseori mutații în patologii proliferative și tumorale, fiind descoperită pentru prima dată în limfomul Burkitt. Myc este constitutiv activă în multe tipuri de cancer sau activată sub acțiunea căilor de semnalizare frecvent atestate în procesele tumorale, cum este calea Wnt și EGF. Astfel, se consideră că dereglarea căii Myc are loc în peste 40% de tumori, inclusiv tumorile de colon, prostată și vezică urinară [36].

S-a demonstrat că Myc și HIF sunt reglatori ai metabolismului glucozei, efectului Warburg, favorizând expresia transportorilor GLUT 1, a enzimelor HK2, PKM2 și a LDHA. În egală măsură, Myc este responsabil și de stimularea metabolismului glutaminei, prin reglarea transportorilor SLC1A5 și a glutaminazei (GLS) [6]. Este de remarcat faptul că liniile de celule umane, în care Myc este în exces exprimat, s-au dovedit a fi dependente de glutamină, astfel încât sustragerea glutaminei din mediu a declanșat apoptoza [35].

Chiar dacă metabolismul glutaminei și al glucozei pare să fie reglat de aceleași căi de semnalizare cum ar fi Myc, metabolismul preferențial în fiecare dintre linii este selectiv reglat și predeterminat genetic (fig. 6).

Factorii limitanți ai metabolismului glucidic sunt, în primul rând, transportorii glucozei (*GLUT*), o familie de glicoproteine transmembranare codificate de diferite gene. Aceste molecule asigură traversarea glucozei prin membrana celulară fără consum de energie. Fixarea glucozei pe fața extracelulară a membranei determină o modificare conformațională a proteinei transportatoare, facilitând trecerea și eliberarea glucozei în interiorul celulei. Expresia transportatorilor este dependentă de țesut și se deosebesc între ei prin afinitatea față de glucoză, exprimată prin constanta lui Michaelis (K_m). Glucoza este substratul nutritiv preferat în țesuturi cum ar fi creierul, inima, eritrocitele, precum și în celulele de regenerare în căile de proliferare. Concentrația de glucoză din plasmă este de ordinul a 0,8 g sau 3,3-5,5 mmol/L.

Expresia crescută de GLUT 1 corelează în mod direct cu captarea 2FDG (fluoro-2-dezoxi-D-glucoză), care este un analog al glucozei la examenul clinic prin PET-scan. Ambii factori – GLUT 1 și 2FDG – reprezintă un indice de prognostic important în cancerul pulmonar și în cel de colon [39]. HIF-1 α (factorul inductibil al hipoxiei) participă la expresia GLUT 1 și 3, măbind accesul glucozei în celulele stem canceroase [16]. MCT (transportorii monocarboxilați) transportă

