

РЕДОКС-РЕГУЛЯЦИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

УДК 616-006,616.71,577.3

МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ОПУХОЛЕЙ

© 2023 г. М. В. Ширманова^{а, *}, С. Д. Синюшкина^а, А. Д. Комарова^{а, б}

^аПриволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород, 603005 Россия

^бНижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, 603950 Россия

*e-mail: Shirmanovam@mail.ru

Поступила в редакцию 15.02.2023 г.

После доработки 11.04.2023 г.

Принята к публикации 26.04.2023 г.

Опухолевая гетерогенность создает серьезные проблемы как для диагностики и терапии злокачественных новообразований, так и для проведения фундаментальных исследований. Межопухолевые и внутриопухолевые отличия касаются различных характеристик и аспектов жизнедеятельности опухолевых клеток, включая их метаболизм. В представленном обзоре рассмотрена метаболическая гетерогенность опухолей с фокусом на энергетический обмен, ее причины, механизмы и методы исследования. Более подробно описан флуоресцентный времяразрешенный имиджинг как новый перспективный метод наблюдения метаболической гетерогенности на клеточном уровне. Показана важность изучения энергетического обмена опухолей и выявления внутри- и межопухолевых метаболических отличий.

Ключевые слова: опухоль, опухолевая гетерогенность, энергетический метаболизм, окислительное фосфорилирование, гликолиз, метаболические кофакторы, флуоресцентный времяразрешенный имиджинг

DOI: 10.31857/S0026898423060186, EDN: QIJYQ

ВВЕДЕНИЕ

Особый метаболизм опухолей остается предметом активных исследований. Связанные с канцерогенезом изменения затрагивают все метаболические процессы – энергетический обмен, биосинтез, регуляцию редокс-баланса. Главная причина перестройки метаболизма – потребность в энергии и макромолекулах для быстрого роста опухолевых клеток, так что без метаболической реорганизации прогрессия опухоли кажется невозможной.

К метаболическим особенностям, характерным для опухолей, относятся повышенный (по сравнению с нормальными тканями) уровень гликолиза и способность использовать гликолитический путь даже при нормальном содержании кислорода (эффект, открытый в 1920-х гг. Отто Варбургом и названный в его честь), снижение митохондриального дыхания, использование глутамина и жирных кислот в качестве дополнительных или альтернативных глюкозе энергетических субстратов, высокий уровень биосинтеза липи-

дов, повышенная продукция активных форм кислорода и азота и, как следствие, перманентная активация механизмов антиоксидантной защиты [1–5].

В то же время, работы последних десятилетий убедительно показывают, что указанные особенности не абсолютны, а метаболизм опухолевых клеток представляет собой динамичную и высокопластичную систему, в которой отдельные метаболические пути могут взаимно переключаться в зависимости от текущих потребностей клетки и условий микроокружения. Все это приводит к тому, что метаболические профили опухолевых клеток варьируют в широких пределах как внутри одного опухолевого узла, так и между отдельными опухолями одного типа, что приводит к метаболической гетерогенности [6].

Предполагается, что метаболическая гетерогенность является результатом комбинированного воздействия различных факторов, одни из которых относятся к самой опухолевой клетке (например, гистологический тип, степень дифференцировки, соматические мутации), а другие обусловлены микроокружением (например, распределением кислорода и питательных веществ, взаимодействием с внеклеточным матриксом и стромальными клетками) [7]. Чтобы понять, как возникают и развиваются метаболические фенотипы,

Сокращения. FLIM – флуоресцентный времяразрешенный имиджинг (Fluorescence Lifetime Imaging); ¹⁸F-ФДГ – ¹⁸F-фтордезоксиглюкоза; ИГХ – иммуногистохимия; МРС – магнитно-резонансная спектроскопия; МРТ – магнитно-резонансная томография; ОСК – опухолевые стволовые клетки; ПЭТ – позитронно-эмиссионная томография.

требуется установить, в какой степени каждый из этих факторов влияет на опухолевую клетку, а также иметь высокочувствительные и надежные методы наблюдения метаболического статуса на клеточном уровне.

В прикладном аспекте исследования метаболической гетерогенности важны для прогнозирования заболевания и разработки персонализированных подходов к противоопухолевой терапии. Очевидно, что высокая метаболическая гетерогенность и пластичность опухолевых клеток могут быть факторами, неблагоприятными для терапии опухолей, поскольку позволяют отдельным группам клеток выживать при действии препаратов, а другим – приспосабливаться к неблагоприятным и переменчивым условиям [8, 9].

Рассмотрим более подробно метаболическую гетерогенность как одно из проявлений опухолевой гетерогенности, ее основные причины и механизмы, а также возможности современных методов в изучении метаболической гетерогенности с примерами из экспериментальных и клинических исследований.

ОБЩИЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ ОБ ОПУХОЛЕВОЙ ГЕТЕРОГЕННОСТИ

Злокачественные новообразования по своей структуре представляют собой сложные системы, которым свойственна генетическая, молекулярная, клеточная и архитектурная (пространственная) неоднородность. Совокупность показателей, демонстрирующих различия между опухолями или внутри каждой отдельной опухоли, называют *опухолевой гетерогенностью* [7–9].

К основным проявлениям опухолевой гетерогенности относятся:

– генетическая гетерогенность – неоднородность опухоли по генным мутациям, хромосомным и кариотипическим нарушениям;

– эпигенетическая гетерогенность – неоднородность профилей метилирования ДНК и ацетилирования гистонов в опухоли;

– транскриптомная гетерогенность – различия в уровне экспрессии генов (транскрипционных профилях) в одиночных опухолевых клетках;

– протеомная гетерогенность – многообразие белковых форм, кодируемых одним геном, которое достигается за счет регуляции транскрипции, трансляции и посттрансляционных модификаций белков;

– фенотипическая гетерогенность – различия морфологического строения опухоли и разнообразие ее биохимических паттернов [6].

Основные факторы, которые приводят к формированию опухолевой гетерогенности, можно разделить на две большие группы: 1) внутрен-

ние, относящиеся к самим опухолевым клеткам, и 2) внешние, связанные с микроокружением опухоли.

Одной из главных причин внутриопухолевого клеточного разнообразия и межопухолевых отличий является *генетическая* изменчивость, обусловленная мутациями в генах, хромосомной и микросателлитной нестабильностью. В большинстве типов злокачественных опухолей человека генетическая нестабильность присутствует в форме хромосомных aberrаций, реже – в форме генетической нестабильности на уровне нуклеотидов. Обнаружены различия в генетических профилях клеток, взятых из разных зон одной и той же опухоли, а также клеток первичных опухолей и их метастазов. Генетическая природа опухолевой гетерогенности хорошо описывается теорией клональной эволюции опухолей, которая объясняет опухолевую гетерогенность как результат естественного отбора наиболее агрессивных и адаптированных клеток [10]. Стохастические мутации в отдельных опухолевых клетках служат фундаментом отбора клонов, способных обеспечить онкогенный потенциал, ускользание от иммунного надзора, устойчивость к терапевтическим воздействиям. Случайные мутации происходят из-за повышенной геномной нестабильности опухолевых клеток, а затем “тестируются” дарвиновским отбором: только меньшая часть мутаций окажется в итоге селективно выгодной [11]. Выделение и эволюция отдельных клонов опухолевых клеток способствуют дальнейшей прогрессии опухоли [12].

Помимо генетических мутаций важную роль играют *эпигенетические изменения*, под которыми подразумеваются наследуемые, но обратимые изменения в активности генов и фенотипе клетки без изменений нуклеотидной последовательности ДНК. Эпигенетические факторы опухолевой гетерогенности включают в себя изменение профиля метилирования ДНК, модификацию гистонов, реорганизацию хроматина, нарушение экспрессии микроРНК. Эпигенетический контроль экспрессии генов регулируется соотношением между ферментами, которые “наносит” регуляторные метки на ДНК и гистоны (например, ДНК- и гистон-метилтрансферазы) и “удаляют” эти метки (например, гистондеацетилазы, ДНК-деметилазы) [13, 14]. Механизмы эпигенетической регуляции включают в себя также метилирование промоторных областей генов, ведущее к повышению геномной нестабильности, и ремоделирование хроматина в результате посттрансляционной модификации гистоновых белков [15]. Типичным примером эпигенетической регуляции экспрессии генов в нормальных клетках служит дифференцировка эмбриональных стволовых клеток в процессе эмбриогенеза. При канцерогенезе эпигенетические механизмы вовлече-

ны в трансформацию органоспецифичных стволовых или соматических клеток в опухолевые стволовые клетки (ОСК) и последующую дифференцировку части из них. Согласно “иерархической” гипотезе, за поддержание и прогрессирование опухоли отвечают только ОСК, которые представляют собой особую популяцию опухолевых клеток, обладающую способностью к неограниченному самообновлению и к дифференцировке в основную массу опухоли, что делает их схожими с нормальными стволовыми клетками [10, 11]. При значительной дестабилизации эпигенетического ландшафта, например под действием внешних факторов (окислительный стресс, воспаление и др.), в опухоли могут появляться новые популяции ОСК, меняющие клеточную иерархию [16–18].

К внешним причинам гетерогенности опухолей относится *опухолевое микроокружение*. Микроокружение опухоли неоднородно: разные области опухоли имеют разную плотность кровеносных и лимфатических сосудов, разный состав стромальных клеток и внеклеточного матрикса. Отличительными чертами многих опухолей являются гипоксия, повышенный уровень активных форм кислорода и низкие значения внеклеточного рН (кислая среда). Все эти факторы важны для регуляции пролиферации и способствуют опухолевой прогрессии. В состав микроокружения входят различные типы клеток: опухоль-ассоциированные фибробласты, иммунные клетки, эндотелиальные клетки, перициты, стволовые клетки. Все они находятся в тесном взаимодействии с опухолевыми клетками и играют роль в поддержании роста опухоли [11]. Например, фибробласты продуцируют ростовые факторы, цитокины, коллаген и ремоделирующие его ферменты, стимулируют миграционную активность опухолевых клеток [19]. Иммунные клетки выделяют ряд воспалительных интерлейкинов, которые способствуют поддержанию хронического воспаления в опухоли и вызывают дедифференцировку опухолевых клеток в ОСК [20, 21]. Отдельные типы иммунных клеток в опухолевом микроокружении, такие как регуляторные Т-лимфоциты и супрессорные клетки миелоидного происхождения, подавляют активацию, пролиферацию и функции эффекторных Т-лимфоцитов и таким образом защищают опухоль от действия иммунной системы. Эндотелиальные клетки формируют сосудистую сеть, обеспечивая снабжение опухоли кислородом и питательными веществами [10]. Внеклеточный матрикс, в состав которого входит коллаген, эластин, фибронектин, ламинины и др., составляет механический каркас опухоли, обеспечивает ее жесткость, регулирует пролиферативную активность, миграцию и инвазию опухолевых клеток, ограничивает диффузию питательных веществ и лекарственных препаратов. Неоднород-

ный состав внеклеточного матрикса и клеточных компонентов стромы в опухоли способствуют гетерогенности самих опухолевых клеток.

Таким образом, опухолевая гетерогенность обусловлена генетическими изменениями и эпигенетическими событиями, а также влиянием условий опухолевого микроокружения. Множественные различия опухолей на генетическом, молекулярном, клеточном и тканевом уровнях приводят к основному клиническому проявлению гетерогенности – разному ответу на одну и ту же терапию у разных пациентов или клеточных субклонов одной и той же опухоли. Важным процессом, который повышает выраженность опухолевой гетерогенности и скорость формирования резистентности к терапии, является метастазирование: каждый метастаз в условиях, отличных от исходных, начинает самостоятельное развитие с формированием новых субклонов [22]. Именно поэтому разработка подходов к прогнозированию онкологических заболеваний, а также выбор терапевтической стратегии должны проводиться с учетом опухолевой гетерогенности [23].

МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ОПУХОЛЕЙ

Метаболическая гетерогенность заключается в том, что в опухолях одновременно присутствуют клетки с различными метаболическими профилями, а метаболизм опухолей одного типа и стадии различается у разных пациентов (рис. 1).

Наиболее известная особенность энергетического метаболизма опухолевых клеток, названная аэробным гликолизом, была описана в 1920-х гг. немецким физиологом Отто Варбургом [24]. Эффект Варбурга заключается в том, что опухолевые клетки используют гликолиз не только при гипоксии, но и в условиях нормальной оксигенации. Изначально считалось, что этот эффект обусловлен митохондриальной дисфункцией в клетках опухоли, однако впоследствии обнаружили, что он имеет место и при нормально функционирующих митохондриях, так что данное предположение было опровергнуто [25].

Хотя причины аэробного гликолиза до сих пор остаются неизвестными, существует несколько биологических объяснений этого процесса:

1) быстрое получение АТФ [24]. С точки зрения выработки АТФ на единицу глюкозы, гликолиз менее эффективен, чем митохондриальное дыхание. Однако его скорость на 1–2 порядка выше скорости полного окисления глюкозы в митохондриях. Таким образом, клетки могут получить АТФ быстрее, что дает определенное преимущество в условиях конкуренции за энергетические субстраты.

