

О.О. Кленов
В.В. Бентрад
С.П. Залєток

Інститут експериментальної
патології, онкології
і радіобіології
ім. Р.Є. Кавецького
НАН України, Київ, Україна

Ключові слова: карцинома
Герена, резистентність,
пухлинна тканина, периферична
кров, путресцин, спермідин,
спермін.

ОСОБЛИВОСТІ ЗМІН РІВНІВ ПОЛІАМІНІВ У ДИНАМІЦІ РОСТУ ЧУТЛИВОГО ТА РЕЗИСТЕНТНОГО ДО ЦИСПЛАТИНУ ШТАМІВ КАРЦИНОМИ ГЕРЕНА

Результати багатьох досліджень показали, що для злоякісних пухлин людини і тварин характерними є інтенсифікація синтезу поліамінів (ПА) та їх накопичення в пухлинних тканинах, а також у крові, сечі, спинно-мозковій рідині. Є повідомлення, що ефективний цитостатичний вплив супроводжується зниженням вмісту ПА у пухлинах та біологічних рідинах організму експериментальних тварин і пацієнтів з пухлинами. Водночас припущення, що визначення ПА в біологічних рідинах може бути використано для моніторингу процесу лікування вимагає подальшого дослідження. **Мета:** дослідити рівні ПА в тканині чутливого та резистентного до цисплатину штамів карциноми Герена, а також у периферичній крові щурів з пухлиною в динаміці росту останньої. **Об'єкт і методи:** щурі лінії Вістар, модельна карцинома Герена (чутливий та резистентний до цисплатину штами), периферична кров щурів з пухлиною. Визначення вмісту ПА (сперміну (Спн), спермідину (Спд), ацетильованої форми спермідину (Ацетил-Спд) та путресцину (Пут)) в пухлинній тканині та периферичній крові проводили методом рідинної хроматографії високого тиску. Статистичну обробку результатів проводили за загально прийнятими методами варіаційної статистики. **Результати:** з розвитком (експоненціальна фаза росту) чутливого штаму карциноми Герена в пухлинах зростають рівні Спд, Ацетил-Спд, Спн та величина співвідношення Спд/Спн, а рівень Пут знижується. У подальшому рівні всіх фракцій ПА знижувалися. В експоненціальній фазі росту резистентної до цисплатину карциноми зростали рівні Спд, Пут, співвідношення Спд/Спн. Натомість рівні Спн і Ацетил-Спд знижувалися. У тканині резистентного штаму карциноми Герена рівень путресцину в усі терміни дослідження залишався вищим, а рівні Спд і Спн в експоненціальній фазі росту були нижчими порівняно з відповідними показниками чутливого штаму карциноми. Динаміка рівнів ПА у периферичній крові обох груп тварин з пухлинами була аналогічною такій у пухлинній тканині. **Висновки:** встановлено, що резистентний до цисплатину штаму карциноми Герена характеризується змінами в метаболізмі ПА у порівнянні з чутливим штамом. Отримані дані щодо особливостей динаміки рівнів ПА у пухлинній тканині та периферичній крові експериментальних тварин залежно від чутливості пухлин до цитостатичного препарату в подальшому можуть бути використані для моніторингу в клінічних умовах ефективності хіміотерапії.

Поліаміни (ПА) — це природні полікатіони, які відіграють фундаментальну роль у метаболізмі клітин і необхідні для їх нормального росту та функціонування. Особливості розподілу заряду в молекулі ПА і досить легка зміна конформації дозволяють їм зв'язуватися з різними аніонними макромолекулами, включаючи ДНК, РНК, білки та кислі фосфоліпіди [1–4]. ПА стабілізують структуру хроматину, клітинних мембран, задіяні в регуляції іонних каналів, регулюють процеси перекисного окислення, виступаючи субстратом для пероксидаз або,

навіпаки, — захищають клітинні структури від вільних радикалів [2, 4–7]. Встановлено, що підвищення внутрішньоклітинної концентрації ПА (насамперед за рахунок підвищеної регуляції їх біосинтетичних ферментів) корелює з посиленням проліферації клітин, а також з туморогенезом [1, 2]. Підвищений рівень ПА пов'язують з розвитком злоякісних пухлин різних локалізацій (раку молочної залози, шлунка, кишечнику, шкіри та ін.) [2, 8–12].

