

Н.Ю. Лук'янова  
Т.В. Задворний  
Т.В. Борікун  
В.Ф. Чехун

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

**Ключові слова:** імплантаційні матеріали, рак молочної залози, рак передміхурової залози, рецепторний статус, адгезія, метастази в кістках, мікроРНК.

## ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ОЦІНКА ВПЛИВУ ІМПЛАНТАЦІЙНИХ МАТЕРІАЛІВ НА БАЗІ ФОСФАТІВ КАЛЬЦІЮ НА МОЛЕКУЛЯРНО- БІОЛОГІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ НОРМАЛЬНИХ ТА ЗЛОЯКІСНО ТРАНСФОРМОВАНИХ КЛІТИН ГОРМОНОЗАЛЕЖНИХ ПУХЛИН

**Мета:** вивчення впливу імплантаційних матеріалів (ІМ) на базі фосфатів кальцію на молекулярно-біологічні характеристики нормальних та злоякісно трансформованих гормонозалежних клітин у системі *in vitro*. **Об'єкт і методи:** клітини нормальних фібробластів людини, лінії раку передміхурової залози (РПЗ) (LNCaP та DU-145) та раку молочної залози (РМЗ) (MCF-7, MDA-MB-231) людини культивували з ІМ у дозі, що відповідає ІС30 (100 мкг/мл). Рівні експресії молекулярних маркерів визначали імуноцитохімічним методом. Рівні мікроРНК оцінювали методом кількісної ПЛР. Аналіз функціональних зв'язків та взаємодій між дослідними молекулами проводили за допомогою алгоритму STRING v.11.0. Статистичний аналіз результатів виконували з використанням пакета програмного забезпечення Statistica 6.0. **Результати:** при аналізі цитоморфологічних особливостей клітин, що зазнали впливу ІМ, виявлено односпрямований характер змін, які свідчать про підвищення їх адгезивних властивостей, що підтверджується зростанням показників експресії E- та N-кадгерину в клітинах ліній РМЗ та РПЗ людини. Встановлено, що під дією досліджуваної речовини у клітинах РМЗ та РПЗ відбувається підвищення рівня експресії онкогенної мікроРНК-221, що сприяє зниженню рівня рецепторів стероїдних гормонів. Визначено, що ІМ не впливають на рецепторний статус, показники експресії молекул адгезії та Ki-67 у клітинах нормальних фібробластів. **Висновки:** культивування злоякісно трансформованих клітин ліній РМЗ та РПЗ людини з ІМ призводить до зниження їх інвазивних властивостей за рахунок зміни цитоархітекτονіки та адгезивних характеристик. Встановлені зміни посттранскрипційної регуляції білків, асоційованих із рецепторним статусом, у клітинах РМЗ та РПЗ під впливом імплантаційних матеріалів на базі фосфатів потребують подальших досліджень.

### АКТУАЛЬНІСТЬ

Метастази в кістках опорно-рухового апарату є найбільш тяжким та частим наслідком прогресування як раку передміхурової залози (РПЗ) (54–85%), так і раку молочної залози (РМЗ) (47–85%), які сьогодні [1–5] є найпоширенішими формами онкологічної патології репродуктивної системи у жінок і чоловіків в Україні та у всьому світі [6, 7]. Їх виникнення супроводжується такими ускладненнями, як біль, патологічні переломи, гіперкальціємія, погіршення загального стану пацієнта, що суттєво знижує якість життя, викликає потребу в постійному догляді за хворим та призводить до повної інвалідації [8, 9].

Кісткові метастази за характером деструкції тканини поділяють на літичні та пластичні. Наявність вираженого взаємозв'язку між процесами остеолізу і кісткоутворення в нормі та при патологічних процесах у кістках дозволяє розглядати будь-яке метастатичне ураження як змішане з переважанням літичного або пластичного компонента [1].

За наявності остеолітичного ураження кісток, яке спостерігається при РМЗ, відбувається підвищення активності остеокластів і руйнування кісткової тканини внаслідок секреції колагеназ та інших ферментів. При цьому спостерігається підвищена продукція Parathyroid hormone-related protein (PTHrP), перш за все в кістковому мікрооточенні.

Внаслідок цього кістка руйнується власними нормальними клітинами хворого [10].

Остеобластичні метастази, навпаки, характеризуються ущільненням мінеральної частини тканини. У хворих на РПЗ найчастіше виявляють саме остеобластичне ураження кісток. Прискорене зростання кісткової тканини може бути стимульоване факторами, які секретуються клітинами РПЗ, такими як ендотелін-1, трансформуючий фактор росту- $\beta$ , і фактор росту фібробластів. При цьому механізми остеобластичного й остеолітичного метастазування остаточно не відомі [11–13].