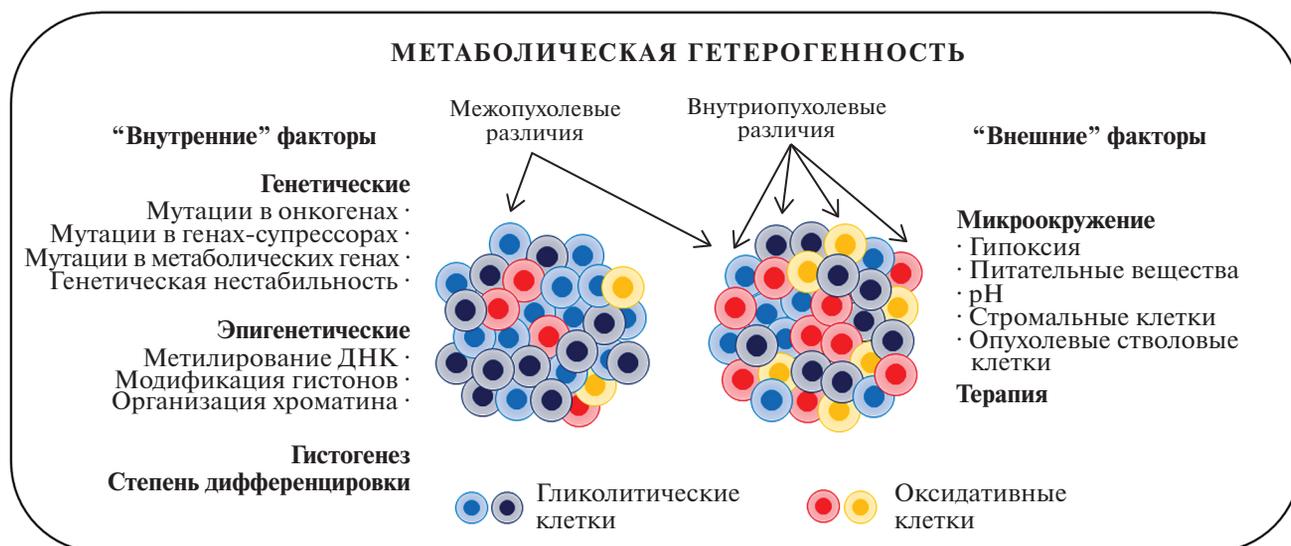


Рис. 1. Метаболическая гетерогенность опухолей. Схематично представлены опухоли, метаболически различающиеся между собой и гетерогенные на клеточном уровне. Перечислены основные факторы, определяющие метаболический профиль опухоли, – “внутренние” (присущие самим опухолевым клеткам) и “внешние” (условия микроокружения и внешние воздействия).

2) Образование углеродных метаболитов для биосинтеза нуклеотидов, липидов и белков [26]. Анаболические процессы, протекающие в пролиферирующих, быстро растущих опухолевых клетках, нуждаются в повышенном потреблении глюкозы. Кроме того, глюкоза служит субстратом для пентозофосфатного пути, один из продуктов которого, NAD(P)H, играет важную роль в *de novo* синтезе липидов и антиоксидантной защите клетки.

3) Закисление внеклеточной среды [27, 28]. Образующийся в ходе гликолиза лактат транспортируется в межклеточное пространство, закисляя его. Кислые значения pH способствуют иммуносупрессии, инвазии и метастазированию опухолей, стимулируют ангиогенез.

4) Снижение уровня активных форм кислорода [29, 30]. Переход клеток на гликолитический метаболизм при условии снижения уровня окислительного фосфорилирования приводит к снижению продукции активных форм кислорода, повреждающих мембраны и ДНК.

Стоит отметить, что в настоящее время теория “чистого гликолиза” в опухолях отвергнута. Дефектные митохондрии действительно встречаются в некоторых типах опухолей, но, как правило, клетки с гликолитическим метаболизмом сохраняют функциональные митохондрии и могут активировать дыхание при определенных условиях. В большинстве опухолей максимальный вклад гликолиза в производство АТФ не превышает 50–60% [31]. Более того, опухолевые клетки могут обратимо переключаться между гликолитическим и окислительным типом метаболизма в зависимо-

сти от наличия глюкозы и кислорода в окружающей среде и собственной пролиферативной активности [32].

Одна из теорий метаболической гетерогенности опухоли основана на способности опухолевых клеток к *пролиферации*, поскольку использование углеродных молекул опухолевыми клетками, активно делящимися и находящимися в состоянии покоя, сильно отличается друг от друга [33]. Активно делящиеся опухолевые клетки имеют тенденцию к гликолитическому метаболизму [34]: в них активируется аэробный гликолиз, что приводит к аномально высокой скорости поглощения глюкозы [35, 36]. При этом уровень митохондриального дыхания может варьировать. В тот период, когда опухолевая клетка находится в состоянии покоя, глюкоза окисляется в процессе клеточного дыхания. Характерно, что опухоли содержат клетки с разной пролиферативной активностью, а доля пролиферирующих клеток отличается на разных сроках роста – небольшие опухоли на ранних стадиях содержат больше активно делящихся клеток, чем зрелые новообразования.

В свою очередь, общий метаболический профиль опухолевых клеток и их пролиферативная активность определяются целым рядом факторов – особенностями метаболизма исходных нормальных клеток и конкретного типа ткани, генетическими нарушениями и эпигенетической регуляцией, а также спецификой опухолевого микроокружения (рис. 1). Кроме того, метаболизм опухоли меняется в процессе ее роста и под действием противоопухолевой терапии.

Метаболическая реорганизация опухолевых клеток может быть результатом *мутаций* в онкогенах и в генах-супрессорах опухолевого роста, либо в самих метаболических генах. В первом случае нарушения регуляции одних сигнальных каскадов приводят к неконтролируемой пролиферации (например, гены *TP53*, *APC*, *KRAS*, *MYC*, *PTEN*, *PI3K*), других — к дисбалансу редокс-статуса (например, *NRF2*, *KEAP1*), но все они вызывают скоординированные изменения в метаболических путях, как правило, связанные с активацией гликолиза [37]. Это подтверждает фундаментальное значение аэробного гликолиза для онкогенеза. Например, при раке молочной железы мутации генов *TP53*, *BRCA*, *HER2* коррелируют с повышенной экспрессией генов, отвечающих за регуляцию гликолиза (*HK3*, *GPI*, *GAPDH*, *PGK1*, *ENO1*, *PDK1*, *SDHC*, *PFKL* и др.) [38–40]. Активация гликолиза при разных типах опухолей коррелирует с экспрессией гена *RAS* и генов пути MAPK. Аденокарцинома легкого является примером онкологической патологии, при которой наблюдаются все наиболее часто встречающиеся в опухолях мутации (гены *TP53*, *KRAS*, *KEAP1*, *STK11*, *EGFR*, *NF1*, *BRAF*) [41], которые прямо или косвенно регулируют метаболизм опухолевых клеток и способствуют их метаболической гетерогенности [42]. Интересно, что экспрессия генов цикла Кребса и окислительного фосфорилирования значительно отличается в разных типах рака, предполагая, что роль митохондриального дыхания не универсальна и может определяться условиями микроокружения или спецификой конкретной ткани.

В опухолях одной локализации разные мутации могут приводить к разным метаболическим нарушениям. Например, опухоли печени, индуцированные мутациями в онкогенах *MYC* и *MET*, имеют существенные различия в метаболизме глюкозы и глутамина [43]. С другой стороны, метаболические процессы в опухоли специфичны для ткани, из которой эта опухоль происходит, поэтому схожие мутации в клетках разного происхождения могут вызывать различные метаболические последствия. Так, метаболизм опухолей печени, индуцированных *MYC*, отличается от метаболизма опухолей легкого, индуцированных этим же онкогеном [43]. Генетическая предрасположенность к преимущественному использованию того или иного метаболического пути приводит к возникновению межопухолевых различий в энергетическом метаболизме [44].

Мутации в генах метаболических путей могут быть причиной злокачественной трансформации, т.е. выполнять опухоль-иницирующую функцию или появляться в процессе развития опухоли. Наиболее известные мутации такого рода связаны с ключевыми ферментами цикла Кребса — сукцинатдегидрогеназой (*SDH*), изоцитратдегидрогеназой (*IDH1/2*) и фумаратгидратазой (*FH*) [37].

Все три онкометаболита — сукцинат, фумарат и D-2-гидроксиглутарат — действуют как ингибиторы α -кетоглутарат-зависимых диоксигеназ и приводят к значительным перестройкам в эпигенетической регуляции генов, отвечающих за клеточную дифференцировку.

Эпигенетическая регуляция экспрессии генов также связана с понятием метаболической гетерогенности, потому что, с одной стороны, активность многих метаболических ферментов и переносчиков регулируется эпигенетическими модификациями гистонов и ДНК, а с другой, данные изменения реагируют на метаболическое состояние клетки. Например, соотношение ацетил-КоА и свободного кофермента А может регулировать ацетилирование гистонов, а α -кетоглутарат влияет на деметилирование гистонов и ДНК [14]. Многие гены, связанные с метаболизмом, находятся под эпигенетическим контролем. Например, при гепатоцеллюлярной карциноме и глиобластоме гипометилирование промотора гена гексокиназы-2 усиливает синтез данного фермента и вызывает переход на гликолитический метаболизм [45]. При колоректальном раке и гепатоцеллюлярной карциноме происходит гиперметилирование промотора гена, кодирующего фруктозо-1,6-бисфосфатазу (скорость-лимитирующий фермент глюконеогенеза), что приводит к подавлению активности данного фермента и повышению скорости гликолитических реакций [46].

Метаболический профиль клеток опухоли определяется не только (эпигенетическими) нарушениями, но и условиями микроокружения [11]. Например, в зависимости от сигналов внешней среды опухолевые клетки способны регулировать соотношение процессов окислительного фосфорилирования и гликолиза и таким образом подстраиваться под текущие условия [47]. Основными факторами в опухолевом микроокружении, которые влияют на метаболизм, являются гипоксия, доступность питательных веществ и воспаление. Поскольку разные участки опухоли подвергаются воздействию неоднородного во времени и пространстве микроокружения, метаболический профиль всей опухоли может быть весьма гетерогенным.

Опухолевым тканям необходим постоянный приток кислорода и питательных веществ через локальную сосудистую сеть. Вследствие неравномерного распределения и атипичной структуры кровеносных сосудов на фоне быстрого роста опухолевой массы в опухолях часто развивается *гипоксия* [48]. Как правило, солидная опухоль держит области легкой и тяжелой гипоксии и в процессе роста испытывает колебания кровоснабжения и, следовательно, содержания кислорода. Гипоксия приводит к множественным эпигенетическим и генетическим изменениям, опосредованным, в ос-

новном, молекулярным каскадом mTORC1–HIF1 [49]. Индуцируемый гипоксией фактор HIF-1 инициирует транскрипцию более 100 генов, которые способствуют выживанию клеток в условиях гипоксии, в том числе генов, кодирующих ферменты гликолиза (*GLUT1*, *HK2*, *LDHA*, *MCT4* и др.) и фактор роста эндотелия сосудов (*VEGF*). Так что опухоль адаптируется к условиям недостатка кислорода и становится более агрессивной – гипоксия способствует инвазии, метастазированию и резистентности опухоли к разным видам терапии [50]. Вызываемые гипоксией перестройки клеточного метаболизма зависят от тяжести и длительности гипоксии и различаются в разных типах опухолей. В типичном случае легкая и/или острая гипоксия активирует гликолиз и снижает уровень окислительного фосфорилирования [51], тогда как глубокая и/или хроническая гипоксия запускает продукцию активных форм кислорода в митохондриях и, как следствие, механизмы антиоксидантной защиты, снижает интенсивность гликолиза [52]. Активные формы кислорода индуцируют реакции адаптации к воздействию гипоксии либо инициируют апоптоз клетки. Эти процессы напрямую зависят от функциональной активности митохондрий. Критическое отсутствие кислорода (аноксия) приводит к необратимому повреждению митохондрий и гибели клеток.

Снижение кровоснабжения приводит также к дефициту глюкозы – основного питательного субстрата опухолевых клеток. При недостатке глюкозы опухолевые клетки могут получать энергию с использованием альтернативных источников, а именно аминокислот (в основном глутамин) и жирных кислот [53–57]. В процессе глутаминолиза глутамин с помощью митохондриальной глутаминазы (*GLS1*) или ее цитозольной изоформы (*GLS2*) превращается в глутамат, а затем с помощью глутаминдегидрогеназы-1 (*GLUD1*) – в α -кетоглутарат, который поступает в цикл Кребса. Онкоген *MYC* управляет метаболизмом глутамин, способствуя его проникновению в митохондрии и превращению в глутамат. Жирные кислоты в опухолевых клетках расщепляются путем β -окисления, в результате чего образуется ацетил-КоА, который впоследствии также подпитывает цикл Кребса. Ингибирование того или иного метаболического пути в опухолевых клетках запускает целый ряд компенсаторных механизмов для сохранения пролиферации и выживания. Например, при ингибировании глутаминазы глутаминолиз может поддерживаться амидотрансферазами, ингибированный катаболизм глутамин компенсируется гликолизом, а биосинтез аминокислот (например, серина) или жирных кислот – усиленным импортом соответствующих питательных веществ [58].