Для низки пухлин (або завдяки їх вихідним властивостям, або тривалому застосуванню цитоста-

тиків) притаманна резистентність до ряду хіміотерапевтичних препаратів. Останнім часом були висловлені припущення, що формування резистентності може бути пов'язане із суперекспресією в пухлинних клітинах орнітиндекарбоксилази (ОДК) — ключового фермента біосинтезу ПА, з відсутністю антизиму ОДК, зі змінами в системі транспорту ПА та трансмембранного транспорту цитостатиків під впливом ПА, а також з нездатністю цитостатиків підвищувати активність спермін/спермідин-N1-ацетилтрансферази (ССАТ) — першого ферменту катаболізму ПА [12]. Виникнення резистентності знижує ефективність застосування цитостатиків та погіршує прогноз перебігу захворювання. Окрім того, надходили повідомлення, що ефективне лікування супроводжується зниженням вмісту ПА у злویкісних клітинах і фізіологічних рідин організму (крові та сечі) і корелює з ефективністю протипухлинної терапії [10–12]. Якщо ж пухлина не реагує на лікування, вміст ПА в пухлинній тканині та фізіологічних рідинах не змінюється або навіть зростає [12]. Причиною такої ситуації може бути природна або набута резистентність пухлини до застосованих препаратів, а також нездатність використаних цитостатиків знижувати вміст ПА. Водночас зміни рівнів основних фракцій ПА можуть бути різноспрямованими. Зокрема, нами було виявлено, що у хворих на рак яєчника успішна протипухлинна терапія викликала значне збільшення вмісту спермідину (Спд) у фізіологічних рідинах в перші 48–72 год після початку хіміотерапії. Збереження початкового рівня Спд або його зниження в цей період корелювало з нечутливістю пухлини до цього хіміопрепарату. У той же час після ефективної хіміотерапії у фізіологічних рідинах спостерігали значне зменшення вмісту Спд і путресцину (Пут). Подібні дані нами були отримані і при дослідженні ПА в крові і сечі хворих з пухлинами інших локалізацій [12]. Ці дані свідчать, що окремі фракції ПА можуть бути корисними для розробки тест-систем для динамічного моніторингу ефективності медикаментозної терапії та прогнозування чутливості злویкісних пухлин до протипухлинних агентів.

Перш ніж вивчати можливості застосування ПА як маркерів для моніторингу медикаментозної терапії та прогнозування чутливості злویкісних пухлин до протипухлинних агентів, доцільно в умовах контрольованого експерименту дослідити, чи змінюються показники метаболізму ПА у резистентних варіантах пухлин у порівнянні з вихідними пухлинами та чи змінюються показники ПА в організмі (зокрема у сироватці крові) під час розвитку резистентних до хіміопрепарату пухлин.

У зв'язку з цим метою роботи було дослідити рівні ПА в тканині чутливого та резистентного до цисплатину штамів карциноми Герена, а також в периферичній крові щурів з пухлиною в динаміці росту останньої.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

У дослідах використовували самиць щурів лінії Wistar (2,5 міс, масою тіла 180–200 г) розведення віварію Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького Національної академії наук України. Утримання тварин і робота з ними здійснювалися відповідно до загальноприйнятих міжнародних правил проведення досліджень на експериментальних тваринах. У якості моделей пухлинного росту використано два різних за чутливістю до цисплатину штамів карциноми Герена — чутливий і резистентний. Штамів карциноми Герена, резистентний до дії цисплатину, було отримано співробітниками Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України [13]. Пухлинні клітини обох штамів одержували з Банку клітинних ліній з тканин людини та тварин Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького Національної академії наук України. Перещеплення пухлин проводили підшкірно використовуючи $2,5 \cdot 10^6$ клітин на тварину в 0,5 мл фізіологічного розчину NaCl.