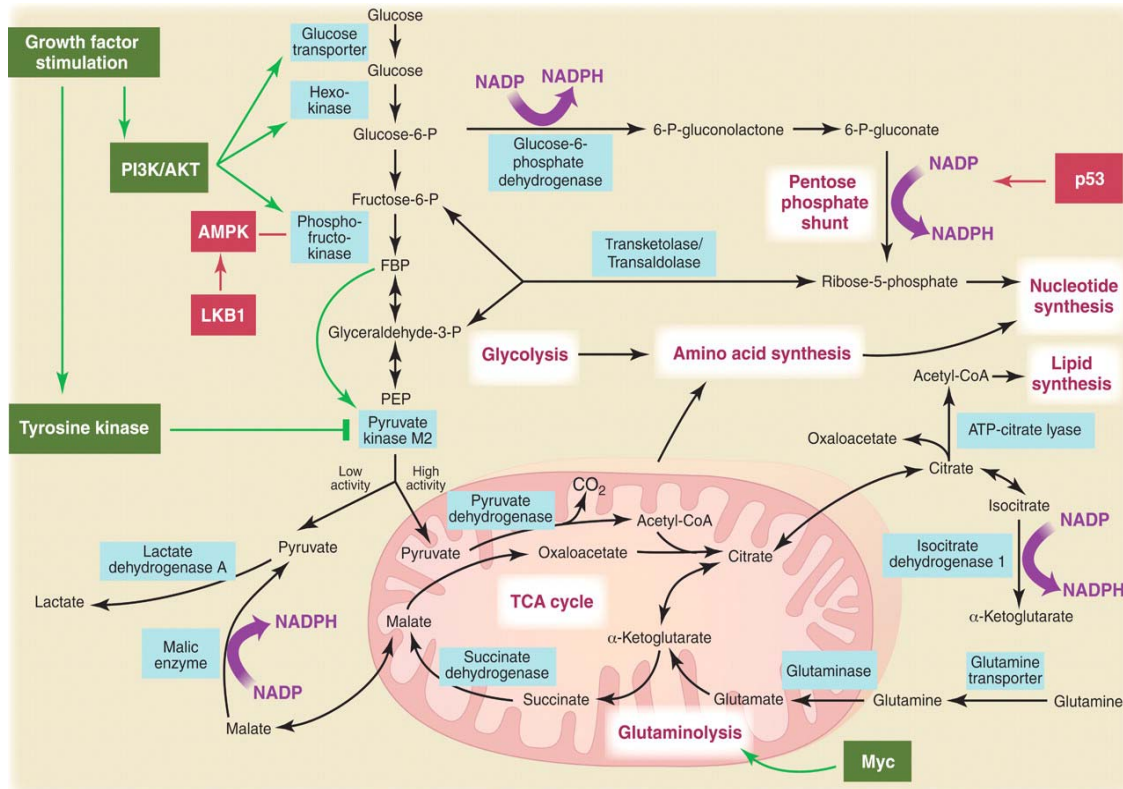


Fig. 6. Mutații ale oncogenelor și implicarea lor în reglarea glicolizei [44].

monocarboxilații cum ar fi piruvatul și lactatul, facilitând traversarea membranei plasmatică, dar și a celei mitocondriale, ca în cazul de MCT1 sau MCT2; MCT1 este omniprezent, în timp ce MCT4 se găsește în cea mai mare parte în celulele musculare sau în celule metabolice active, inclusiv tumori. MCT2 este în cea mai mare parte depistat în rinichi, neuroni și spermatozoizi, în cazul în care este necesară absorbția rapidă a concentrațiilor scăzute a substraturilor. Toți acești factori enumerați anterior dețin un rol important în celulele care proliferază intens, inclusiv celulele maligne. Expresia acestor enzime și transportatori ai glucozei este corelată cu gradul de malignitate și poate servi drept marker biologic în clinica tumorală.

Modularea metabolismului energetic reprezintă o nouă etapă în tratamentul cancerului. Caracterizarea minuțioasă a metabolismului energetic al celulelor tumorale ar putea genera noi oportunități în modularea căilor de generare a energiei. Dependența celulelor canceroase de glucoză, posibilitatea utilizării glutaminei în procesele energetice, inhibiția metabolismului oxidativ, toate sunt particularități ale metabolismului tumoral care pot fi ținta unui tratament selectiv, de bază și adjuvant.

Celula cancerigenă nu are capacitatea de a se adapta la o sursă alternativă de energie. S-a stabilit că la substituirea glucozei cu corpuri cetonice, adică la dieta bogată în lipide (dieta ceto-genă), celula canceroasă nu se poate adapta și moare (tab. 1).

Experienței au fost supuși șoricicii. După trei zile, s-a observat că tumoarea cerebrală s-a redus, fapt care demonstrează că metoda este eficientă. S-a constatat dependența direct proporțională a masei tumorale de glucoză. La utilizarea dietei

sărace în glucide și bogată în lipide (cetone), are loc micșorarea masei tumorale și invers, la dieta bogată în glucoză și săracă în cetone, se constată creșterea masei tumorale [28, 29] (fig. 7).

Tabelul 1

Compoziția (%) dietei standard și a dietei cetonice

| Compoziția (%) dietei standard (DS) și a dietei cetonice (DC) | | |
|---------------------------------------------------------------|------|-----|
| Componentele | DS | DC |
| Glucide | 62 | 3 |
| Lipide | 6 | 72 |
| Proteine | 27 | 15 |
| Energia (kcal/g) | 4,4 | 7,2 |
| L/P+G | 0,07 | 4 |



Fig. 7. Micșorarea masei tumorale la utilizarea dietei bogate în cetone [28, 29].

În rezultatul experiențelor s-a constatat că, utilizarea glucozei e mai ridicată în celulele canceroase decât în cele sănătoase. La utilizarea dietei cetonice – utilizarea glucozei e

mai ridicată în celulele sănătoase decât în cele canceroase. La administrarea dietei cetogene în combinație cu 2-dezoxiglucosa: nivelul redus de glucoză distruge celulele canceroase, iar nivelul ridicat de cetone protejează celulele normale [28, 29].