В качестве энергетического субстрата может использоваться и лактат. Считается, что метабо-

лизм глюкозы и лактата зависит от различий в концентрации кислорода в разных участках опухоли: гипоксические клетки потребляют глюкозу и секретируют лактат, тогда как клетки в областях с лучшей перфузией импортируют молочную кислоту и используют ее в качестве энергетического субстрата [59, 60]. Межклеточный транспорт лактата происходит при участии монокарбоксилатных переносчиков, из которых наибольшую субстратную специфичность к лактату проявляют MCT-1 и -4 [61]. MCT-4-положительные гликолитические клетки формируют кислое микроокружение опухоли за счет секреции лактата, а MCT-1-экспрессирующие окислительные клетки используют молочную кислоту в качестве субстрата для цикла Кребса и окислительного фосфорилирования, вырабатывают АТФ и продуцируют интермедиаты для биосинтетических процессов. Контроль метаболического симбиоза имеет генетическую основу. В опухолевых клетках с окислительным биоэнергетическим фенотипом, располагающихся вблизи кровеносных сосудов, наблюдается экспрессия *MYC*, который стимулирует биогенез митохондрий, генерацию АТФ и анаболические пути для поддержания пролиферации [62]. В гипоксических клетках опухоли под влиянием HIF-1 стимулируется экспрессия гликолитических генов, снижается метаболизм митохондрий и эффективность окислительного фосфорилирования, активируется гликолиз [63].

Между опухолевыми клетками и опухоль-ассоциированными фибробластами может наблюдаться метаболический симбиоз [60]. Под влиянием активных форм кислорода, исходящих из опухоли, в фибробластах происходит стабилизация HIF-1 α и тем самым создаются “псевдогипоксические” условия, что, в свою очередь, способствует усиленному потреблению глюкозы и активации аэробного гликолиза. Впоследствии фибробласты через MCT-4 выделяют в окружающую среду лактат, который затем через MCT-1 поглощается опухолевыми клетками [14]. Явление, когда фибробласты переключают свой метаболизм на аэробный гликолиз и взаимодействуют с окислительными опухолевыми клетками, известно как обратный эффект Варбурга [64].

Возможность использования опухолевыми клетками разнообразных углеродных соединений также свидетельствует о метаболической гетерогенности опухолей с одинаковыми клиническими признаками.

Еще одним фактором метаболической гетерогенности опухоли считается присутствие ОСК, метаболический статус которых отличается от основной клеточной популяции. При этом неоднозначные результаты получены при изучении метаболического фенотипа ОСК: в зависимости от типа опухоли эти клетки могут быть как гликоли-

тическими, так и окислительными [35]. Первоначально предполагалось, что ОСК, как мультипотентные стволовые клетки, должны иметь преимущественно гликолитический метаболизм. Это показано на клетках рака молочной железы *in vitro* и опухолях у мышей [65], рака носоглотки *in vitro* [66], гепатоцеллюлярной карциномы *in vitro* и соответствующих модельных опухолях [67]. Однако впоследствии установили, что при других разновидностях рака АТФ продуцируется в ОСК предпочтительно путем окислительного фосфорилирования. В частности, это наблюдали в экспериментах на *in vitro* и *in vivo* моделях рака легкого [68], глиобластомы [69], аденокарциномы протоков поджелудочной железы [35]. Показано [70], что повышенная активность митохондрий в ОСК глиобластомы приводит к повышению активности окислительного фосфорилирования, служащего источником активных форм кислорода. В результате развивается окислительный стресс, который способствует возникновению мутаций и геномной нестабильности, что в конечном итоге приводит к клональной гетерогенности. Напротив, опухолевые клетки, не обладающие свойством стволовости, используют для получения АТФ аэробный гликолиз, что способствует их пролиферации.

Таким образом, существует широкий спектр различных факторов и механизмов, обуславливающих гетерогенность метаболизма опухолей. Неоднородный молекулярно-генетический профиль самих опухолевых клеток и их способность к переключению биохимических процессов и адаптации метаболизма в условиях изменчивого и неблагоприятного микроокружения приводят к преобладанию разных метаболических путей в разных участках одной опухоли и в разных опухолях одного типа. Метаболическая гетерогенность, как одно из фенотипических проявлений опухолевой гетерогенности, представляет проблему для оптимизации лечения онкологических больных [71], а также значительно затрудняет процесс диагностики [72].

МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ МЕТАБОЛИЗМА И МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ ГЕТЕРОГЕННОСТИ ОПУХОЛЕЙ

Современная фундаментальная и клиническая онкология располагает рядом методов исследования метаболизма опухолей, в том числе на уровне целых опухолей и на клеточном уровне. Методы первой группы больше применимы для установления межопухолевых отличий или отличий между первичными очагами и метастазами; вторая группа включает методы регистрации внутриопухолевых вариаций клеточного метаболизма. Рассмотрим их подробнее.

Позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ)

Позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ) — метод молекулярной визуализации, широко используемый для диагностики онкологических заболеваний и оценки эффективности противоопухолевой терапии. Этот метод предполагает использование радиофармпрепаратов — химических соединений, меченных позитрон-излучающими радионуклидами, такими как ^{18}F , ^{11}C , ^{15}O , ^{13}N и др. Накопление этих соединений в определенных морфологических структурах отражает обменные процессы [73]. Наиболее широко используемым радиофармпрепаратом является ^{18}F -фтордезоксиглюкоза (^{18}F -ФДГ). ^{18}F -ФДГ поступает в клетку через транспортеры глюкозы (GLUT), затем фосфорилируется гексокиназой с образованием ^{18}F -ФДГ-6-фосфата, который далее не метаболизируется и служит радиоактивным маркером. С помощью ПЭТ с ^{18}F -ФДГ оценивают потребность опухолевых клеток в глюкозе. Более интенсивное накопление ^{18}F -ФДГ характерно для опухолей или отдельных зон опухолей с гликолитическим метаболизмом. Определяемая с помощью ^{18}F -ФДГ высокая скорость гликолиза в опухоли рассматривается как неблагоприятный прогностический признак [74]. Результаты исследований с помощью ПЭТ показывают, что накопление ^{18}F -ФДГ зависит от микроокружения опухоли: более интенсивное накопление ^{18}F -ФДГ наблюдается в гликолитических клетках в областях гипоксии, в то время как в окислительных клетках, располагающихся в участках опухоли с хорошей перфузией, оно незначительно [75–78]. Накопление ^{18}F -ФДГ значительно варьирует в опухолях разного типа, разного объема и степени злокачественности. В настоящее время ^{18}F -ФДГ применяется для диагностики широкого спектра опухолей, в том числе рака молочной железы, легких, пищевода, поджелудочной железы, колоректального рака, лимфом, опухолей головы и шеи и др.

В контексте метаболической визуализации применение ПЭТ не ограничивается анализом углеводного обмена. В качестве радиофармпрепаратов используют также меченые аминокислоты: глутамин (^{18}F -FGln, ^{18}F -FSPG), тирозин (2-FTyr, ^{18}F -FAMT, ^{18}F -FET), метионин (^{11}C -MET), фенилаланин (^{18}F -FDOPA, ^{18}F -OMFD) [79–82]. Аминокислоты необходимы для биосинтеза белков, они также служат энергетическими субстратами и предшественниками других соединений (пуриновых и пиримидиновых оснований, биогенных аминов, гормонов, триацилглицеринов, холестерина и др.). Повышенное поглощение аминокислот опухолевыми клетками и меньшее их накопление в нормальной ткани и в зоне воспаления позволяют эффективно контрастировать некоторые типы

опухолей, в частности, глиомы, нейроэндокринные опухоли, рак молочной железы и др. [83].

Магнитно-резонансная томография и спектроскопия (МРТ, МРС)

Методы МРТ/МРС на основе ядерного магнитного резонанса основаны на количественной оценке изменений ядерного спина в ответ на сильное внешнее магнитное поле. Эти методы позволяют оценивать биохимические изменения в опухолях по концентрации определенных метаболитов, содержащих изотопы [84, 85]. Для визуализации метаболизма с помощью МРТ/МРС используют изотопы ^1H , ^{13}C и ^{31}P . Сигнал ^1H позволяет обнаружить такие метаболиты, как лактат, холин, *N*-ацетиласпартат, аланин, глутамин/глутамат, цитрат, фосфохолин, *D*-инозит и др. Так, например, в глиобластомах наблюдается снижение содержания *N*-ацетиласпартата (маркер целостности нервных клеток), повышение содержания холина (компонент клеточной мембраны), что обусловлено пролиферацией клеток, и лактата (маркер гликолиза) в гипоксических участках опухоли [86]. Однако протонная МРТ/МРС сопряжена с техническими трудностями в связи с высоким содержанием воды в тканях.

МРТ/МРС с фосфором (^{31}P) позволяет идентифицировать такие метаболиты, как АТР, АДР, фосфокреатин, неорганический фосфат, фосфоэфиры, фосфаты сахаров, и имеет огромный потенциал в изучении биохимических особенностей опухолевого роста. ^{31}P -содержащие метаболиты играют большую роль в энергетическом метаболизме и липидном обмене. Наиболее интенсивно изучают возможности ^{31}P -МРС в нейроонкологии. Показано, что ^{31}P -МРС позволяет оценить метаболические характеристики глиомы и метастазов [87]. Однако достаточно слабый сигнал ^{31}P , длительность процедуры сканирования, сложность постобработки и интерпретации МР-спектров ограничивают широкое применение этого метода в клинике, а высокая гетерогенность опухолей и значительные вариации в энергетических потребностях тканей мозга привносят дополнительные сложности.

Для проведения МРС с гиперполяризованным углеродом ^{13}C требуются контрастные вещества, обогащенные этим изотопом. Поскольку углерод составляет основу многих эндогенных метаболитов, ^{13}C -МРС дает возможность неинвазивно проследить многие метаболические реакции. В качестве контрастных агентов для ^{13}C -МРС чаще всего применяют ^{13}C -меченые пируват или глюкозу. ^{13}C -пируват в процессе гликолиза превращается в лактат или вступает в цикл Кребса с образованием ацетил-КоА и далее окисляется до CO_2 . В ходе карбоангидразной реакции CO_2 пре-

вращается в ^{13}C -бикарбонат, который также можно обнаружить с помощью МРС. Ряд исследований на модельных опухолях у животных и опухолях пациентов показывает возможность детекции меж- и внутриопухолевой гетерогенности метаболизма по соотношению сигналов лактата и пирувата, что не всегда удается зарегистрировать с помощью ^{18}F -ФДГ-ПЭТ. Так, на примере глиобластомы показано повышенное образование лактата из ^{13}C -глюкозы, что согласуется с эффектом Варбурга, в то время как снижение образования лактата в инфильтративной зоне опухоли свидетельствует о меньшей интенсивности гликолиза [88]. В опухолях молочной железы отмечены значительные колебания соотношения сигнала лактат/пируват в разных молекулярных подтипах опухоли, причем более высокие уровни обмена ^{13}C наблюдались в более агрессивных опухолях, что коррелировало с экспрессией МСТ-1 и гипоксией [89]. Более высоким соотношением пируват/лактат было в высокодифференцированных опухолях (почечноклеточный рак), чем в низкодифференцированных [90], при этом гипоксические участки опухоли, характеризующиеся высоким уровнем метаболической активности, давали высокий сигнал ^{13}C -лактата и низкий сигнал ^{13}C -пирувата.

ОМИКС-технологии

Современные омиксные технологии, такие как геномика, транскриптомика, метаболомика, предоставляют обширную информацию о различных классах биомолекул, входящих в состав клеток и тканей. Для этого используют методы секвенирования нуклеиновых кислот, масс-спектрометрии и др., а гигантский объем получаемой информации обрабатывается и анализируется с помощью биоинформатических технологий. Геномика, анализирующая нуклеотидные последовательности ДНК, дает информацию о генетической нестабильности и мутациях, а также о разнообразных модификациях генома. Транскриптомика изучает экспрессию генов; протеомика — состав и структурно-функциональные свойства молекул белков; метаболомика — различные группы эндогенных метаболитов, включая углеводы, липиды, пептиды, органические кислоты и др. В настоящее время на первое место выходит концепция мультиомиксного подхода, означающего использование разных омикс-технологий для установления взаимосвязей генетических изменений с экспрессией генов, связанных с метаболизмом и особенностями метаболических процессов в клетке [91, 92]. Подобные исследования выявляют корреляции между активностью определенных метаболических генов и уровнем отдельных метаболитов в опухолях, идентифицируют метаболические про-

граммы в опухолях с различным молекулярно-генетическим профилем и изменения, индуцированные каким-либо воздействием. Таким образом, эти методы позволяют получить “глобальные” представления об опухолевом метаболизме.