Упродовж багатьох років основним методом лікування метастазів у кістках залишався накістковий і внутрішньокістковий остеосинтез. Він відрізнявся поганими функціональними результатами і лише в окремих пацієнтів тільки у 80-х роках ХХ століття (після впровадження сучасних режимів хіміотерапії) почали застосовувати ендопротезування. Для цього використовують різні замітники, а саме аутотрансплантати, алотрансплантати й імплантати різного походження (керамічні, вуглецеві, металеві). Вважається, що заміщення власною кісткою — аутотрансплантатом — має обмежене застосування, оскільки досить часто ускладнюється розсмоктуванням останнього. Крім того, використання аутотрансплантата обмежується його розмірами: дефект часто набагато більший, ніж аутотрансплантат [14].

Застосування алотрансплантата було досить поширеним і успішним. Ця методика дозволяє заміщувати досить значні за розмірами дефекти кісток і суглобів, проте досі залишається багато складнощів, які обмежують застосування трансплантатів цього типу [15].

Іншим методом заміщення дефектів кісток після резекції пухлин є застосування імплантатів. Керамічні імплантати мають обмежене застосування і можуть використовуватися для заміщення невеликих дефектів діафізу. Дані імплантати, як і імплантати з вуглецю, не можуть застосовуватися при ураженні пухлиною суглобового кінця кістки [15].

Таким чином, сьогодні у сфері ендопротезування хворих зі злоякісними пухлинами кісток залишається ще багато невирішених проблем. Це, поперше, створення ендопротеза, що володіє властивостями істинного суглобового зчленування; по-друге, проблема переносимості імплантатів; по-третє, проблема формування чітких показань до органозберігаючих операцій з урахуванням дисемінації пухлинного процесу та ефективного додаткового хіміо- та променевого лікування, спрямованого на зменшення обсягу пухлини перед органозберігаючою операцією, профілактику рецидиву і метастазів; по-четверте, проблема післяопераційної реабілітації хворих тощо [14]. Це свідчить про необхідність розроблення нових способів кістково-замісної хірургії та підходів до ендопротезування пацієнтів з онкопатологією з використанням сучасних матеріалів [16, 17].

Актуальним у цьому аспекті вважається використання ІМ — класу сполук, які містять елементи, що входять до структури кісткової тканини. Очевидно, що перевагами використання імплантатів ІМ є висока біосумісність, біоактивність та остеопродовідність. Крім того такі імплантати є остеоіндуктивними та остеопрототипними завдяки виділенню іонів  $\text{Ca}^{2+}$  та  $\text{PO}_4^{3-}$ , які стимулюють утворення кісткової тканини. Вони також мають перевагу в тому, що використовуються в різних формах, наприклад, порошкове покриття, об'ємна ін'єкційна паста чи для 3D-друку матриць при складних кісткових дефектах [18].

Водночас остаточно не досліджені особливості взаємодії ІМ з нормальними та злоякісно трансформованими клітинами та невідомі молекулярно-біологічні механізми їх дії. Враховуючи вищевикладене, мета нашої роботи — вивчити вплив ІМ на молекулярно-біологічні характеристики нормальних та злоякісно трансформованих гормонозалежних клітин у системі *in vitro*.

### ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

*Клітинні лінії та умови їх культивування.* Для проведення експериментальних досліджень лінії клітин отримані з клітинного банку ліній із тканин людини та тварин Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України. Нормальні фібробласти людини культивували у поживному середовищі Dulbeccos Modified Eagles Medium (DMEM) (Sigma, США) з додаванням 10% фетальної сироватки теляти (ФСТ) (Sigma, США) та 40 мкг/мл гентаміцину. Клітини MCF-7 вирощували в середовищі DMEM з додаванням рекомбінантного людського інсуліну (0,01 мг/мл) і 10% ФСТ. Клітини MDA-MB-231 культивували в середовищі L-15 (Sigma, США) Лейбовіца, доповненому 10% ФСТ. Клітини DU-145 вирощували в середовищі DMEM (Invitrogen, C11995) з додаванням 10% ФСТ (Gibco/Invitrogen, 10099–141), 100 ОД/мл пеніциліну G та 100 мкг/мл стрептоміцину (Invitrogen, 15070–063) при 37 °C у зволоженому інкубаторі з 5%  $\text{CO}_2$  та під культивацією кожні 2–3 дні. Клітини LNCaP вирощували в DMEM/F12 (Invitrogen, C11330) з додаванням 10% ФСТ, 100 ОД/мл пеніциліну G та 100 мкг/мл стрептоміцину.

Усі клітинні лінії культивували у зволоженої атмосфері з 5%  $\text{CO}_2$ , при температурі 37 °C. Клітини пересівали двічі на тиждень зі щільністю посіву  $2\text{--}4 \cdot 10^4$  клітин на  $\text{cm}^2$  поверхні. Пересів клітини робили, коли вони займали 50% поверхні ємності для культивування.

