

В.В. Бентрад¹
С.П. Залеток¹
О.О. Кленов¹
Ю.В. Вітрук²
Е.О. Стаховський²

¹Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України

²Національний інститут раку, Київ, Україна

Ключові слова: рак передміхурової залози, доброякісні пухлини передміхурової залози, поліаміни, орнітиндекарбоксилаза, спермінсинтаза, спермінацетилтрансфераза.

ЕКСПРЕСІЯ ГЕНІВ, ЩО КОДУЮТЬ ФЕРМЕНТИ ОБМІНУ ПОЛІАМІНІВ У ЗЛОЯКІСНИХ ТА ДОБРОЯКІСНИХ ПУХЛИНАХ ПЕРЕДМІХУРОВОЇ ЗАЛОЗИ ЛЮДИНИ

Рак передміхурової залози (РПЗ) та доброякісні пухлини передміхурової залози (ДППЗ) на сьогодні є найпоширенішою онкопатологією у чоловіків старшого віку. Сучасні дослідження свідчать, що метаболізм поліамінів у пухлинах передміхурової залози (ПЗ) відрізняється від такого в пухлинах інших локалізацій. **Мета:** дослідити рівні експресії генів, що кодують ферменти біосинтезу поліамінів (орнітиндекарбоксилази і спермінсинтази) та фермент катаболізму сперміну (спермінацетилтрансферази) у клітинах злоякісних та доброякісних пухлин передміхурової залози. **Об'єкт і методи:** у дослідженні використані 25 постопераційних зразків пухлин хворих на РПЗ (18 зразків) та ДППЗ (7 зразків). Рівень експресії генів визначали із застосуванням біохімічних, імунологічних та молекулярних методів. **Результати:** виявлено зниження рівнів експресії орнітиндекарбоксилази у злоякісних пухлинах ПЗ порівняно з доброякісними пухлинами цього органа. Показано, що у злоякісних пухлинах, на відміну від доброякісних, експресія спермінсинтази виявляється лише у слідових кількостях. Проте рівні експресії спермінацетилтрансферази у злоякісних клітинах ПЗ значно вищі, ніж у доброякісних, і зростають з прогресуванням захворювання. **Висновок:** отримані дані свідчать про різнонаправленість змін метаболізму поліамінів у доброякісних та злоякісних пухлинах ПЗ. Одержані дані в подальшому можуть служити для уточненої діагностики пухлин ПЗ та для пошуку протипухлинних препаратів таргетної дії.

Рак передміхурової залози (РПЗ) та доброякісні пухлини передміхурової залози (ДППЗ) на сьогодні є однією з найпоширеніших патологій у чоловіків старшого віку [1–3]. За останні роки в більшості країн світу зростає кількість хворих на РПЗ [4]. В Україні ця патологія посідає друге місце серед усіх онкозахворювань чоловіків. Згідно з даними Національного канцерреєстру України, кількість первинних хворих на РПЗ у 2018 р. — майже 8,0 тис. осіб, що становить 47,6 на 100 тис. населення (світовий показник — 29,8 на 100 тис. населення), смертність становила 19,3 на 100 тис. населення (світовий показник — 11,6 на 100 тис. населення) [5].

У хворих на РПЗ навіть з однаковою стадією й однаковим ступенем диференціювання первинної пухлини можуть розвинути різні клінічні наслідки, що певною мірою залежить від молекулярного профілю пухлин. Тому вивчення молекулярного профілю пухлин має велике значення, оскільки ці дані можуть бути використані як критерії для прогнозу перебігу захворювання, так і для розроблення схем персоналізованого лікування.

Відомо, що проліферація клітин не може відбуватися за відсутності або навіть браку певної кількості поліамінів (ПА). Це стосується як нормальних, так і злоякісно трансформованих клітин. Для багатьох злоякісних пухлин встановлено значне підвищення синтезу та конститутивного рівня ПА. Але в пухлинах різного гістогенезу процеси синтезу і катаболізму ПА, а також вміст окремих їх фракцій суттєво відрізняються. Оскільки ПА беруть безпосередню участь у процесах росту і проліферації, відмінності в концентрації окремих їхніх фракцій (зокрема сперміну і спермідину) у різних пухлинах можуть бути однією з причин неоднакової проліферативної активності пухлинних клітин, швидкості росту та агресивності пухлин [6–11].