Нужно понимать, что тотальное РНК-секвенирование дает усредненную картину для некоего образца клеточной суспензии, например, для выделенной из опухоли субпопуляции клеток. В случае высокогетерогенных опухолей такой анализ оказывается малоинформативным и дорогостоящим, поскольку необходимо использовать большое число проб. Задача изучения внутриопухолевой гетерогенности метаболизма отчасти решается с помощью технологий секвенирования одиночных клеток (single-cell sequencing), которые позволяют получать информацию о геноме и транскриптоме небольшого числа выделенных клеток [93, 94]. Так, на образцах рака молочной железы Yu и соавт. показали межопухолевую метаболическую гетерогенность на геномном, транскриптомном и метаболомном уровнях. Они выделили два основных метаболических фенотипа опухолей: один зависел преимущественно от гликолиза и пентозофосфатного пути и ассоциировался с низкой выживаемостью, второй — от окисления жирных кислот и глутаминолиза. Первый фенотип был более характерен для HER2-положительного и базальноподобного рака, второй — для люминального А подтипа рака молочной железы. В люминальном Б подтипе одинаково часто встречались оба метаболических фенотипа [95]. Xiao и соавт. проанализировали профили экспрессии “метаболических” генов в отдельных клетках меланомы и плоскоклеточного рака головы и шеи и обнаружили, что активность и пластичность метаболических путей в опухолевых клетках более выражены, чем в стромальных, а основной вклад в метаболическую гетерогенность вносят различия в активности митохондрий [96]. При этом уровни гликолиза и окислительного фосфорилирования на клеточном уровне коррелировали с активностью генов, вовлеченных в ответ на гипоксию. Сообщается также, что активность окислительного фосфорилирования и гликолиза в клетках рака желудка выше, чем в нормальных клетках, и коррелирует с гипоксией на клеточном уровне. Интересно, что в нормальной ткани, окружающей опухоль, повышена активность большего числа метаболических путей, чем в опухоли [97].

Более сложные транскриптомные технологии на основе секвенирования одиночных клеток, такие как Visium ST, Slide-seq, Stereo-seq, предоставляют также и пространственную информацию с разрешением, близким к клеточному, и позволяют визуализировать разные кластеры клеток в опухоли, исходя из профилей пространственной экспрессии генов [98]. С точки зрения опухолевой гетерогенности крайне интересна

пространственная транскриптомика, которая все чаще применяется в онкологических исследованиях. Например, с использованием метода Stereo-seq охарактеризовано микроокружение внутрипеченочной холангиокарциномы [99]. В зоне опухолевой инвазии шириной 500 мкм идентифицировано большое содержание иммунных клеток, иммуносупрессивное микроокружение и метаболическое перепрограммирование опухолевых клеток. Lv и соавт. получена транскриптомная карта инвазивного микропапиллярного рака молочной железы. Оказалось, что опухолевые клетки обладают значительной гетерогенностью, связанной с перепрограммированием метаболизма липидов. Предложен новый прогностический маркер — ген *SREBF1*, кодирующий ключевой транскрипционный фактор, регулирующий *de novo* синтез длинноцепочечных жирных кислот, повышенная экспрессия которого коррелировала с наличием метастазов и плохим прогнозом [100]. С помощью пространственной транскриптомики Wu и соавт. изучен иммунный профиль метастазов колоректального рака в печень и показано, что опухоль-ассоциированные MRC1+ CCL18+ M2-подобные макрофаги имеют наиболее высокую (из всех миелоидных клеток) метаболическую активность, которая снижается при применении эффективной неоадьювантной химиотерапии [101].

Таким образом, омиксные технологии — это мощнейший и неотъемлемый инструмент современных онкологических исследований, в том числе касающихся опухолевого метаболизма. Широкое их внедрение ограничено лишь высокой стоимостью анализа.

Биохимические и физико-химические методы

Биохимические исследования метаболизма проводят на разном уровне — на молекулярном, на уровне отдельных органелл, клеток, тканей. Часто они предполагают оценку функционального состояния митохондрий. Состояние митохондрий определяют с помощью таких традиционных методов, как оценка дыхательной активности путем измерения потребления кислорода, митохондриального мембранного потенциала, экспрессии, концентрации и активности ферментных комплексов и отдельных ферментов, которые контролируют биоэнергетическую функцию. Другими параметрами при оценке метаболизма являются значение pH во внеклеточной среде или внутри клеток, продукция активных форм кислорода, поглощение глюкозы, продукция лактата и АТФ, соотношение $NAD^+/NADH$, определение редокс-потенциала и др. На рынке представлено большое количество наборов для определения различных аналитов в биологических средах и клеточных культурах с помощью колориметрических и люминесцентных методов,

а также приборов-анализаторов клеточного метаболизма для комплексной оценки сразу нескольких показателей (например, системы Seahorse компании “Agilent”, Vi-CELL MetaFLEX от “Beckman Counter”) [101–103].

Ввиду простоты и доступности, эти методики широко используются в экспериментальных исследованиях, но они применимы только в условиях *in vitro* – на выделенной митохондриальной фракции или культуре клеток, реже на тканевых срезах, что ограничивает их распространение [104–111]. Интерпретация таких данных, учитывая нарушения целостности ткани и оценку метаболических показателей клеток вне организма, требует осторожности, а сами методы мало пригодны для изучения метаболической гетерогенности.

Особую группу инструментов для изучения метаболизма представляют химические и генетически кодируемые сенсоры, которые подходят как для *in vitro* задач, так и для неинвазивного наблюдения изучаемого параметра в опухолях животных *in vivo* с помощью оптического (флуоресцентного, фосфоресцентного или биолюминесцентного) биоимиджинга [112, 113]. Ряд исследований, включая работу нашего коллектива, показывает возможность *in vivo* визуализации с помощью соответствующих сенсоров некоторых параметров, связанных с метаболизмом, например, уровня кислорода, рН цитозоля, поглощения глюкозы [114–118]. Однако сложности, связанные с доставкой сенсоров в опухоль, с количественной оценкой и калибровкой сигнала, низким разрешением оптических изображений в случае имиджинга в макромасштабе, затрудняют изучение гетерогенности опухолей с использованием этих методов.

Иммуногистохимия

Иммуногистохимическим методом (ИГХ) определяют экспрессию клеточного или тканевого компонента (антигена) в гистологических срезах с помощью специфических антител [119]. С помощью иммуногистохимического окрашивания можно выявлять различные белки-маркеры метаболизма опухолей: транспортеры глюкозы (GLUT), лактатдегидрогеназу (LDH), изоцитратдегидрогеназу (IDH), индуцируемые гипоксией факторы (HIF), монокарбоксилатные переносчики (MCT), карбоангидразы (CA) и др.

Из них ИГХ IDH рутинно используется в клинической диагностике глиальных опухолей мозга. Наличие мутации *IDH (IDH1mut)* в глиомах высокой степени злокачественности считается благоприятным прогностическим фактором. Фермент IDH катализирует превращение изоцитрата в α -кетоглутарат, а мутация в соответствующем гене приводит к нарушению ферментативной активности

и образованию из α -кетоглутарата 2-гидрокси-глутарата, который является онкометаболитом. Помимо изменения эпигенетического профиля клеток, мутация в гене *IDH* индуцирует множество метаболических перестроек. Опухоли с мутантным геном *IDH* метаболически менее активны, имеют низкий уровень АТФ, сниженный метаболизм глутамин, в них нарушен биосинтез жирных кислот [120]. Опухоли с *IDH* дикого типа характеризуются более высоким уровнем поглощения глюкозы и образования лактата, повышенным уровнем глутамата [121].

ИГХ позволяет выявлять пространственную неоднородность экспрессии различных метаболических маркеров опухолей и изменение уровня экспрессии по мере роста опухоли. Так, например, изучение экспрессии транспортера глюкозы GLUT1 и переносчика глутамин SLC1A5 в опухолях пациентов методом ИГХ [122] привело к обнаружению различий в метаболизме глюкозы и глутамин в аденокарциноме и плоскоклеточном раке легкого. С помощью ИГХ-анализа экспрессии MCT-1 и MCT-4 в клетках плоскоклеточного рака шейки матки показано увеличение экспрессии MCT-4 по мере прогрессирования злокачественного новообразования [123]. Возможность использования ИГХ для оценки внутриопухолевой метаболической гетерогенности показана также на примере лимфом [124, 125]. Исследуемые образцы окрашивали на три метаболических маркера: MCT-4 – маркер гликолиза, MCT-1 и TOMM20 – маркеры окислительного метаболизма, и обнаружили метаболический симбиоз между окислительными опухолевыми клетками (экспрессируют MCT-1 и TOMM20) и гликолитическими стромальными клетками (MCT-4).

Хотя метод ИГХ получил широкое применение в диагностической практике в качестве дополнения к стандартному морфологическому исследованию, для оценки метаболических маркеров в опухолях (за исключением IDH) он используется редко и в сугубо научных задачах. Причины тому – длительность и высокая стоимость анализа, низкая информативность, субъективность и ограниченная способность количественной оценки уровня белка, отсутствие стандартов окрашивания.

Оптический метаболический имиджинг и FLIM

Метаболический статус клеток и тканей можно визуализировать также с помощью оптических методов – флуоресцентной микроскопии и макроимиджинга с временным разрешением (FLIM) [126, 127]. Этот подход основан на регистрации автофлуоресценции эндогенных кофакторов из классов пиридинов (NADH и NADPH, суммарно обозначаемые как NAD(P)H) и флавинов (FAD и FMN), участвующих в качестве переносчиков

электронов в различных биохимических реакциях, прежде всего в энергетическом обмене. Из метаболических кофакторов в опухолевых клетках наиболее представлены NADH и FAD. К достоинствам оптического метаболического имиджинга относятся неинвазивность, возможность проведения исследования на живых клетках без применения экзогенных красителей в динамике, быстрое получение информации о метаболическом статусе. Благодаря этому методы оптического метаболического имиджинга получают все большее признание.

Метаболизм оценивают либо по соотношению интенсивностей флуоресценции NAD(P)H и флавинов или редокс-отношения, либо путем анализа времени жизни их флуоресценции. Принцип оценки редокс-состояния митохондрий по интенсивности флуоресценции NAD(P)H и флавопротеинов предложен американским биохимиком и биофизиком Бриттоном Чансом (Britton Chance) в 1960-х гг. и используется до сих пор [128]. Оптическое редокс-отношение фактически является аналогом традиционного отношения $NAD^+/NADH$ — индикатора окислительно-восстановительного статуса. Так как NADH ассоциирован с гликолизом, а флавиновые кофакторы — с окислительным метаболизмом, изменение баланса между этими процессами будет приводить к изменению редокс-отношения. В типичном случае в гликолитических клетках редокс-отношение NAD(P)H/FAD выше, чем в клетках с окислительным метаболизмом [129]. Стоит, однако, отметить, что основанное на интенсивности флуоресценции редокс-отношение применяется в монослойных клеточных культурах, тогда как его измерение в многоклеточных структурах и тканях проблематично из-за артефактов, связанных с рассеянием света и архитектурой клеток.

Время жизни флуоресценции кофакторов зависит от состояния, в котором они находятся. NADH присутствует в клетке в двух формах: свободной, которая локализуется в цитозоле и ассоциирована с гликолизом, и связанной с белками, ассоциированной с митохондриальным дыханием [130, 131]. Время жизни свободной формы NADH составляет ~0.4 нс, связанной ~1.7–3.0 нс в зависимости от связывающих ферментов. Фосфорилированная форма NADH — NADPH, характеризуется более длинным временем жизни ~4.4 нс, но содержание этой формы в опухолевых клетках значительно ниже, чем NADH, и в обычных условиях недостаточно для регистрации оптическим методом [132]. Флавиновые кофакторы FAD и FMN связаны с ферментами митохондрий — флавопротеинами, большинство из которых тушат их флуоресценцию, что приводит к уменьшению времени жизни. Так что большая часть кофактора FAD имеет короткое время жизни ~0.4 нс, а меньшая фракция ~2.5 нс. Время жизни флуорес-

ценции FMN гораздо длиннее (~7.0 нс). Вероятность тушения определяется конформацией кофактора в составе белкового комплекса (закрытая с коротким временем жизни или открытая — с длинным). Поскольку разные формы кофакторов вовлечены в разные метаболические пути клетки, метод FLIM позволяет регистрировать относительные изменения метаболического профиля. Так, клетки с гликолитическим метаболизмом характеризуются более высоким вкладом свободного NAD(P)H и закрытого FAD в затухание флуоресценции, чем клетки с окислительным метаболизмом [133]. К настоящему времени интерпретация данных FLIM NAD(P)H более понятна и доказательна, тогда как результаты FLIM флавинов не всегда однозначны. Необходимо учитывать вклад FMN и участие FAD в других процессах, помимо энергетического метаболизма.

К преимуществам определения времени жизни перед измерением интенсивности флуоресценции относится независимость от концентрации флуорофора, конфигурации системы детекции сигнала, геометрии объекта, что позволяет исследовать как клеточные культуры, так и ткани, включая опухоли *in vivo* [134].

Целый ряд исследований, включая работы нашей группы, показывает возможности FLIM для наблюдения внутри- и межопухолевой гетерогенности метаболизма, а также метаболических переключений при изменении условий микроокружения или при терапевтических воздействиях. Так, Druzhkova и соавт. культивировали совместно клетки HeLa рака шейки матки и фибробласты человека и наблюдали с помощью FLIM NAD(P)H и FAD сдвиг метаболизма опухолевых клеток в сторону гликолиза, а фибробластов — в сторону окислительного фосфорилирования [135]. Ожидаемый переход на более гликолитический тип метаболизма зарегистрирован с помощью FLIM NAD(P)H в монослойной культуре опухолевых клеток и в многоклеточных сфероидах при моделировании гипоксии [116]. Сами опухолевые сфероиды могут быть метаболически гетерогенными [136, 137]: параметры затухания флуоресценции NAD(P)H клеток наружной пролиферирующей зоны сфероида указывают на сдвиг их метаболизма в сторону гликолиза по сравнению с покоящимися клетками внутри сфероида.