Визначення вмісту ПА у пухлинах (зразки тканини масою 30 мг) та периферичній крові (250 мкл) проводили методом рідинної хроматографії високого тиску на рідинному хроматографі Agilent 1200 (США) [14]. Для аналізу використовували колонку Supelco Zorbax ODS (4,6 mm I.D. • 250 mm). Рівні ПА в тканині розраховували в нМоль/1 г сирової тканини та в нМоль/10⁶ еритроцитів. У якості стандарту застосовували еквімолярну суміш стандартних ПА («путресцин • 2НСІ», «спермідин • 3НСІ», «спермін • 4НСІ»). Суміш стандартів, попередньо розчинену в перхлорній кислоті, готували аналогічно до дослідних зразків. У роботі використовували розчинники та стандарти ПА фірми Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

Статистичну обробку результатів проводили за загальноприйнятими методами варіаційної статистики. Вірогідність різниці між контрольними та дослідними показниками оцінювали за *t*-критерієм Ст'юдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Проведено дві серії досліджень. У першій серії ми провели порівняльний аналіз рівнів основних фракцій ПА — Пут, Спд, сперміну (Спн) та ацетильованої форми спермідину (Ацетил-Спд) в пухлинній тканині чутливого і резистентного до цисплатину штамів карциноми Герена та у периферичній крові щурів з перещепленими пухлинами. Дослідження проводили в експоненціальну фазу росту, а саме на 14-ту добу розвитку пухлин.

Аналіз результатів показав, що у порівнянні із чутливим для резистентного до цисплатину штамів карциноми характерні вищі рівні Пут (на 34,0%) та Ацетил-Спд (на 15,0%); натомість рівні Спд та Спн та в резистентних пухлинах були на 12,0–25,0% нижчими (рис. 1). Збільшення вмісту Пут та Ацетил-

Спд, а також зменшення Спд, може бути непрямим свідченням того, що в резистентних пухлинах, очевидно, зростає не тільки активність ОДК, а й активність ССАТ — першого ферменту катаболізму ПА.

Індекс молярного співвідношення Спд/Спн в резистентних до цисплатину пухлинах також був нижчим у порівнянні з чутливим штамом (рис. 2). Середня маса пухлин у ці терміни в групі тварин з резистентним до цисплатину штамом була на 30,0% меншою, ніж у тварин з чутливим штамом. Нижчі показники Спд, Спн та індексу Спд/Спн в резистентних пухлинах можуть свідчити про те, що в досліджений період їх розвитку рівень проліферативних процесів у порівнянні із чутливими пухлинами, ймовірно, був знижений. Але це питання потребує додаткових досліджень.

Дослідження ПА у периферичній крові тварин цих груп, а також у інтактних щурів, показали, що рівні всіх досліджених фракцій ПА були суттєво нижчими у інтактних тварин порівняно з показниками у щурів з перещепленими пухлинами ($p < 0,05$). Це свідчить про те, що значна кількість ПА в кров надходить з пухлинної тканини. У периферичній крові тварин з резистентним до цисплатину штамом карциноми Герена рівні Ацетил-Спд та Пут були вищими (на 18,0 та 36,0% відповідно) порівняно з показниками тварин з вихідним штамом (рис. 3). Рівні Спд та Спн в крові тварин з резистентними до цисплатину пухлинами були, навпаки, нижчими від таких у тварин з чутливими (на 43,5 і 20,0% відповідно).

У наступній серії дослідів ми визначали динаміку рівнів ПА у тварин з карциномою Герена. У щурів з чутливим штамом рівень ПА визначали на 11-, 15- та 19-ту доби росту пухлин, з резистентним штамом — на 10-, 13- та 17-ту доби.

Аналіз результатів другої серії досліджень показав, що в міру розвитку чутливої до цисплатину карциноми Герена (з 10-ї до 15-ї доби) в пухлинах підвищуються рівні Спд, Ацетил-Спд, Спн та величина співвідношення Спд/Спн, а рівень Пут знижується (рис. 4, таблиця). Найвищі значення Спд, Ацетил-Спд, Спн, Спд/Спн виявлені на 15-ту добу розвитку, що відповідає інтенсивній фазі росту. Надалі (на 19-ту добу) рівні всіх досліджених фракцій ПА знижувалися, співвідношення Спд/Спн зменшувалося, що може свідчити про меншу інтенсивність проліферативних процесів у пухлинах у цей період.