Результатів досліджень щодо вивчення ПА і ферментів їх обміну при розвитку пухлин передміхурової залози (ПЗ) небагато. Такі дослідження в основному були проведені *in vitro* на культурах гормонозалежних та гормонезалежних пухлинних клітин ПЗ та *in vivo* на тваринах із перещепленими пухлинами ПЗ. У літературі містяться деякі дані щодо наявності відмінностей в метаболізмі ПА у пухлинах

ПЗ не лише порівняно з нормальною тканиною, але й із пухлинами інших локалізацій [12, 13]. Але таких робіт дуже мало, особливо це стосується досліджень на постопераційних зразках РПЗ людини, а їх результати суперечливі.

Водночас дані щодо особливостей метаболізму ПА, зокрема активності/експресії генів, що кодують білки-ферменти їх обміну (аргінази, орнітиндекарбоксилази, спермін/спермідин ацетилтрансферази, спермінацетилтрансферази, спермінсинтази, поліаміноксидази та ін.) та рівня окремих фракцій ПА у пухлинах ПЗ могли би стати науковою основою для розроблення нових інгібіторів синтезу ПА, які в подальшому могли б бути застосовані як протипухлинні засоби таргетної дії. Зазначимо, що в деяких раніше проведених дослідженнях вже показано, що інгібітор орнітиндекарбоксилази (ОДК) — α -диформетилорнітин (α -ДФМО) — проявляє високу протипухлинну активність щодо багатьох злоякісних пухлин, у тому числі і РПЗ [13–15]. Окрім цього, дані щодо рівня ферментів обміну ПА та рівнів ПА у пухлинах можуть бути використані як потенційні маркери для прогнозу перебігу хвороби. Все вищезазначене свідчить про перспективність вивчення особливостей обміну ПА в пухлинах ПЗ людини.

Мета виконаної роботи — дослідити рівні експресії генів, що кодують ферменти біосинтезу поліамінів (ОДК і спермінсинтази (СПС)) та фермент катаболізму сперміну — спермінацетилтрансферази (САТ1) у клітинах доброякісних і злоякісних пухлин ПЗ.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

У дослідженні використані 25 постопераційних зразків пухлин хворих на РПЗ (18 зразків) та ДППЗ (7 зразків). Розподіл пацієнтів за стадіями захворювання: I стадія — 3, II стадія — 7, III стадія — 4, IV стадія — 4. Усі пацієнти лікувались у відділенні пластичної та реконструктивної онкоурології Національного інституту раку Міністерства охорони здоров'я (МОЗ) України (завідувач відділення — доктор медичних наук, професор Є.О. Стаховський). Середній вік хворих на РПЗ становив $64,46 \pm 1,58$ року; пацієнтів із ДППЗ — $65,8 \pm 2,7$ року. Пацієнтів обстежено згідно зі стандартами діагностики та лікування хворих, затверджених наказами МОЗ України (Наказ МОЗ України від 04.03.2009 р. № 135 «Про затвердження клінічного протоколу надання медичної допомоги хворим з доброякісною гіперплазією передміхурової залози»; Наказ МОЗ України від 02.04.2014 р. № 235 «Про затвердження та впровадження медико-технологічних документів зі стандартизації медичної допомоги при раку передміхурової залози»). Стадію РПЗ визначали за Міжнародною класифікацією злоякісних новоутворень TNM 7 (2009). Патоморфологічне дослідження гістологічних зрізів пухлин проведено на парафінових блоках (фар-

бування зрізів гематоксиліном та еозином) відповідно до Міжнародної гістологічної класифікації ВООЗ (2006). Морфологічними дослідженнями встановлено, що злоякісні пухлини обстежених хворих належать до аденокарцином, серед доброякісних пухлин були визначені залозиста та фіброзно-залозиста форми доброякісної гіперплазії ПЗ. Дослідження проведені відповідно до принципів Гельсінської Декларації Всесвітньої медичної асоціації. Усі пацієнти були поінформовані про дослідження і підписали згоду на їх проведення.