В недавнем исследовании мы сравнили оптические метаболические показатели “библиотечных” линий колоректального рака, полученных из них опухолевых ксенографтов и операционных образцов колоректальных опухолей пациентов (рис. 2). Путем по клеточного анализа микроскопических FLIM-изображений установлено, что вариабельность времени жизни флуоресценции NAD(P)H в опухолях человека значительно выше, чем в клеточных линиях и опухолях мышей.

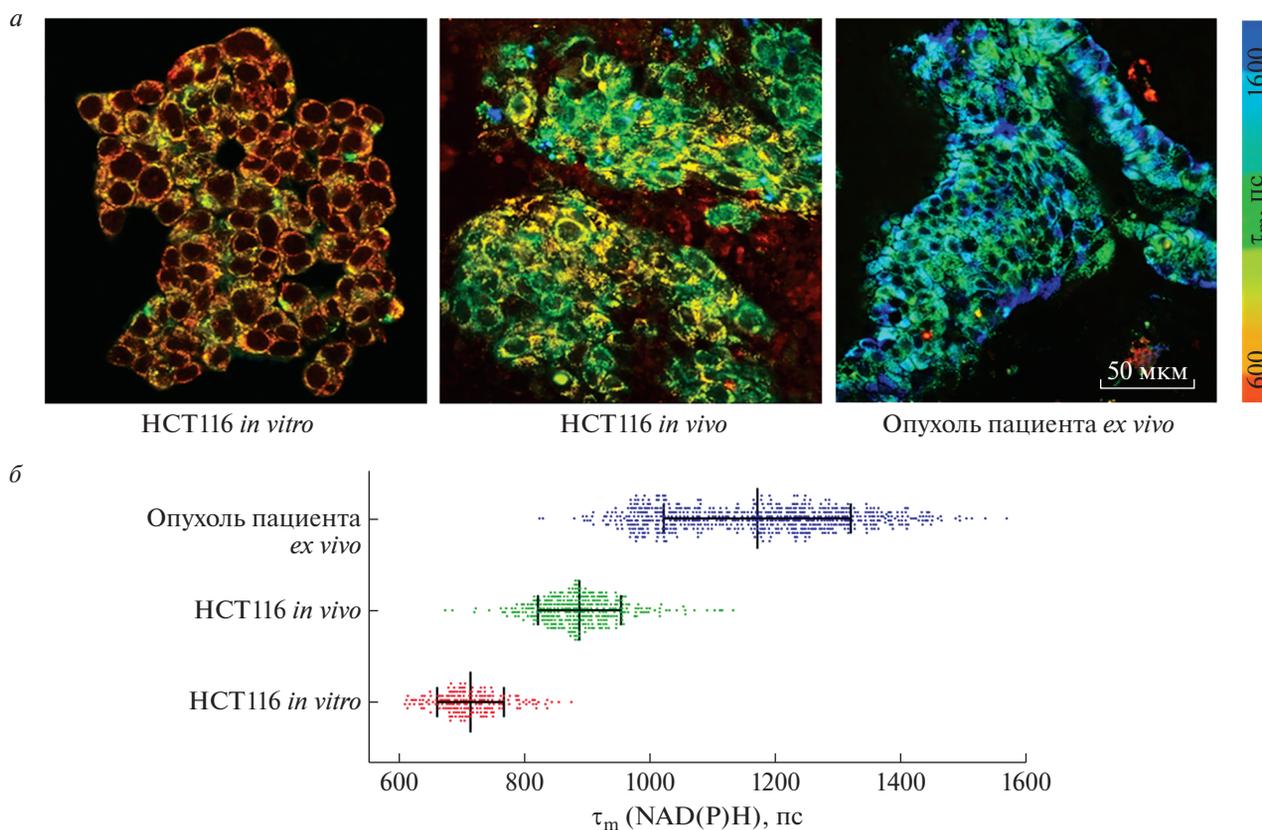


Рис. 2. FLIM-микроскопия кофактора NAD(P)H в опухолевых клетках и тканях. *a* – Репрезентативные изображения клеточной культуры колоректального рака HCT116, опухоли HCT116 у мыши *in vivo* и образца колоректальной опухоли, полученного от пациента. Размер изображений 256×256 мкм. *б* – Диаграммы распределения среднего времени жизни флуоресценции (τ_m) в отдельных клетках, среднее значение и стандартное отклонение. Возбуждение: 750 нм, прием сигнала: 450–490 нм.

Ранее была обнаружена метаболическая гетерогенность клеток первичных опухолевых культур, полученных из образцов опухолей, что отличало их от генетически и фенотипически однородных клеточных линий [138]. Интересно, что метаболическая неоднородность присуща и опухолевым ксенографтам, полученным из одной и той же опухоли, что проявляется в виде межопухолевых различий [139]. Эти наблюдения позволяют заключить, что метаболическая гетерогенность опухолей в значительной степени детерминирована свойствами самих опухолевых клеток, т.е. внутренними, (эпи)генетическими факторами.

Внутриопухолевая гетерогенность может быть причиной низкой эффективности лечения или может развиваться в результате лечения и способствовать приобретению резистентности, поэтому большое внимание уделяется изучению гетерогенности при лекарственных воздействиях. С помощью FLIM показан гетерогенный метаболический ответ линий клеток колоректального рака HCT116 на воздействие 5-фторурацила [138], рака молочной железы PyVmT – паклитаксела [140] и

опухолевых органоидов плоскоклеточного рака гортани на воздействие цетуксимаба и цисплатина [71]. На органоидах из протоковой аденокарциномы поджелудочной железы пациентов выявлена внутриопухолевая гетерогенность ответа на терапию рядом противоопухолевых препаратов (гемцитабин, ингибиторы JAK2, MEK, PI3K и их комбинация) [141]. На примере органоидов из ксенотрансплантатов рака молочной железы показана межопухолевая гетерогенность ответа на терапию паклитакселом и тамоксифеном [142]. В работе Sharick и соавт., выполненной на пациент-специфичных органоидах рака молочной железы и рака поджелудочной железы, развитие метаболической гетерогенности при химиотерапии коррелировало с неблагоприятным клиническим исходом [143].

В некоторых работах показана связь исходной клеточной метаболической гетерогенности со слабым ответом на противоопухолевую терапию. Так, например, Shirshin и соавт. показано, что гетерогенные первичные культуры опухолевых клеток не отвечали на воздействие 5-фторурацила в

Таблица 1. Методы исследования метаболизма опухолей и их возможности в оценке метаболической гетерогенности

Метод	Принцип метода	Особенности метода	Уровень исследования	Возможность анализа метаболической гетерогенности (межопухолевой/внутриопухолевой)	Область приложения
ПЭТ	Регистрация излучения позитронов от радионуклидов	Использование меченой глюкозы или аминокислот, оценка их накопления и распределения в опухоли	Организм, целая опухоль	+/ \pm (возможна визуализация зон внутри опухоли с низким разрешением)	Клиническая диагностика
МРТ, МРС	Измерение электромагнитного отклика атомных ядер в сильном магнитном поле	Регистрация сигнала эндогенных (^1H , ^{31}P) или экзогенно введенных (^{13}C) изотопов, широкая панель анализируемых метаболитов	Организм, целая опухоль	+/ \pm (возможна визуализация зон внутри опухоли с низким разрешением)	Клиническая диагностика
ОМИКС	Высокоинформативный геномный, транскриптомный, метаболомный, протеомный или липидомный анализ	Полное генетическое и молекулярное профилирование клеток, большой массив данных, анализ методами биоинформатики	Генетический, молекулярный	+/ \pm (возможен методами секвенирования ДНК и РНК одиночных клеток)	Научные исследования
ИГХ	Определение антигенов в гистологических срезах с помощью специфических меченых антител и световой или флуоресцентной микроскопии	Выявление экспрессии белков-маркеров метаболизма (ферментов, сигнальных молекул и др.)	Тканевой	+/+	Клиническая диагностика
Биохимический анализ	Определение различных аналитов с помощью колориметрических и люминесцентных методов	Оценка дыхания клеток, активности ферментов, определение отдельных метаболитов	Молекулярный, функциональный	-/-	Научные исследования
FLIM	Получение флуоресцентных микроскопических или макро-изображений, определение времени затухания флуоресценции	Анализ автофлуоресценции метаболитов NAD(P)H и FAD, оценка редокс-статуса и относительных изменений в метаболитических путях	Целая опухоль или ее часть, клеточный	+/+	Научные исследования

отличие от метаболически однородных популяций [138]. Метаболическая гетерогенность органоидов из нейроэндокринных опухолей пациентов также была признаком устойчивости к различным препаратам [144]. Эти исследования показывают, что метаболическая гетерогенность на клеточном уровне может иметь прогностическое значение.

Обобщающая характеристика методов исследования опухолевого метаболизма представлена в табл. 1.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На сегодняшний день метаболическая гетерогенность опухолей является общепризнанным, но малоизученным феноменом. Существует множество теорий о причинах метаболической гетерогенности опухолей, связывающих ее с генетическими факторами, эпигенетическим контролем, особенностями микроокружения, наличием ОСК, степенью дифференцировки опухолевых клеток и их пролиферативной активностью и так далее. При этом имеет место метаболическая пла-

стичность, т.е. обратимое переключение различных метаболических путей (например, аэробного гликолиза на окислительное фосфорилирование и наоборот). Поскольку метаболические перестройки сопутствуют всем проявлениям опухолевой прогрессии и ответу на терапию, межопухолевые и внутриопухолевые метаболические отличия создают серьезные сложности при лечении.

Оценка опухолевого метаболизма или отдельных метаболических маркеров, например, с помощью ПЭТ с ^{18}F -ФДГ, МРС, ИГХ на IDH1/2 давно используется для диагностики и прогнозирования заболевания, а в некоторых случаях — для мониторинга эффективности лечения. Так что межопухолевые отличия и изменения метаболизма опухоли при ответе на терапию хорошо задокументированы.

Внутриопухолевая метаболическая гетерогенность в отличие от межопухолевой, гораздо менее исследована. Отчасти это связано с отсутствием до недавнего времени высокочувствительных и доступных методов ее наблюдения и количественной оценки на клеточном уровне. Развитие методов ДНК- и РНК-секвенирования одиночных клеток значительно расширило представления о внутриопухолевой гетерогенности в целом и ее метаболических аспектах. Перспективным современным методом метаболической визуализации является FLIM автофлуоресценции клеток и тканей, который уже зарекомендовал себя для наблюдения клеточной метаболической гетерогенности в опухолях. Отсутствие пробоподготовки и необходимости в дополнительной окраске ткани, высокое пространственное разрешение и молекулярная специфичность, быстрота получения данных делают этот метод привлекательным не только для фундаментальных исследований, но и для внедрения в клинику.

Можно ожидать, что дальнейшие исследования опухолевого метаболизма позволят сформулировать новые прогностические критерии на основе оценки клеточной гетерогенности.

Авторы благодарят сотрудников НИИ ЭО и БМТ ПИМУ И.Н. Дружкову, А.М. Можерова, В.И. Щеславского за помощь в экспериментах и полезные обсуждения, врача-онколога НОКОД В.М. Терехова за предоставление клинического материала.

Работа поддержана Российским научным фондом (соглашение № 22-64-00057).

Настоящая работа выполнена без привлечения людей и животных в качестве объектов исследования.

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Viale A., Corti D., Draetta G.F. (2015) Tumors and mitochondrial respiration: a neglected connection. *Cancer Res.* **75**, 3687.
- Bensinger S.J., Christofk H.R. (2012) New aspects of the Warburg effect in cancer cell biology. *Semin. Cell Dev. Biol.* **23**, 352–361.
- Solaini G., Sgarbi G., Baracca A. (2011) Oxidative phosphorylation in cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) – Bioenerg.* **1807**, 534–542.
- Cluntun A.A., Lukey M.J., Cerione R.A., Locasale J.W. (2017) Glutamine metabolism in cancer: understanding the heterogeneity. *Trends Cancer.* **3**, 169–180.
- Cao Y. (2019) Adipocyte and lipid metabolism in cancer drug resistance. *J. Clin. Invest.* **129**, 3006–3017.
- Герашенко Т.С., Денисов Е.В., Литвяков Н.В., Завьялова М.В., Вторушин С.В., Цыганов М.М., Перельмутер В.М., Чердынцева Н.В. (2013) Внутриопухолевая гетерогенность: природа и биологическое значение. *Биохимия.* **78**, 1531–1549.
- Nassar A., Radhakrishnan A., Cabrero I.A., Cotsonis G.A., Cohen C. (2010) Intratumoral heterogeneity of immunohistochemical marker expression in breast carcinoma: a tissue microarray-based study. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* **18**, 433–441.
- Somasundaram R., Villanueva J., Herlyn M. (2012) Intratumoral heterogeneity as a therapy resistance mechanism. *Adv. Pharmacol.* **65**, 335–359.
- Fisher R., Pusztai L., Swanton C. (2013) Cancer heterogeneity: implications for targeted therapeutics. *Br. J. Cancer.* **108**, 479–585.
- Prasetyanti P.R., Medema J.P. (2017) Intra-tumor heterogeneity from a cancer stem cell perspective. *Mol. Cancer.* **16**, 41.
- Marusyk A., Polyak K. (2010) Tumor heterogeneity: causes and consequences. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) – Rev. Cancer.* **1805**, 105–117.
- McGranahan N., Swanton C. (2017) Clonal heterogeneity and tumor evolution: past, present, and the future. *Cell.* **168**, 613–628.
- Allis C.D., Jenuwein T. (2016) The molecular hallmarks of epigenetic control. *Nat. Rev. Genet.* **17**, 487–500.
- Kim J., DeBerardinis R.J. (2019) Mechanisms and implications of metabolic heterogeneity in cancer. *Cell Metabolism.* **30**, 434–446.
- Чехун В.Ф., Шербан С.Д., Савцова З.Д. (2012) Гетерогенность опухоли — динамичное состояние. *Онкология.* **14**, 4–12.
- Hanahan D., Weinberg R.A. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* **144**, 646–674.
- Clevers H. (2011) The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nat. Med.* **17**, 313–319.
- Murata M. (2018) Inflammation and cancer. *Environ. Health Preventive Med.* **23**, 50.
- Xiao Z., Dai Z., Locasale J.W. (2019) Metabolic landscape of the tumor microenvironment at single cell resolution. *Nat. Commun.* **10**, 3763.
- Balkwill F., Mantovani A. (2001) Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet.* **357**, 539–545.