Що стосується вмісту ПА у периферичній крові тварин, то найвищі їх рівні у крові щурів з чутливим штамом карциноми Герена спостерігали також на 15-ту добу росту пухлини. Надалі, на 19-ту добу, рівні ПА (особливо Спд) стрімко знижувалися (рис. 5).

Дослідження рівня ПА в тканині резистентної до цисплатину карциноми Герена в динаміці росту показали, що найвищі рівні Пут, Спд та величини молярного співвідношення Спд/Спн спостерігалися на 13-ту добу розвитку. На 17-ту добу ці показники знижувалися (рис. 6, див. таблицю). Рі-

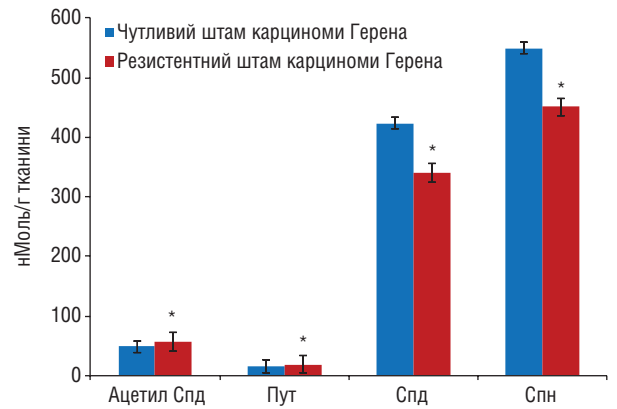


Рис. 1. Вміст ПА в пухлинній тканині чутливого та резистентного до цисплатину штамів карциноми Герена на 14-ту добу росту пухлини

* $p < 0,05$ – у порівнянні з чутливим штамом

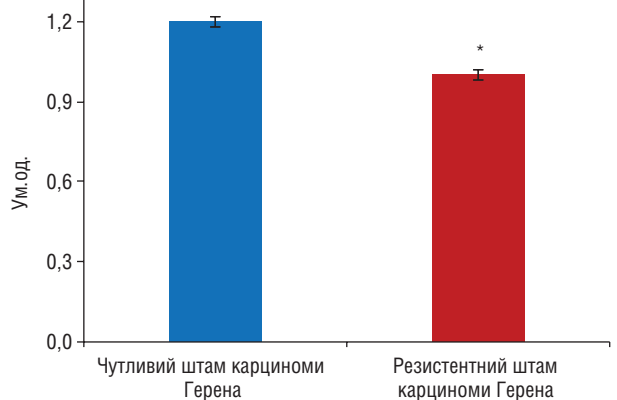


Рис. 2. Величина молярного співвідношення Спд/Спн в пухлинах тварин з чутливою та резистентною до цисплатину карциномою Герена

* $p < 0,05$ – у порівнянні з чутливим штамом на 14-ту добу росту пухлини

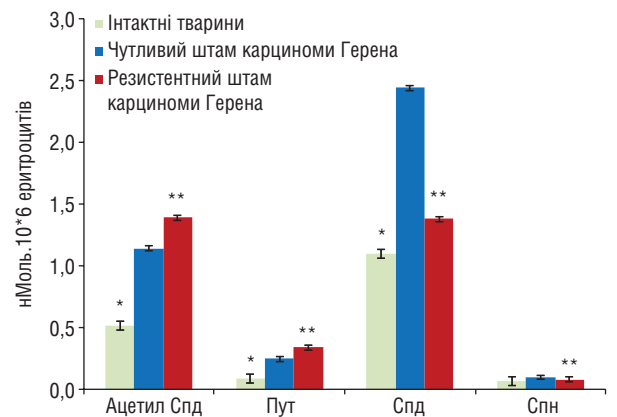


Рис. 3. Вміст ПА в периферичній крові інтактних щурів і тварин з чутливою та резистентною до цисплатину карциномою Герена (14-та доба росту пухлини)