З отриманих зразків пухлин готували клітинні екстракти згідно з методом Sovak [16]. Визначення концентрації загального білка у зразках проводили за допомогою методу Бредфорда [17]. Експресію генів визначали за допомогою розділення білків гель-електрофорезом у поліакриламідному гелі за модифікованою методикою Леммлі [18] та подальшим вестерн-блот-аналізом. У роботі використовували МкАт проти білків ОДК (ODC (E-6), Santa Cruz, США), СПС (SPSY (A-4), Santa Cruz, США), САТ1 (SATL1 (E-8), Santa Cruz, США) та вторинні поліклональні антитіла, кон'юговані з пероксидазою хрому (ДАКО, Данія). Для контролю вмісту білків у пробах використовували МкАт проти β -актину (β -актин (C-4), Santa Cruz, США). Дані Вестерн-блот-аналізу математично обробляли за допомогою комп'ютерної програми TotalLab v1.10.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Дослідження показали, що рівні експресії ОДК в доброякісних пухлинах вищі, порівняно з такими у злоякісних пухлинах ПЗ. Окрім цього, з прогресуванням захворювання (з підвищенням стадії РПЗ) рівні експресії ОДК у клітинах РПЗ знижуються (рис. 1).

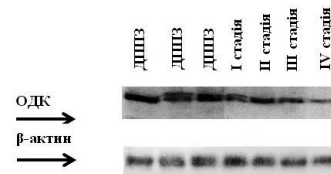


Рис. 1. Вестерн-блот-аналіз вмісту ОДК в доброякісних та злоякісних пухлинах ПЗ

Аналогічні дані отримані в дослідженнях [19], які продемонстрували, що у клітинах доброякісної гіперплазії ПЗ спостерігаються суттєво вищі рівні експресії ОДК порівняно із клітинами РПЗ. Цими ж авторами виявлено, що рівні експресії ОДК у злоякісних пухлинах знижуються у процесі прогресування раку.

У зразках злоякісних та доброякісних пухлин ПЗ нами також досліджено рівні експресії СПС та САТ1. Виявлено, що у злоякісних пухлинах ПЗ, на відміну від доброякісних, експресія СПС

дуже низька і наявна лише у слідових кількостях (рис. 2а).

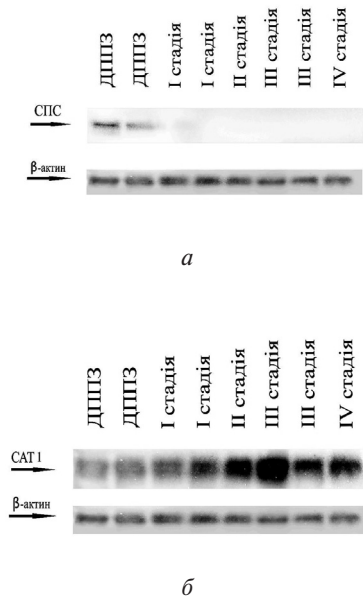


Рис. 2. Вестерн-блот-аналіз вмісту СПС (а) та САТ1 (б) доброякісних і злоякісних пухлинах

Іншу ситуацію спостерігали при дослідженні рівня експресії САТ1. Як видно з даних (рис. 2б) рівні експресії САТ1 у злоякісних пухлинах перевищують ці показники в доброякісних пухлинах ПЗ. Окрім цього, експресія САТ1 у злоякісних пухлинах зростає з прогресією захворювання (рис. 2б). Подібні дані були отримані також у Huang та співавторів [20].

Такі зміни в експресії СПС та САТ1 у клітинах РПЗ можуть призводити до зниження вмісту сперміну, поліаміну, який відповідає за процеси диференціації клітин, а згідно із сучасними даними, відіграє роль інгібітора проліферації у клітинах ПЗ. Окрім цього, наслідком зниження у злоякісних пухлинах рівня СПС та підвищення САТ1 може бути зниження рівня сперміну та зростання вмісту його ацетильованих форм у біологічних рідинах хворих на РПЗ, що може бути використано для диференційної діагностики пухлин ПЗ. Підтвердженням цьому можуть слугувати одержані нами та деякими зарубіжними дослідниками результати щодо суттєвого зниження вмісту сперміну та підвищення рівня ацетильованих ПА у крові та сечі хворих на РПЗ порівняно зі здоровими чоловіками та хворими на гіперплазію ПЗ [21–23]. Згідно з даними сучасних досліджень, визначення сперміну в сечі та крові може слугувати новим, чутливим та неінвазивним маркером для ранньої диференційної діагностики, моніторингу та прогнозу перебігу РПЗ.