21. Korkaya H., Kim G.I., Davis A., Malik F., Henry N.L., Ithimakin S., Quraishi A.A., Tawakkol N., D'Angelo R., Paulson A.K., Chung S., Luther T., Pahlak H.J., Liu S., Hassan K.A., Zen Q., Clouthier S.G., Wicha M.S. (2012) Activation of an IL6 inflammatory loop mediates trastuzumab resistance in HER2⁺ breast cancer by expanding the cancer stem cell population. *Mol. Cell.* **47**, 570–584.
22. Бросалов В.М., Судапина А.Р., Микуляк Н.И. (2020) Клональная эволюция рака молочной железы: современные перспективы давней теории (обзор литературы). *Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки.* **2**, 109–119.
23. Michor F., Polyak K. (2010) The origins and implications of intratumor heterogeneity. *Cancer Prevention Res.* **3**, 1361–1364.
24. Warmoes M.O., Locasale J.W. (2014) Heterogeneity of glycolysis in cancers and therapeutic opportunities. *Biochem. Pharmacol.* **92**, 12–21.
25. Diaz-Ruiz R., Rigoulet M., Devin A. (2011) The Warburg and Crabtree effects: on the origin of cancer cell energy metabolism and of yeast glucose repression. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) – Bioenergetics.* **1807**, 568–576.
26. Vander Heiden M.G., Cantley L.C., Thompson C.B. (2009) Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science.* **324**, 1029–1033.
27. Stern R., Shuster S., Neudecker B.A., Formby B. (2002) Lactate stimulates fibroblast expression of hyaluronan and CD44: the Warburg effect revisited. *Exp. Cell Res.* **276**, 24–31.
28. Sonveaux P., Copetti T., De Saedeleer C.J., Végran F., Verrax J., Kennedy K.M., Moon E.J., Dhup S., Danhier P., Frérart F., Gallez B., Ribeiro A., Michiels C., Dewhirst M.W., Feron O. (2012) Targeting the lactate transporter MCT1 in endothelial cells inhibits lactate-induced HIF-1 activation and tumor angiogenesis. *PLoS One.* **7**, e33418.
29. Cairns R.A., Harris I.S., Mak T.W. (2011) Regulation of cancer cell metabolism. *Nat. Rev. Cancer.* **11**, 85–95.
30. Lunt S.Y., Vander Heiden M.G. (2011) Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **27**, 441–464.
31. Cantor J.R., Sabatini D.M. (2012) Cancer cell metabolism: one hallmark, many faces. *Cancer Discov.* **2**, 881–898.
32. Smolková K., Bellance N., Scandurra F., Génot E., Gnaiger E., Plecítá-Hlavatá L., Ježek P., Rossignol R. (2010) Mitochondrial bioenergetic adaptations of breast cancer cells to aglycemia and hypoxia. *J. Bioenerg. Biomembr.* **42**, 55–67.
33. Pavlova N.N., Thompson C.B. (2016) The emerging hallmarks of cancer metabolism. *Cell Metabolism.* **23**, 27–47.
34. Sengupta D., Pratz G. (2016) Imaging metabolic heterogeneity in cancer. *Mol. Cancer.* **15**, 4.
35. Sancho P., Barneda D., Heeschen C. (2016) Hallmarks of cancer stem cell metabolism. *Br. J. Cancer.* **114**, 1305–1312.
36. Ganapathy-Kanniappan S. (2018) Molecular intricacies of aerobic glycolysis in cancer: current insights into the classic metabolic phenotype. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **53**, 667–682.
37. Seth Nanda C., Venkateswaran S.V., Patani, N., Yuneva M. (2020) Defining a metabolic landscape of tumours: genome meets metabolism. *Br. J. Cancer.* **122**, 136–149.
38. Harami-Papp H., Pongor L.S., Munkacsy G., Horvath G., Nagy A.M., Ambrus A., Hauser P., Szabo A., Tretter L., Gyorffy, B. (2016) TP53 mutation hits energy metabolism and increases glycolysis in breast cancer. *Oncotarget.* **7**, 67183–67195.
39. Zhang X., Wang J., Zhuang J., Liu C., Gao C., Li H., Ma X., Li J., Sun C. (2021) A novel glycolysis-related four-mRNA signature for predicting the survival of patients with breast cancer. *Front. Genet.* **12**, 606937.
40. Farhadi P., Yarani R., Valipour E., Kiani S., Hoseinkhani Z., Mansouri K. (2022) Cell line-directed breast cancer research based on glucose metabolism status. *Biomed. Pharmacotherapy.* **146**, 112526.
41. The Cancer Genome Atlas Research Network (2014) Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature.* **511**, 543–550.
42. Romero R., Sayin V.I., Davidson S.M., Bauer M.R., Singh S.X., LeBoeuf S.E., Karakousi T.R., Ellis D.C., Bhutkar A., Sánchez-Rivera F.J., Subbaraj L., Martinez B., Bronson R.T., Prigge J.R., Schmidt E.E., Thomas C.J., Goparaju C., Davies A., Dolgalev I., Heguy A., Allaj V., Poirier J.T., Moreira A.L., Rudin C.M., Pass H.I., Vander Heiden M.G., Jacks T., Papagiannakopoulos T. (2017) Keap1 loss promotes Kras-driven lung cancer and results in dependence on glutaminolysis. *Nat. Med.* **23**, 1362–1368.
43. Yuneva M.O., Fan T.W., Allen T.D., Higashi R.M., Ferraris D.V., Tsukamoto T., Matés J.M., Alonso F.J., Wang C., Seo Y., Chen X., Bishop J.M. (2012) The metabolic profile of tumors depends on both the responsible genetic lesion and tissue type. *Cell Metabolism.* **15**, 157–170.
44. Patra S., Elahi N., Armorer A., Arunachalam S., Omala J., Hamid I., Ashton A.W., Joyce D., Jiao X., Pestell R.G. (2021) Mechanisms governing metabolic heterogeneity in breast cancer and other tumors. *Front. Oncol.* **11**, 700629.
45. Goel A., Mathupala S.P., Pedersen P.L. (2003) Glucose metabolism in cancer. *J. Biol. Chem.* **278**, 15333–15340.
46. Chen M., Zhang J., Li N., Qian Z., Zhu M., Li Q., Zheng J., Wang X., Shi G. (2011) Promoter hypermethylation mediated downregulation of FBP1 in human hepatocellular carcinoma and colon cancer. *PLoS One.* **6**, e25564.
47. Jose C., Bellance N., Rossignol R. (2011) Choosing between glycolysis and oxidative phosphorylation: a tumor's dilemma? *Biochim. Biophys. Acta (BBA) – Bioenergetics.* **1807**, 552–561.
48. Hill R.P., De Jaeger K., Jang A., Cairns R. (2008) pH, hypoxia and metastasis. *Novartis Found. Symp.* **240**, 154–168.

49. Masson N., Ratcliffe P.J. (2014) Hypoxia signaling pathways in cancer metabolism: the importance of co-selecting interconnected physiological pathways. *Cancer Metab.* **2**, 3.
50. Muz B., de la Puente P., Azab F., Azab A.K. (2015) The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. *Hypoxia.* **3**, 83–92.
51. Kierans S.J., Taylor C.T. (2021) Regulation of glycolysis by the hypoxia-inducible factor (HIF): implications for cellular physiology. *J. Physiol.* **599**, 23–37.
52. Korbecki J., Simińska D., Gąsowska-Dobrowolska M., Listos J., Gutowska I., Chlubek D., Baranowska-Bosiacka I. (2021) Chronic and cycling hypoxia: drivers of cancer chronic inflammation through HIF-1 and NF-κB activation: a review of the molecular mechanisms. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 10701.
53. Vogelstein B., Kinzler K.W. (2004) Cancer genes and the pathways they control. *Nat. Med.* **10**, 789–799.
54. Wieman H.L., Wofford J.A., Rathmell J.C. (2007) Cytokine stimulation promotes glucose uptake via phosphatidylinositol-3 kinase/Akt regulation of Glut1 activity and trafficking. *MBoC.* **18**, 1437–1446.
55. Wise D.R., DeBerardinis R.J., Mancuso A., Sayed N., Zhang X.Y., Pfeiffer H.K., Nissim I., Daikhin E., Yudkoff M., McMahon S.B., Thompson C.B. (2008) Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **105**, 18782–18787.
56. Gao P., Tchernyshyov I., Chang T.C., Lee Y.S., Kita K., Ochi T., Zeller K.I., De Marzo A.M., Van Eyk J.E., Mendell J.T., Dang C.V. (2009) c-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism. *Nature.* **458**, 762–765.
57. Reynolds M.R., Lane A.N., Robertson B., Kemp S., Liu Y., Hill B.G., Dean D.C., Clem B.F. (2014) Control of glutamine metabolism by the tumor suppressor Rb. *Oncogene.* **33**, 556–566.
58. Méndez-Lucas A., Lin W., Driscoll P.C., Legrave N., Novellasdemunt L., Xie C., Charles M., Wilson Z., Jones N.P., Rayport S., Rodríguez-Justo M., Li V., MacRae J.I., Hay N., Chen X., Yuneva M. (2020) Identifying strategies to target the metabolic flexibility of tumours. *Nat. Metabolism.* **2**, 335–350.
59. Yoshida G.J. (2015) Metabolic reprogramming: the emerging concept and associated therapeutic strategies. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **34**, 111.
60. Sonveaux P., Végran F., Schroeder T., Wergin M.C., Verrax J., Rabbani Z.N., De Saedeleer C.J., Kennedy K.M., Diepart C., Jordan B.F., Kelley M.J., Gallez B., Wahl M.L., Feron O., Dewhirst M.W. (2008) Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. *J. Clin. Invest.* **118**(12), 3930–3942.
61. Мещерякова О.В., Чурова М.В., Немова Н.Н. (2010) Митохондриальный лактат-окисляющий комплекс и его значение для поддержания энергетического гомеостаза клеток. *Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов: сборник научных статей.* Петрозаводск: Карельский научный центр РАН. 163–171.
62. Stine Z.E., Walton Z.E., Altman B.J., Hsieh A.L., Dang C.V. (2015) MYC, metabolism, and cancer. *Cancer Discov.* **5**, 1024–1039.
63. Gordan J.D., Thompson C.B., Simon M.C. (2007) HIF and c-Myc: sibling rivals for control of cancer cell metabolism and proliferation. *Cancer Cell.* **12**, 108–113.
64. Pavlides S., Whitaker-Menezes D., Castello-Cros R., Flomenberg N., Witkiewicz A.K., Frank P.G., Casimiro M.C., Wang C., Fortina P., Addya S., Pestell R.G., Martinez-Outschoorn U.E., Sotgia F., Lisanti M.P. (2009) The reverse Warburg effect: aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma. *Cell Cycle.* **8**, 3984–4001.
65. Dong C., Yuan T., Wu Y., Wang Y., Fan T.W., Miriyala S., Lin Y., Yao J., Shi J., Kang T., Lorkiewicz P., St Clair D., Hung M.C., Evers B.M., Zhou B.P. (2013) Loss of FBPI by snail-mediated repression provides metabolic advantages in basal-like breast cancer. *Cancer Cell.* **23**, 316–331.
66. Shen Y.-A., Wang C.-Y., Hsieh Y.-T., Chen Y.-J., Wei Y.-H. (2015) Metabolic reprogramming orchestrates cancer stem cell properties in nasopharyngeal carcinoma. *Cell Cycle.* **14**, 86–98.
67. Chen C.-L., Uthaya Kumar D.B., Punj V., Xu J., Sher L., Tahara S.M., Hess S., Machida K. (2016) Metabolically reprograms tumor-initiating stem-like cells through tumorigenic changes in oxidative phosphorylation and fatty acid metabolism. *Cell Metabolism.* **23**, 206–219.
68. Ye X.-Q., Li Q., Wang G.-H., Sun F.-F., Huang G.-J., Bian X.-W., Yu S.-C., Qian G.-S. (2011) Mitochondrial and energy metabolism-related properties as novel indicators of lung cancer stem cells. *Int. J. Cancer.* **129**, 820–831.
69. Janiszewska M., Suvà M.L., Riggi N., Houtkooper R.H., Auwerx J., Clément-Schatlo V., Radovanovic I., Rheinbay E., Provero P., Stamenkovic I. (2012) Imp2 controls oxidative phosphorylation and is crucial for preserving glioblastoma cancer stem cells. *Genes Dev.* **26**, 1926–1944.
70. Badr C.E., Silver D.J., Siebzehnrubl F.A., Deleyrolle L.P. (2020) Metabolic heterogeneity and adaptability in brain tumors. *Cell. Mol. Life Sci.* **77**, 5101–5119.
71. Shah A.T., Diggins K.E., Walsh A.J., Irish J.M., Skala M.C. (2015) *In vivo* autofluorescence imaging of tumor heterogeneity in response to treatment. *Neoplasia.* **17**, 862–870.
72. Haffner M.C., Zwart W., Roudier M.P., True L.D., Nelson W.G., Epstein J.I., De Marzo A.M., Nelson P.S., Yegnasubramanian S. (2021) Genomic and phenotypic heterogeneity in prostate cancer. *Nat. Rev. Urol.* **18**, 79–92.
73. Тлостанова М.С. (2014) Эффективность применения позитронной эмиссионной томографии с ¹⁸F-фтордезоксиглюкозой, ¹¹C-метионином и ⁸²Rb-хлоридом в дифференциальной диагностике опухолевых и некоторых воспалительных забо-