* $p < 0,05$ – у порівнянні з тваринами з карциномою Герена (як з чутливою, так і з резистентною); ** $p < 0,05$ – у порівнянні з тваринами з чутливим штамом карциноми Герена

вень Спн протягом досліджуваного періоду практично не змінювався. Виявлено також, що рівень Пут у тканині резистентного штаму карциноми Герена в усі досліджені терміни (10-, 13-, 17-та доби) перевищував відповідні значення у тканині чутли-

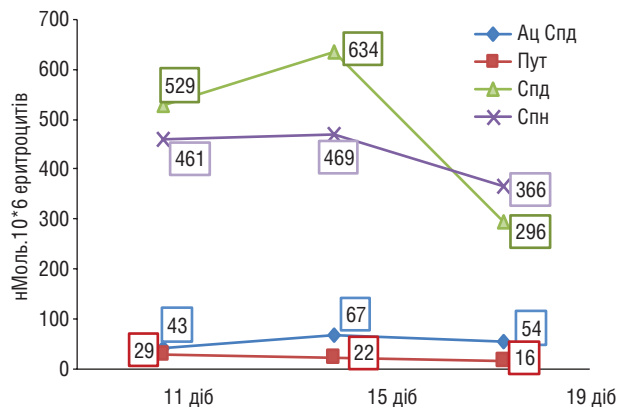


Рис. 4. Динаміка рівнів ПА в пухлинах чутливого штаму карциноми Герена з 11-ї до 19-ї доби їх розвитку

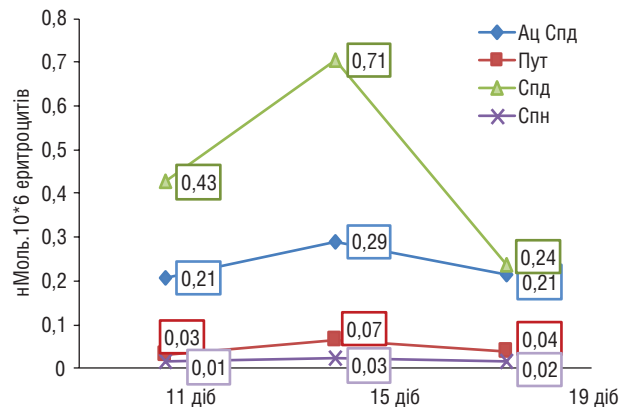


Рис. 5. Динаміка рівня основних ПА в периферичній крові шурів з чутливим штамом карциноми Герена

Таблиця
Співвідношення Спд/Спн в пухлинній тканині шурів з різними за чутливістю до цисплатину штамами карциноми Герена

Термін росту пухлини, діб	Рівень співвідношення Спд/Спн
Чутливий штаб	
11	1,20
15	1,35
19	0,81
Резистентний штаб	
10	1,08
13	1,20
17	0,86

вого штаму. Натомість рівні Спд і Спн у зразках резистентної до цисплатину карциноми Герена на 10-та 13-ту добу розвитку пухлин були нижчими, ніж у шурів з чутливим штамом (див. рис. 4, 6). Динаміка змін ПА у периферичній крові тварин цієї групи, як і у шурів із чутливим штамом, була аналогічною їх змінам у тканині пухлин.

Таким чином, найвищі рівні ПА та величини молярного співвідношення Спд/Спн в пухлинах як чутливого, так і резистентного до цисплатину штабів карциноми Герена, спостерігали в експоненціальну фазу росту пухлини, у подальші терміни рівні ПА, особливо Спд та величина Спд/Спн, знижувалися. Порівняння вмісту основних фракцій ПА у периферичній крові інтактних шурів та тварин з перещепленими пухлинами демонструє суттєве підвищення цих показників за наявності пухлинного росту незалежно від чутливості карциноми до цисплатину. Динаміка змін ПА у периферичній крові тварин з пухлинами була аналогічною такій у тканині як чутливого, так і резистентного до цисплатину штабів карциноми Герена. Це свідчить про те, що значна кількість ПА в кров надходить з пухлинної тканини, тобто дослідження фракцій ПА в периферичній крові може бути репрезентативним для моніторингу росту пухлини або ефективності впливу на неї цитостатичних препаратів.

ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що резистентний до цисплатину штаб карциноми Герена характеризується змінами у метаболізмі ПА у порівнянні з чутливим штамом.

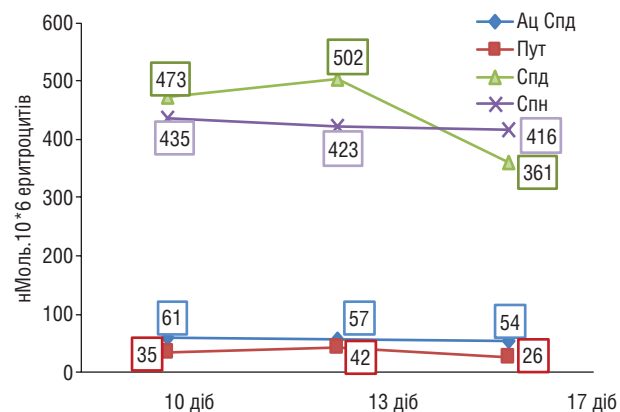


Рис. 6. Динаміка рівня основних ПА в пухлинах резистентного до цисплатину штаму карциноми Герена

2. Рівень Пут у всі досліджені терміни (10-, 13-, 17-та доби) у тканині резистентного штаму карциноми Герена перевищував відповідні значення у тканині чутливого штаму.

3. Рівні Спд і Спн та співвідношення Спд/Спн у тканині резистентної до цисплатину карциноми Герена в експоненціальну фазу росту пухлин, навпаки, були нижчими, порівняно з такими чутливого штаму.

4. Динаміка змін ПА у периферичній крові тварин з пухлинами була аналогічною такій у пухлинній тканині.

5. Отримані дані щодо особливостей динаміки рівнів ПА у пухлинній тканині та периферичній крові експериментальних тварин залежно від чутливості пухлин до цитостатичного препарату в подальшому можуть бути використані для моніторингу в клінічних умовах ефективності хіміотерапії.

Робота виконувалася в рамках НДР «Молекулярно-біологічні фактори гетерогенності злоякісних клітин та варіабельність клінічного перебігу гормонозалежних пухлин» (0117U002034) за фінансової підтримки Цільової програми наукових досліджень Відділення біохімії, фізіології і молекулярної біології Національної академії наук України «Молекулярно-генетичні і біохімічні механізми регуляції клітинних та системних взаємодій за фізіологічних та патологічних станів» (2017–2021).

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Igarashi K, Kashiwagi K. The functional role of polyamines in eukaryotic cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2019; **107**: 104–15.
2. Berdinsky NK, Zaletok SP. Polyamines and tumor growth. Kyiv: Naukova dumka. Наукова думка, Київ, 1987: 1–141.
3. Kabir A, Suresh Kumar G. Targeting double-stranded RNA with spermine, 1-naphthylacetyl spermine and spermidine: a comparative biophysical investigation. *J Phys Chem B* 2014; **118**: 11050–64.
4. Pegg AE. Mammalian polyamine metabolism and function. *IUBMB Life* 2009; **61**: 880–94.
5. Lightfoot HL, Hall J. Endogenous polyamine function — the RNA perspective. *Nucleic Acids Res* 2014; **42**: 11275–90.
6. Medina MÁ, Urdiales JL, Rodriguez-Caso C, et al. Biogenic amines and polyamines: similar biochemistry for different physiological missions and biomedical applications. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2003; **38**: 23–59.
7. Stewart MT, Dunston TT, Woster PM, Casero RA. Polyamine catabolism and oxidative damage. *J Biol Chem* 2018; **293**: 18736–45.
8. Zaletok JV, Berdyn NC, Tarutinov VI, et al. Study of indicators of polyamine metabolism in tumors and physiological fluids in patients with breast tumors. *Oncology* 2000; **2** (4): 250–2 (in Ukrainian).
9. Zaletok JV, Klenov OO, Gogol JV, et al. Blood and urine polyamines as new diagnostic markers of prostate cancer. *Oncology* 2019; **21** (3): 219–24 (in Ukrainian).
10. Murray-Stewart TR, Woster PM & Casero RA Jr. Targeting polyamine metabolism for cancer therapy and prevention. *Biochem J* 2016; **473**: 2937–53.
11. Park MH, Igarashi K. Polyamines and their metabolites as diagnostic markers of human diseases. *Biomol Ther* 2013; **21** (1): 1–9.
12. Zaletok SP. Polyamines are markers of malignant growth and a target for anticancer therapy. Kyiv 2007. 37 с (in Ukrainian).
13. Yurchenko OV, Todor IN, Tryndyak VP, et al. Resistance of Guerin's carcinoma cells to cisplatin: biochemical and morphological aspects. *Exp. Oncol* 2003; **25** (1): 64–68.
14. Gerbaut L. Determination of erythrocytic polyamines by reversed-phase liquid chromatography. *Clin Chem.* 1991; **37** (12): 2117–20.