Отримані дані щодо змін експресії генів, що кодують ферменти обміну ПА, в подальшому можуть слугувати для розроблення препаратів таргетної дії, які впливатимуть на окремі ланки метаболізму ПА. У світовій літературі вивченню речовин, що впливають на метаболізм ПА, приділяється велика ува-

га. Це стосується не лише відомих інгібіторів ОДК, таких як α -ДФМО, а речовин, що впливають на катаболізм ПА [24].

ВИСНОВКИ

1. Показано, що рівні експресії ОДК у злоякісних пухлинах ПЗ значно нижчі порівняно із ДППЗ. Рівні експресії ОДК у злоякісних пухлинах знижуються з прогресуванням захворювання.

2. Виявлено, що у злоякісних пухлинах ПЗ, на відміну від доброякісних, експресія СПС дуже низька і виявляється лише в слідових кількостях.

3. Встановлено, що, на відміну від СПС, рівні експресії САТ1 у клітинах РПЗ значно вищі, ніж у ДППЗ і зростають із прогресуванням захворювання.

4. У подальшому отримані дані можуть слугувати для уточненої діагностики пухлин ПЗ та пошуку протипухлинних препаратів таргетної дії.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

- Lima AR, Bastos Mde L, Carvalho M, Guedes de Pinho P. Biomarker discovery in human prostate cancer: an update in metabolomics studies. *Transl Oncol* 2016; **9** (4): 357–70.
- Stakhovsky EA, Fedorenko ZP, Vitruk YuV, et al. Prostate cancer screening. *Clin Oncol* 2016; (1): 50–3 (in Russian).
- Lawrentschuk N, Perera M. Benign prostate disorders. Chapter 9. *Endotext*. MDTEXT.COM, 2016. 77 p.
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018; **68**: 394–424.
- Cancer in Ukraine, 2018–2019. Incidence, mortality, activities of oncological service. *Bull Natl Cancer Register Ukr*; Kyiv, 2020; **21**: 82 p. (in Ukrainian).
- Berdinsky NK, Zaletok SP. Polyamines and tumor growth. *Naukova Dumka*, Kyiv, 1987, 141 p. (in Russian).
- Zaletok SP. Polyamines — markers of tumor growth and targets for anticancer therapy. Thesis for the degree of Doctor of Biological Sciences (D. Biol. Sci.) speciality 14.01.07 — oncology. Kyiv, 2007. 37 p. (in Ukrainian).
- Zaletok SP. The role of polyamines in carcinogenesis and tumor growth. *Oncology. Selected lectures for students and doctors ed. VF Chekhun*. Kyiv, 2010: 354–70 (in Ukrainian).
- Soda K. The mechanisms by which polyamines accelerate tumor spread. *J of Exp and Clin Cancer Research* 2011; **30**: 95–104.
- Nowotarski SL, Woster PM, Casero RA Jr. Polyamines and cancer: implications for chemotherapy and chemoprevention. *Expert Rev Mol Med* 2013; **15**: e3. doi: 10.1017/erm.2013.3.
- Kusano T, Suzuki H. (eds.). Polyamines. A Universal molecular nexus for growth, survival, and specialized metabolism. Springer Tokyo Heidelberg New York Dordrecht London. Springer Japan 2015: 330 p.
- Palavan-Unsal N, Aloglu-Senturk SM, Arisan D. The function of polyamine metabolism in prostate cancer. *Exp Oncol* 2006; **28**: 178–86.
- Stacy M, Lloyd, James A, and Sreekumar A. Metabolomic profiling of hormone-dependent cancers: a bird's eye view. *Trends in Endocrinol Metab* 2015; **30**: 1–9.
- Simoneau AR, Gerner EW, Mai Phung, et al. α -Difluoromethylornithine and polyamine levels in the human prostate: results of a phase IIa trial. *J Natl Cancer Inst* 2001; **93**: 57–9.
- Battaglia V, Destefano Shields C, Murray-Stewart T, Casero RA Jr. Polyamine catabolism in carcinogenesis: potential targets for chemotherapy and chemoprevention. *Amino Acids* 2013; **46**: 511–9.