- леваний легких. *Современные технологии в медицине*. 6, 45–50.
74. Ивашенко И.М., Шнякин П.Г., Катаева А.А., Павлова И.С., Григорян К.В., Ширванян М.А. (2018) Возможности позитронно-эмиссионной томографии в диагностике злокачественных опухолей головного мозга (обзор литературы). *В мире научных открытий*. 10, 72–87.
 75. Shen B., Huang T., Sun Y., Jin Z., Li X.F. (2017) Revisit 18F-fluorodeoxyglucose oncology positron emission tomography: “systems molecular imaging” of glucose metabolism. *Oncotarget*. 8(26), 43536–43542.
 76. Yao Y., Li Y.-M., He Z.-X., Civelek A.C., Li X.-F. (2021) Likely common role of hypoxia in driving ¹⁸F-FDG uptake in cancer, myocardial ischemia, inflammation and infection. *Cancer Biother. Radiopharmaceut.* 36, 624–631.
 77. Kaira K., Shimizu K., Kitahara S., Yajima T., Atsumi J., Kosaka T., Ohtaki Y., Higuchi T., Oyama T., Asao T., Mogi A. (2018) 2-Deoxy-2-[fluorine-18] fluoro-*d*-glucose uptake on positron emission tomography is associated with programmed death ligand-1 expression in patients with pulmonary adenocarcinoma. *Eur. J. Cancer*. 101, 181–190.
 78. Li X.-F., Du Y., Ma Y., Postel G.C., Civelek A.C. (2014) 18F-fluorodeoxyglucose uptake and tumor hypoxia: revisit ¹⁸F-fluorodeoxyglucose in oncology application. *Transl. Oncol.* 7, 240–247.
 79. Skvortsova T.Yu., Savintceva Z.I., Zakhs D.V., Tyurin R.V., Gurchin A.F., Kholyavin A.I., Trofimova T.N. (2021) Comparison of amino acid radiotracers *L*-[methyl-¹¹C]methionine and *O*-2-[¹⁸F]fluoroethyl-*L*-tyrosine for PET/CT imaging of cerebral gliomas. *Diagnostic Radiol. Radiother.* 12, 49–58.
 80. Mittra E.S., Koglin N., Mosci C., Kumar M., Hoehne A., Keu K.V., Iagaru A. H., Mueller A., Berndt M., Bullich S., Friebe M., Schmitt-Willich H., Gekeler V., Fels L.M., Bacher-Stier C., Moon D.H., Chin F.T., Stephens A.W., Dinkelborg L.M., Gambhir S.S. (2016) Pilot preclinical and clinical evaluation of (4*S*)-4-(3-[¹⁸F]fluoropropyl)-*L*-glutamate (¹⁸F-FSPG) for PET/CT imaging of intracranial malignancies. *PLoS One*. 11, e0148628.
 81. Horiguchi K., Tosaka M., Higuchi T., Arisaka Y., Sugawara K., Hirato J., Yokoo H., Tsushima Y., Yoshimoto Y. (2017) Clinical value of fluorine-18α-methyltyrosine PET in patients with gliomas: comparison with fluorine-18 fluorodeoxyglucose PET. *EJN-MMI Res.* 7, 50.
 82. Tepede A.A., Welch J., Lee M., Mandl A., Agarwal S.K., Nilubol N., Patel D., Cochran C., Simonds W.F., Weinstein L.S., Jha A., Millo C., Pacak K., Blau J.E. (2020) ¹⁸F-FDOPA PET/CT accurately identifies MEN1-associated pheochromocytoma. *Endocrinol. Diabetes Metab. Case Rep.* 2020, 19-0156.
 83. Crippa F., Alessi A., Serafini G.L. (2012) PET with radiolabeled aminoacid. *Quarterly J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 56, 151–162.
 84. Бакунович А.В., Сеницын В.Е., Мершина Е.А. (2014) Клиническое применение протонной магнитно-резонансной спектроскопии при опухолях головного мозга и прилежащих тканей. *Вестник рентгенологии и радиологии*. 1, 39–50.
 85. Gillies R.J., Morse D.L. (2005) *In vivo* magnetic resonance spectroscopy in cancer. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 7, 287–326.
 86. Nguyen M.L., Willows B., Khan R., Chi A., Kim L., Nour S.G., Sroka T., Kerr C., Godinez J., Mills M., Karlsson U., Altdorfer G., Nguyen N.P., Jendrsiak G. (2014) The potential role of magnetic resonance spectroscopy in image-guided radiotherapy. *Front. Oncol.* 4, 91.
 87. Peter S.B., Nandhan V.R. (2022) ³¹Phosphorus magnetic resonance spectroscopy in evaluation of glioma and metastases in 3T MRI. *Indian J. Radiol. Imaging.* 31, 873–881.
 88. Mishkovsky M., Gusyatiner O., Lanz B., Cudalbu C., Vassallo I., Hamou M.F., Bloch J., Comment A., Gruetter R., Hegi M.E. (2021) Hyperpolarized ¹³C-glucose magnetic resonance highlights reduced aerobic glycolysis *in vivo* in infiltrative glioblastoma. *Sci. Rep.* 11, 5771.
 89. Gallagher F.A., Woitek R., McLean M.A., Gill A.B., Manzano Garcia R., Provenzano E., Riemer F., Kaggie J., Chhabra A., Ursprung S., Grist J.T., Daniels C.J., Zaccagna F., Laurent M.C., Locke M., Hilborne S., Frary A., Torheim T., Bournsnel C., Schiller A., Patterson I., Slough R., Carmo B., Kane J., Biggs H., Harrison E., Deen S.S., Patterson A., Lanz T., Kingsbury Z., Ross M., Basu B., Baird R., Lomas D.J., Sala E., Wason J., Rueda O.M., Chin S.F., Wilkinson I.B., Graves M.J., Abraham J.E., Gilbert F.J., Caldas C., Brindle K.M. (2020) Imaging breast cancer using hyperpolarized carbon-13 MRI. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 117, 2092–2098.
 90. Tang S., Meng M.V., Slater J.B., Gordon J.W., Vigneron D.B., Stohr B.A., Larson P.E.Z., Wang Z.J. (2021) Metabolic imaging with hyperpolarized ¹³C pyruvate magnetic resonance imaging in patients with renal tumors – initial experience. *Cancer.* 127, 2693–2704.
 91. Nam A.S., Chaligne R., Landau D.A. (2021) Integrating genetic and non-genetic determinants of cancer evolution by single-cell multi-omics. *Nat. Rev. Genet.* 22, 3–18.
 92. Zeng D., Ye Z., Shen R., Yu G., Wu J., Xiong Y., Zhou R., Qiu W., Huang N., Sun L., Li X., Bin J., Liao Y., Shi M., Liao W. (2021) IOBR: multi-omics immuno-oncology biological research to decode tumor microenvironment and signatures. *Front. Immunol.* 12, 687975.
 93. Ding S., Chen X., Shen K. (2020) Single-cell RNA sequencing in breast cancer: understanding tumor heterogeneity and paving roads to individualized therapy. *Cancer Commun.* 40, 329–344.
 94. Lei Y., Tang R., Xu J., Wang W., Zhang B., Liu J., Yu X., Shi S. (2021) Applications of single-cell sequencing in cancer research: progress and perspectives. *J. Hematol. Oncol.* 14, 91.
 95. Yu T.J., Ma D., Liu Y.Y., Xiao Y., Gong Y., Jiang Y.Z., Shao Z.M., Hu X., Di G.H. (2021) Bulk and single-cell transcriptome profiling reveal the metabolic heterogeneity in human breast cancers. *Mol. Therapy: J. Am. Soc. Gene Therapy.* 29, 2350–2365.

96. Xiao Z., Dai Z., Locasale J.W. (2019) Metabolic landscape of the tumor microenvironment at single cell resolution. *Nat. Commun.*, **10**, 3763.
97. Kou W., Zhao N., Zhao L., Yin Z., Zhang M.C., Zhang L., Song J., Wang Y., Qiao C., Li H. (2022) Single-cell characterization revealed hypoxia-induced metabolic reprogramming of gastric cancer. *Heliyon*. **8**(11), e11866.
98. Yu Q., Jiang M., Wu L. (2022) Spatial transcriptomics technology in cancer research. *Front. Oncol.* **12**, 1019111.
99. Wu L., Yan J., Bai Y., Chen F., Xu J., Zou X., Huang A., Hou L., Zhong Y., Jing Z., Zhou X., Sun H., Cheng M., Ji Y., Luo R., Li Q., Wu L., Wang P., Guo D., Huang W., Lei J., Liao S., Li Y., Jiang Z., Yao N., Yu Y., Li Y., Liu F., Zhang M., Yang H., Yang S., Xu X., Liu L., Wang X., Wang J., Fan J., Liu S., Yang X., Chen A., Zhou J. (2021) Spatially-resolved transcriptomics analyses of invasive fronts in solid tumors. *bioRxiv*. **2021**, 10.
100. Lv J., Shi Q., Han Y., Li W., Liu H., Zhang J., Niu C., Gao G., Fu Y., Zhi R., Wu K., Li S., Gu F., Fu L. (2021) Spatial transcriptomics reveals gene expression characteristics in invasive micropapillary carcinoma of the breast. *Cell Death Dis.* **12**(12), 1095.
101. Wu Y., Yang S., Ma J., Chen Z., Song G., Rao D., Cheng Y., Huang S., Liu Y., Jiang S., Liu J., Huang X., Wang X., Qiu S., Xu J., Xi R., Bai F., Zhou J., Fan J., Zhang X., Gao Q. (2022) Spatiotemporal immune landscape of colorectal cancer liver metastasis at single-cell level. *Cancer Discov.* **12**(1), 134–153.
102. Glycolysis & Carbohydrates Assay Kits. In: *Assay Genie*. [Electronic resource]. URL: <https://www.assaygenie.com/glycolysis-and-carbohydrates-assay-kits> (accessed: 02.09.2022)
103. Leippe D., Sobol M., Vidugiris G., Cali J.J., Vidugiriene J. (2017) Bioluminescent assays for glucose and glutamine metabolism: high-throughput screening for changes in extracellular and intracellular metabolites. *SLAS Discov.* **22**, 366–377.
104. Huang S.-L., Huang Z.-C., Zhang C.-J., Xie J., Lei S.-S., Wu Y.-Q., Fan P.-Z. (2022) LncRNA SNHG5 promotes the glycolysis and proliferation of breast cancer cell through regulating BACH1 via targeting miR-299. *Breast Cancer*. **29**, 65–76.
105. Qin Y., Zheng Y., Huang C., Li Y., Gu M., Wu Q. (2021) Downregulation of miR-181b-5p inhibits the viability, migration, and glycolysis of gallbladder cancer by upregulating PDHX under hypoxia. *Front. Oncol.* **11**, 683725.
106. Zhang K., Hu H., Xu J., Qiu L., Chen H., Jiang X., Jiang Y. (2020) Circ_0001421 facilitates glycolysis and lung cancer development by regulating miR-4677-3p/CDC3A. *Diagn. Pathol.* **15**, 133.
107. Zhang Y., Gao M., Zhu M., Li H., Ma T., Wu C. (2022) Isobavachalcone induces cell death through multiple pathways in human breast cancer MCF-7 cells. *J. Southern Med. Univ.* **42**, 878–885.
108. Cargill K.R., Stewart C.A., Park E.M., Ramkumar K., Gay C.M., Cardnell R.J., Wang Q., Diao L., Shen L., Fan Y.H., Chan W.K., Lorenzi P.L., Oliver T.G., Wang J., Byers L.A. (2021) Targeting MYC-enhanced glycolysis for the treatment of small cell lung cancer. *Cancer Metab.* **9**, 33.
109. Mazurkiewicz J., Simiczjew A., Dratkiewicz E., Pietraszek-Gremplewicz K., Majkowski M., Kot M., Ziętek M., Matkowski R., Nowak D. (2022) Melanoma cells with diverse invasive potential differentially induce the activation of normal human fibroblasts. *Cell Commun. Signal.* **20**, 63.
110. Lang L., Wang F., Ding Z., Zhao X., Loveless R., Xie J., Shay C., Qiu P., Ke Y., Saba N.F., Teng Y. (2021) Blockade of glutamine-dependent cell survival augments antitumor efficacy of CPI-613 in head and neck cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **40**, 393.
111. Almouhanna F., Blagojevic B., Can S., Ghanem A., Wölfel S. (2021) Pharmacological activation of pyruvate kinase M2 reprograms glycolysis leading to TXNIP depletion and AMPK activation in breast cancer cells. *Cancer Metab.* **9**, 5.
112. Zhou X., Mehta S., Zhang J. (2020) Genetically encodable fluorescent and bioluminescent biosensors light up signaling networks. *Trends Biochem. Sci.* **45**, 889–905.
113. Zhang Z., Cheng X., Zhao Y., Yang Y. (2020) Lighting up live-cell and *in vivo* central carbon metabolism with genetically encoded fluorescent sensors. *Annu. Rev. Analyt. Chem. (Palo Alto, Calif.)*. **13**, 293–314.
114. Shirmanova M.V., Druzhkova I.N., Lukina M.M., Matlashov M.E., Belousov V.V., Snopova L.B., Prodanetz N.N., Dudenkova V.V., Lukyanov S.A., Zagaynova E.V. (2015) Intracellular pH imaging in cancer cells *in vitro* and tumors *in vivo* using the new genetically encoded sensor SypHer2. *Biochim. Biophys. Acta.* **1850**, 1905–1911.
115. Shimolina L., Potekhina E., Druzhkova I., Lukina M., Dudenkova V., Belousov V., Shcheslavskiy V., Zagaynova E., Shirmanova M. (2022) Fluorescence lifetime-based pH mapping of tumors *in vivo* using genetically encoded sensor SypHerRed. *Biophys. J.* **121**, 1156–1165.
116. Parshina Y.P., Komarova A.D., Bochkarev L.N., Kovylna T.A., Plekhanov A.A., Klapshina L.G., Konev A.N., Mozherov A.M., Shchechkin I.D., Sirotkina M.A., Shcheslavskiy V.I., Shirmanova M.V. (2022) Simultaneous probing of metabolism and oxygenation of tumors *in vivo* using FLIM of NAD(P)H and PLIM of a new polymeric Ir(III) oxygen sensor. *Internat. J. Mol. Sci.* **23**, 10263.
117. Solomatina A.I., Su S., Lukina M.M., Dudenkova V.V., Shcheslavskiy V.I., Wu C., Chelushkin P.S., Chou P., Koshevoy I.O., Tunik S.P. (2018) Water-soluble cyclometalated platinum(II) and iridium(III) complexes: synthesis, tuning of the photophysical properties, and *in vitro* and *in vivo* phosphorescence lifetime imaging. *RSC Adv.* **8**, 17224–17236.
118. Díaz-García C.M., Lahmann C., Martínez-François J.R., Li B., Koveal D., Nathwani N., Rahman M., Keller J.P., Marvin J.S., Looger L.L., Yellen G. (2019) Quantitative *in vivo* imaging of neuronal glucose concentrations with a genetically encoded fluorescence lifetime sensor. *J. Neurosci. Res.* **97**, 946–960.