Concluzii

Sursa energetică majoră a celulelor canceroase este glucoza, metabolismul celulelor tumorale este reprezentat de glicoliza aerobă (efectul Warburg), unde LDH reprezintă un marker al malignității tumorale.

Dependența celulelor canceroase de glucoză, posibilitatea utilizării glutaminei în procesele energetice, inhibiția metabolismului oxidativ sunt particularități ale metabolismului tumoral, care pot fi ținta unui tratament selectiv, de bază și adjuvant.

Modularea metabolismului energetic reprezintă o nouă etapă în tratamentul cancerului. Aplicarea tratamentului prin inhibiția metabolismului glicolitic va implica și *screening*-ul de rutină în profilul tumoral.

Substituirea glucozei din rația alimentară cu lipidele (dietă cetogenă) poate fi o metodă non-toxică de management al cancerului.

Referințe bibliografice

- Adam SA, Schnell O, Pöschl J, et al. ALDH1A1 is a marker of astrocytic differentiation during brain development and correlates with better survival in glioblastoma patients. *Brain Pathol.* 2012;22:788-797.
- Albers M, et al. Hyperpolarized ¹³C Lactate, Pyruvate and Alanine: noninvasive biomarkers for prostate cancer detection and grading. *Cancer Res.* 2008;15:20-68.
- Lieberman Brian P, et al. PET Imaging of Glutaminolysis in Tumors by ¹⁸F-(2S,4R)4-Fluoroglutamine. *J Nucl Med.* 2011;52:1947-1955.
- Brizel DM, Schroeder T, Scher RL, et al. Elevated tumor lactate concentrations predict for an increased risk of metastases in head-and-neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2001;51(2):349-353.
- Cohen P, Frame S. The renaissance of GSK3. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001;2(10):769-776.
- Fujii M, Nishikawa A, Tanaka T, et al. Cytochemical changes in lactate dehydrogenase isoenzymes in human brain tumours. *Acta Neurochir (Wien).* 1984;71(3-4):243-253.
- Garber K. Energy deregulation: licensing tumors to grow. *Science.* 2006;312(5777):1158-1159.
- Gatenby RA, Gillies RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer.* 2004;4(11):891-899.
- Gstraunthaler G, Seppi T, Pfaller W. Impact of culture condition, media volumes and glucose content on metabolic properties of renal epithelial cell cultures. *Cell Physiol Biochem.* 1999;9:150-172.
- Hao W, Chang CP, Tsao CC, et al. Oligomycin-induced bioenergetic adaptation in cancer cells with heterogeneous bioenergetic organization. *J Biol Chem.* 2010;285(17):12647-12654.
- Hussien R, Brooks GA. Mitochondrial and plasma membrane lactate transporter and lactate dehydrogenase isoform expression in breast cancer cell lines. *Physiol Genomics.* 2011;43(5):255-264.
- Isidoro A, et al. Breast carcinomas fulfill the Warburg hypothesis and provide metabolic markers of cancer prognosis. *Carcinogenesis.* 2005;26:2095-104.
- Kast RE, Belda-Iniesta C. Suppressing glioblastoma stem cell function by aldehyde dehydrogenase inhibition with chloramphenicol or disulfiram as a new treatment adjunct: an hypothesis. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2009;4(4):314-317.
- Konior A, Schramm A, Czesnikiewicz-Guzik M, et al. NADPH Oxidases in Vascular Pathology. *Antioxid Redox Signal.* 2013;1.
- Kounelakis M, Zervakis M, Giakos G, et al. On the relevance of glycolysis process on brain gliomas. *IEEE J Biomed Health Inform.* 2012.
- Kumar M, Birdi A, Gupta YN, et al. Serum lactic dehydrogenase isoenzymes alteration in carcinoma cervix uteri. *Int J Gynaecol Obstet.* 1988;1:91-95.
- Lisii D. Energetic metabolism of glioma stem cells. *Curierul medical.* 2013;56(1):4-8.
- Lisii D. Aspecte noi în patomorfbiochimia celulelor canceroase și gliomatoase: Autoref. al tezei de doctor în medicină. Chișinău, 2013;25.
- Marik J, et al. PET of Glial Metabolism Using 2-18F-Fluoroacetate. *J Nucl Med.* 2009;50(6):982-990.
- Matoba S, Kang JG, Patino WD, et al. p53 regulates mitochondrial respiration. *Science.* 2006;312(5780):1650-1653.