16. **Sovak M, Bellas R, Kim D, et al.** Aberrant nuclear factor- κ B/Rel expression and pathogenesis of breast cancer. *J Clin Invest* 1997; **100**: 2952–60.
17. **Bradford M.** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; **72**: 248–54.
18. **Laemmli UK.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; **227**: 680–5.
19. **Young L, Salomon R, Au W, et al.** Ornithine decarboxylase (ODC) expression pattern in human prostate tissues and ODC transgenic mice. *J Histochem Cytochem* 2006; **54** (2): 223–9.
20. **Huang W, Eickhoff JC, Ghomi FM, et al.** Expression of spermidine/spermine N1-acetyl transferase (SSAT) in human prostate tissues is related to prostate cancer progression and metastasis. *Prostate* 2015; **75**: 1150–9.
21. **Zaletok SP, Klenov OO, Gogol SV, et al.** Blood and urine polyamines as new diagnostic markers of prostate cancer. *Oncology* 2019; **21**: 220–3 (in Ukrainian).
22. **Van der Graaf M, Schipper RG, Oosterhof GO, et al.** Proton MR spectroscopy of prostatic tissue focused on the detection of spermine, a possible biomarker of malignant behavior in prostate cancer. *MAGMA* 2000; **10** (3): 153–9.
23. **Zaletok SP, Shlykovenko VO, Stakhovsky EO, et al.** Polyamines and ribonuclease as markers for differential diagnosis and prognosis of prostate cancer. Guidelines. Kyiv, Ukraine. 2018 (in Ukrainian).
24. **Affronti HC, Rowsam AM, Pellerite AJ, et al.** Pharmacological polyamine catabolism upregulation with methionine salvage pathway inhibition as an effective prostate cancer therapy. *Nat Commun* 2020; **11** (1): 52.

GENE EXPRESSION OF POLYAMINE METABOLISM PROTEINS IN HUMAN PROSTATE CANCER AND BENIGN PROSTATIC HYPERPLASIA

*V.V. Bentrad¹, S.P. Zaletok¹, O.O. Klenov¹,
Yu.V. Vitruk², E.O. Stakhovsky²*

*¹R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology,
Oncology and Radiobiology, NAS of Ukraine,
Kyiv, Ukraine*

²National Cancer Institute, Kyiv, Ukraine

Summary. Prostate cancer and benign prostatic hyperplasia are currently the most common oncopathologies

of older men. Recent studies suggest that the metabolism of polyamines in prostate tumors differs in tumors of other locations. Objective: to investigate the gene expression of polyamines biosynthesis enzymes — ornithine decarboxylase and spermine synthase — and, spermine catabolism enzyme — acetyltransferase in malignant and benign prostate cancer cells. Object and methods: the study was performed on 25 postoperative samples of tumors from patients with prostate cancer (PC) and benign prostatic hyperplasia (BHP): 7 samples of benign and 18 samples of malignant tumors. The gene expression was determined using biochemical, immunological and molecular methods. Results: The decreased level of ornithine decarboxylase expression in malignant prostate tumors was determined compared with benign tumors. It is shown that the level of spermine synthase in malignant prostate tumors, in contrast to benign, detected only in trace amounts. However, the level of expression of spermine acetyltransferase in malignant prostate tumors was higher compared with benign tumors and increased with disease progression. Conclusion: the results indicate the diversity of changes in polyamine metabolism in benign and malignant prostate cancer tumors. The obtained data can be further used for accurate diagnosis of prostate cancer and for the search of targeted anticancer drugs.

Key Words: prostate cancer, benign prostate hyperplasia, polyamines, ornithine-decarboxylase, spermine synthase, spermine acetyltransferase.

Адреса для листування:

Бентрад В.В.
Інститут експериментальної патології,
онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького
НАН України
03022, Київ, вул. Васильківська, 45
E-mail: vbentrad@gmail.com

Одержано: 21.05.202