119. Бабиченко И.И. (2008) Новые методы иммуногистохимической диагностики опухолевого роста. *Вестник РУДН, сер. Медицина*. **4**, 94–99.
120. Fack F., Tardito S., Hochart G., Oudin A., Zheng L., Fritah S., Golebiewska A., Nazarov P.V., Bernard A., Hau A.C., Keunen O., Leenders W., Lund-Johansen M., Stauber J., Gottlieb E., Bjerkgvig R., Niclou S.P. (2017) Altered metabolic landscape in IDH – mutant gliomas affects phospholipid, energy, and oxidative stress pathways. *EMBO Mol. Med.* **9**, 1681–1695.
121. Garrett M., Sperry J., Braas D., Yan W., Le T.M., Mottahedeh J., Ludwig K., Eskin A., Qin Y., Levy R., Breunig J.J., Pajonk F., Graeber T.G., Radu C.G., Christofk H., Prins R.M., Lai A., Liau L.M., Coppola G., Kornblum H.I. (2018) Metabolic characterization of isocitrate dehydrogenase (IDH) mutant and IDH wildtype gliomaspheres uncovers cell type-specific vulnerabilities. *Cancer Metab.* **6**, 4.
122. Meijer T.W.H., Looijen-Salamo, M.G., Lok J., van den Heuvel M., Tops B., Kaanders J.H.A.M., Span P.N., Bussink J. (2019) Glucose and glutamine metabolism in relation to mutational status in NSCLC histological subtypes. *Thoracic Cancer*. **10**, 2289–2299.
123. Pinheiro C., Garcia E.A., Morais-Santos F., Scapulatempo-Neto C., Mafra A., Steenbergen R.D., Boccardo E., Villa L.L., Baltazar F., Longatto-Filho A. (2014) Lactate transporters and vascular factors in HPV-induced squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *BMC Cancer*. **14**, 751.
124. Mikkilineni L., Whitaker-Menezes D., Domingo-Vidal M., Sprandio J., Avena P., Cotzia P., Dulau-Florea A., Gong J., Uppal G., Zhan T., Leiby B., Lin Z., Pro B., Sotgia F., Lisanti M.P., Martinez-Outschoorn U. (2017) Hodgkin lymphoma: a complex metabolic ecosystem with glycolytic reprogramming of the tumor microenvironment. *Semin. Oncol.* **44**, 218–225.
125. Gooptu M., Whitaker-Menezes D., Sprandio J., Domingo-Vidal M., Lin Z., Uppal G., Gong J., Fratamico R., Leiby B., Dulau-Florea A., Caro J., Martinez-Outschoorn U. (2017) Mitochondrial and glycolytic metabolic compartmentalization in diffuse large B-cell lymphoma. *Semin. Oncol.* **44**, 204–217.
126. Georgakoudi I., Quinn K.P. (2012) Optical imaging using endogenous contrast to assess metabolic state. *Annu. Rev. Biomed. Engin.* **14**, 351–367.
127. Shirmanova M.V., Shcheslavskiy V.I., Lukina M.M., Becker W., Zagaynova E.V. (2020) Exploring tumor metabolism with time-resolved fluorescence methods: from single cells to a whole tumor. In: *Multimodal Optical Diagnostics of Cancer*. Eds Tuchin V.V., Popp J., Zakharov V. Cham: Springer, 133–155.
128. Chance B., Schoener B., Oshino R., Itshak F., Nakase Y. (1979) Oxidation-reduction ratio studies of mitochondria in freeze-trapped samples. NADH and flavoprotein fluorescence signals. *J. Biol. Chem.* **254**, 4764–4771.
129. Skala M.C., Riching K.M., Gendron-Fitzpatrick A., Eickhoff J., Eliceiri K.W., White J.G., Ramanujam N. (2007) *In vivo* multiphoton microscopy of NADH and FAD redox states, fluorescence lifetimes, and cellular morphology in precancerous epithelia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **104**, 19494–19499.
130. Chorvat D., Chorvatova A. (2009) Multi-wavelength fluorescence lifetime spectroscopy: a new approach to the study of endogenous fluorescence in living cells and tissues. *Laser Phys. Lett.* **6**, 175–193.
131. Lakowicz J.R., Szmajcinski H., Nowaczyk K., Johnson M.L. (1992) Fluorescence lifetime imaging of free and protein-bound NADH. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **89**, 1271–1275.
132. Blacker T.S., Mann Z.F., Gale J.E., Ziegler M., Bain A.J., Szabadkai G., Duchon M.R. (2014) Separating NADH and NAD(P)H fluorescence in live cells and tissues using FLIM. *Nat. Commun.* **5**, 3936.
133. Kalinina S., Freymueller C., Naskar N., von Einem B., Reess K., Sroka R., Rueck A. (2021) Bioenergetic alterations of metabolic redox coenzymes as NADH, FAD and FMN by means of fluorescence lifetime imaging techniques. *Internat. J. Mol. Sci.* **22**, 5952.
134. Berezin M.Y., Achilefu S. (2010) Fluorescence lifetime measurements and biological imaging. *Chem. Rev.* **110**, 2641–2684.
135. Druzhkova I.N., Shirmanova M.V., Lukina M.M., Dudenkova V.V., Mishina N.M., Zagaynova E.V. (2016) The metabolic interaction of cancer cells and fibroblasts – coupling between NAD(P)H and FAD, intracellular pH and hydrogen peroxide. *Cell Cycle*. **15**, 1257–1266.
136. Shirmanova M.V., Gorbachev D.A., Sarkisyan K.S., Parnes A.P., Gavrina A.I., Polozova A.V., Kovaleva T.F., Snopova L.B., Dudenkova V.V., Zagaynova E.V., Lukyanov K.A. (2021) FUCCI-Red: a single-color cell cycle indicator for fluorescence lifetime imaging. *Cell. Mol. Life Sci.* **78**, 3467–3476.
137. Lukina M.M., Dudenkova V.V., Ignatova N.I., Druzhkova I.N., Shimolina L.E., Zagaynova E.V., Shirmanova M.V. (2018) Metabolic cofactors NAD(P)H and FAD as potential indicators of cancer cell response to chemotherapy with paclitaxel. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) – Gen. Subjects.* **1862**, 1693–1700.
138. Shirshin E.A., Shirmanova M.V., Gayer A.V., Lukina M.M., Nikonova E.E., Yakimov B.P., Budylin G.S., Dudenkova V.V., Ignatova N.I., Komarov D.V., Yakovlev V.V., Becker W., Zagaynova E.V., Shcheslavskiy V.I., Scully M.O. (2022) Label-free sensing of cells with fluorescence lifetime imaging: the quest for metabolic heterogeneity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **119**, e2118241119.
139. Yuzhakova D., Kiseleva E., Shirmanova M., Shcheslavskiy V., Sachkova D., Snopova L., Bederina E., Lukina M., Dudenkova V., Yusubalieva G., Belovzhets T., Matvienko D., Baklaushev V. (2022) Highly invasive fluorescent/bioluminescent patient-derived orthotopic model of glioblastoma in mice. *Front. Oncol.* **12**, 897839.
140. Sharick J.T., Jeffery J.J., Karim M.R., Walsh C.M., Esbona K., Cook R.S., Skala M.C. (2019) Cellular metabolic heterogeneity *in vivo* is recapitulated in tumor organoids. *Neoplasia*. **21**, 615–626.
141. Walsh A.J., Castellanos J.A., Nagathihalli N.S., Merchant N.B., Skala M.C. (2016) Optical imaging of drug-induced metabolism changes in murine and human pancreatic cancer organoids reveals heterogeneous drug response. *Pancreas*. **45**, 863–869.

142. Walsh A.J., Cook R.S., Sanders M.E., Aurisicchio L., Ciliberto G., Arteaga C.L., Skala M.C. (2014) Quantitative optical imaging of primary tumor organoid metabolism predicts drug response in breast cancer. *Cancer Res.* **74**, 5184–5194.
143. Sharick J.T., Walsh C.M., Sprackling C.M., Pasch C.A., Pham D.L., Esbona K., Choudhary A., Garcia-Valera R., Burkard M.E., McGregor S.M., Matkowskyj K.A., Parikh A.F., Meszoely I.M., Kelley M.C., Tsai S., Deming D.A., Skala M.C. (2020) Metabolic heterogeneity in patient tumor-derived organoids by primary site and drug treatment. *Front. Oncol.* **10**, 553.
144. Gillette A.A., Babiarz C.P., VanDommelen A.R., Pasch C.A., Clipson L., Matkowskyj K.A., Deming D.A., Skala M.C. (2021) Autofluorescence imaging of treatment response in neuroendocrine tumor organoids. *Cancers.* **13**, 1873.

Tumor Metabolic Heterogeneity

M. V. Shirmanova^{1, *}, S. D. Sinyushkina¹, and A. D. Komarova^{1, 2}

¹ Privolzhsky Research Medical University, Nizhny Novgorod, 603005 Russia

² Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod, 603950 Russia

*e-mail: Shirmanovam@mail.ru

Currently, much attention in oncology is devoted to the issues of tumor heterogeneity, which creates serious problems in the diagnosis and therapy of malignant neoplasms. Intertumoral and intratumoral differences relate to various characteristics and aspects of the vital activity of tumor cells, including cellular metabolism. This review provides general information about the tumor metabolic heterogeneity with a focus on energy metabolism, its causes, mechanisms and research methods. Among the methods, fluorescence lifetime imaging is described in more detail as a new promising method for observing metabolic heterogeneity at the cellular level. The review demonstrates the importance of studying the features of tumor metabolism and identifying intra- and intertumoral metabolic differences.

Keywords: tumors, tumor heterogeneity, energy metabolism, oxidative phosphorylation, glycolysis, metabolic cofactors, fluorescence lifetime imaging