PECULIARITIES OF CHANGES IN POLYAMINS LEVELS IN THE DYNAMICS OF PARENTAL AND CISPLATIN-RESISTANT GUÉRIN'S CARCINOMA GROWTH

O.O. Klenov, V.V. Bentrad, S.P. Zaletok

R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology,
Oncology and Radiobiology of NAS of Ukraine,
Kyiv, Ukraine

Summary. The results of many studies have shown that intensification of polyamine synthesis (PAs) and its accumulation in tumor tissues as well as in blood, urine and spinal-cerebral fluid is a characteristic of human and animals' malignant tumors. There are some evidence that effective cytostatic treatment is accompanied by a decrease in PA content in tumor tissue and in

the biological fluids of experimental animals and cancer patients. Meanwhile, the assumption that detection of PA in biological fluids can be used in monitoring the treatment process remains to be elucidated. **Aim:** to investigate the levels of PAs in the tumor tissue of parental and cisplatin-resistant substrains of Guérin's carcinoma as well as in the peripheral blood of tumor-bearing rats in the dynamics of the tumor growth. **Object and methods:** Wistar rats, parental and cisplatin-resistant substrains of Guérin's carcinoma, peripheral blood of tumor-bearing rats. PA (spermine (Spn), spermidine (Spd), acetylated form of spermidine (Acetyl-Spd) and putrescine (Put)) content in the tumor tissue and peripheral blood was determined by high pressure liquid chromatography. The statistical analysis of the results was performed according to generally accepted methods of variation statistics. **Results:** as parental Guérin's carcinoma progresses (exponential phase), the level of Spd, Acetyl-Spd, Spn in tumor tissues as well as Spd/Spn ratio were increasing while the level of Put was declining. Later on, the levels of all tested PA fractions decreased. In the exponential phase of cisplatin-resistant carcinoma growth, the levels of Spd, Put and the Spd/Spn ratio were increasing, while the levels of Spn and Acetyl-Spd were decreasing. As compared to the corresponding data of the parental strain of the Guérin's carcinoma, the level of Put in tissue of cisplatin-resistant carcinoma remained higher in all periods of the study, while the levels of Spd and Spn during the exponential phase were lower. In both groups of tumor-bearing animals, changes in PA levels in the peripheral blood correlated with their levels in tumor tissue. **Conclusions:** there was shown, that cisplatin-resistant substrain of Guérin's carcinoma is characterized by changes in PA metabolism compared to the parental strain. The obtained data on the peculiarities of PA levels dynamics in tumor tissue and peripheral blood of experimental animals depending on the sensitivity of tumors to cytostatic drug can be further used in clinical settings to monitor the effects of chemotherapy on the tumor process.

Key Words: Guérin's carcinoma, resistance, tumor tissue, peripheral blood, putrescine, spermidine, spermine.

Адреса для листування:

Кленов О.О.
03022, Київ, вул. Васильківська, 45
Інститут експериментальної патології,
онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького
НАН України
E-mail: klenov@ukr.net

Одержано: 22.09.2021