- Meng M, Chen S, Lao T, et al. Nitrogen anabolism underlies the importance of glutaminolysis in proliferating cells. *Cell Cycle.* 2010;9:3921-3932.
- Mereuță Ion. Reglementarea serviciului oncologic în Republica Moldova. Chișinău, 2002;5.
- Nam SO, Yotsumoto F, Miyata K, et al. Possible therapeutic targets among the molecules involved in the Warburg effect in tumor cells. *Anticancer Res.* 2013;33(7):2855-2860.
- Rajagopalan KN, DeBerardinis RJ. Role of glutamine in cancer: therapeutic and imaging implications. *J Nucl Med.* 2011;52(7):1005-1008.
- Reitzer LJ, Wice BM, Kennell D. Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa cells. *J Biol Chem.* 1979;254:2669-2676.
- Rust RS Jr, et al. Enzyme levels in cultured astrocytes, oligodendrocytes and Schwann cells, and neurons from the cerebral cortex and superior cervical ganglia of the rat. *Neurochem Res.* 1991;16(9):991-999.
- Sevinc A, Sari R, Fadillioglu E. The utility of lactate dehydrogenase isoenzyme pattern in the diagnostic evaluation of malignant and non-malignant ascites. *J Natl Med Assoc.* 2005;7(1):79-84.
- Seyfried TN, et al. Role of glucose and ketone bodies in the metabolic control of experimental brain cancer. *Br. J. Cancer.* 2003;89:1375-1382.
- Seyfried TN, et al. Targeting energy metabolism in brain cancer with calorically restricted ketogenic diets. *Epilepsia.* 2008;49(8):114-116.
- Seyfried TN. Is mitochondrial glutamine fermentation a missing link in the metabolic theory of cancer? In: *Cancer As a Metabolic Disease: On the Origin, Management, and Prevention of Cancer.* John Wiley & Sons, Hoboken NJ. 2012;133-144.
- Seyfried TN. Respiratory dysfunction in cancer cells. In: *Cancer As a Metabolic Disease: On the Origin, Management, and Prevention of Cancer.* John Wiley & Sons, Hoboken, NJ. 2012;73-105.
- Seyfried TN. Cancer as a metabolic disease: implications for novel therapeutics. *Amer. Assoc. Cancer Res. Education Book,* 2013;31-36.
- Shaw RJ. Glucose metabolism and cancer. *Curr Opin Cell Biol.* 2006;18(6):598-608.
- Shim H. C-Myc transactivation of LDHA: implications for tumor metabolism and growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Biochemistry.* 1997;94:6658-6663.
- Subhash MN, Rao BS, Shankar SK. Changes in lactate dehydrogenase isoenzyme pattern in patients with tumors of the central nervous system. *Neurochem Int.* 1993;22(2):121-124.
- Takahashi M, Sakai N, Yamada H. Cytochemical changes in lactate dehydrogenase isoenzymes in human brain tumours. *Acta Neurochir (Wien).* 1984;71(3-4):243-253.
- Van den Bent M, et al. IDH1 and IDH2 mutations are prognostic but not predictive for outcome in anaplastic oligodendroglial tumors: a report of the European organization for research and treatment of cancer brain tumor group. *Clin Cancer Res.* 2010;16(5):1597-1604.
- Vlasi E, Lagadec C, Vergnes L, et al. Metabolic state of glioma stem cells and nontumorigenic cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011;108:16062-16067.
- Walenta S, Schroeder T, Mueller-Klieser W. Lactate in solid malignant tumours: potential basis of a metabolic classification in clinical oncology. *Medicinal Chemistry.* 2004;11:2195-2204.
- Walenta S, Mueller-Klieser F. Lactate: Mirror and motor of tumor malignancy. *Seminars in Radiation Oncology.* 2004;14(3):267-274.
- Waniwski R, Martin D. Preferential utilisation of acetate by astrocytes is attributable to transport. *Journal of neuroscience.* 1998;18(14):5225-5233.
- Wray J, Kalkan T, Gomez-Lopez S, et al. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 alleviates Tcf3 repression of the pluripotency network and increases embryonic stem cell resistance to differentiation. *Nat Cell Biol.* 2011;13(7):838-845.
- Yun K. LDH isozyme analyses of ethylnitrosourea-induced central nervous system tumors in rats. *Acta Pathol Jpn.* 1980;30(3):397-406.