*МТТ-тест* використовували для оцінки цитотоксичного впливу імплантаційних матеріалів на клітини всіх досліджуваних ліній. Тест проводили у 96-лункових планшетах із використанням розчину МТТ (Sigma, США) (5 мг/мл фосфатно-сольового буферу). Для розчинення кристалів формазану у кожному лунку додавали 100 мкл диметилсульфоксиду (Serva, Німеччина). Величину оптичного по-

глинання розчину вимірювали за допомогою мультиплексного спектрофотометра («STAT FAX 2100» США) при довжині хвилі 540 нм (ОП 540) і визначали відносно контролю кількість живих клітин.

ІМ — це кістковий матеріал на основі гідроксилапатиту і  $\beta$ -трикальційфосфату.

Гідроксилапатит (ГАП) —  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  — повний хімічний та кристалохімічний аналог мінеральної речовини кістки ссавців, що зумовлює унікальні біологічні властивості цього матеріалу: абсолютну імунну сумісність і біоактивність — здатність стимулювати остеогенез, зрощуватися з кісткою, слугувати будівельним матеріалом для синтезу кістки і входити до складу кісткової тканини, що заміщає імплантат із ГАП.

$\beta$ -Трикальційфосфат —  $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  — повний хімічний аналог мінеральної речовини кісткової тканини. Володіє абсолютною біосумісністю, але за рахунок невідповідності кристалічної структури і підвищеної розчинності порівняно із ГАП швидше резорбується в організмі. На основі ГАП і трикальційфосфату в Інституті проблем матеріалознавства ім. І.М. Францевича НАН України створено сімейство біоактивних імплантаційних матеріалів для кісткової хірургії.

Оскільки досліджувані матеріали нерозчинні у водному середовищі, для проведення МТТ-тесту їх подрібнювали у фарфорових тигелях і просіювали через сито з величиною пор 0,9 мкм. Стерилізацію матеріалу проводили шляхом нагрівання в сухожаровій шафі до температури 200 °С протягом 1 год. Визначення цитотоксичності імплантаційних матеріалів на базі ФК виконували з використанням стокового розчину в культуральному середовищі з концентрацією речовини 1 мг/мл протягом 48 год. У результаті проведення МТТ-тесту визначено, що досліджувані імплантаційні матеріали мають дуже низьку токсичність. Дози IC30 та IC50 для клітин для всіх досліджуваних ліній були однаковими і становили 100 та 375 мкг/мл відповідно.

*Морфологічні дослідження* проводили після забарвлення за Романовським — Гімза цитологічних препаратів нормальних фібробластів людини, клітин раку передміхурової та молочної залози людини. Препарати досліджували за допомогою імерсійної системи мікроскопа Primo Star (Zeiss, Німеччина) при збільшенні 1000.

Для імуноцитохімічного дослідження використані клітини, які культивували у чашці Петрі на покривних скельцях протягом 1 доби за звичайних умов. У подальшому покривні скельця відмивали від залишків поживного середовища у фізіологічному розчині та фіксували розчином метанолу і ацетону при температурі  $-20$  °С.

Для детекції реакції використовували систему Lab Vision™ UltraVision™ Quanto Detection System (Thermo Scientific, США), після чого дозобарвлювали гематоксилином Майєра (Thermo Scientific,

США) та заключали у Faramount Aqueous Mounting Medium (Thermo Scientific, США).

Як первинні антитіла використовували МкАт до рецептора андрогену (AR) (clone 441), рецепторів естрогену  $\alpha$  (ER  $\alpha$ ) (clone 1D5) і естрогену  $\beta$  (ER  $\beta$ ) (clone 14C8), рецептора прогестерону (PR) (clone PgR636), рецептора епідермального фактора росту (HER2/neu) (clone e2-4001), E-кадгерину (clone NCH-38), N-кадгерину (clone CD235), Ki-67 (clone SP6).

Аналіз результатів імуноцитохімічних досліджень проводили, використовуючи методику підрахунку імунопозитивних клітин (на світловому мікроскопі PrimoStar (Zeiss, Німеччина), зі збільшенням (x 100–400). Щоб оцінити експресію досліджуваних молекул кількісно, при імуноцитохімічних дослідженнях використовували метод H-Score за формулою:

$$S = N_0 (\%) + 3 \cdot N_1 (\%) + 2 \cdot N_2 (\%) + 1 \cdot N_3 (\%),$$

де S — показник «H-Score»,  $N_0$  — кількість клітин з відсутньою експресією,  $N_1$ ,  $N_2$  та  $N_3$  — з низькою, середньою та високою експресією відповідно. Кінцевий результат підрахунку виражали у балах: від 1 до 100 балів — низький, від 101 до 200 — середній, від 201 до 300 — високий рівень експресії [19, 20].

*Метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР)* у реальному часі використовували для дослідження експресії мікроРНК у пухлинних клітинах різних культур. Виділення тотальної РНК проводили за допомогою комерційного набору «РИБО-Преп» («Амплісенс», Росія). Кількість виділеної РНК визначали на спектрофотометрі «NanoDrop 2000c Spectrophotometer» (ThermoScientific, США). Чистоту виділеної РНК контролювали, використовуючи співвідношення величин оптичного поглинання при довжині хвиль 260 та 280 нм. РНК розчиняли у трис-ЕДТА-буфері та до проведення ПЛР зберігали при температурі  $-20$  °С. Одноланцюгову ДНК синтезували зі 100 нг загальної РНК з використанням набору TaqMan для зворотної транскрипції.

ПЛР зі зворотною транскриптазою (ЗТ-ПЛР) проводили в ампліфікаторі «Терцик» («ДНК-технологія», Росія). QRT-ПЛР проводили на системі виявлення Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System з використанням TaqMan MicroRNA Assay. Після закінчення ЗТ-ПЛР до продукту реакції додавали суміш реагентів і проводили ПЛР у реальному часі за заданими умовами.

Як ендogenous контроль для об'єктивізації показників експресії використовували мікроРНК RNU48, оскільки для неї показана мінімальна дисперсія в періоді порогового циклу ( $C_T$ ) порівняно з іншими ендogenous контролями, протестованими на шести досліджених лініях [21, 22].

Відносна експресія досліджуваних мікроРНК визначена порівняльним  $C_T$ -методом. Дослід проведення у трьох паралелях для кожної лінії і ПЛР у трьох повторях для кожного зразка.

Пороговий цикл був усереднений в усіх технічних і біологічних репліках для кожної лінії. Різницю фолду (Fold change, fold difference) між експресією досліджуваних мікроРНК відносно лінії контролю обчислювали за формулою  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Похибки для розрахунків різниці фолду показують діапазон значень  $\Delta\Delta Ct$ , які базуються на включенні стандартного відхилення в ці значення.

**Метод біоінформатичного аналізу.** Для пошуку й аналізу функціональних зв'язків та взаємодій між дослідними молекулами використані база даних та алгоритм STRING v.11.0. Аналізують наявні наразі знання, опубліковані на інформаційних наукових платформах, в журналах Scopus та інших базах даних щодо генної чи білкової експресії та взаємодії.

**Статистичний аналіз** результатів виконували з використанням пакета програмного забезпечення Statistica 6.0 (StatSoft Inc., США). Усі дані отримані у трьох повторях. Значення виражали як середнє значення  $\pm$  стандартне відхилення (SD). Тест Стьюдента використовували для оцінки значущості відмінностей між групами,  $p < 0,05$  розглядали як достовірну різницю.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

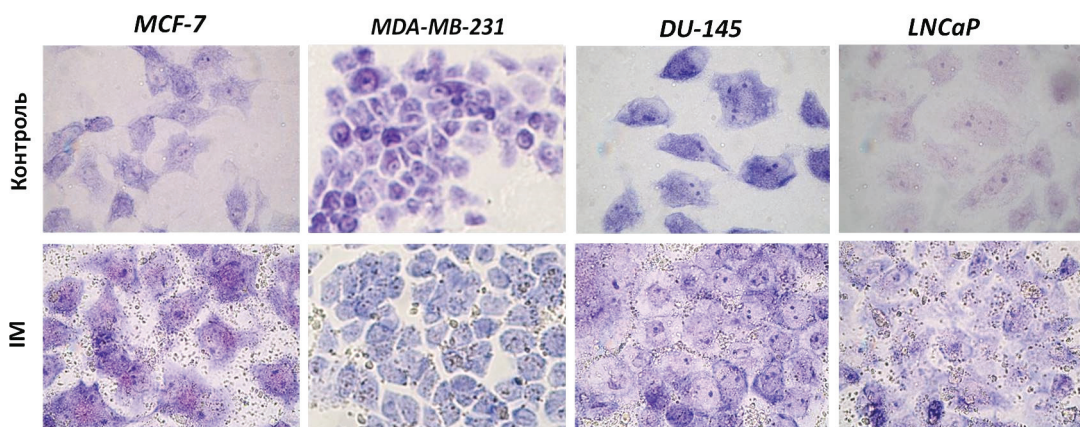
**Цитоморфологічне дослідження впливу ІМ на біологічні властивості нормальних фібробластів та клітин ліній РПЗ і РМЗ людини.** Проведено цитоморфологічний аналіз результатів тестування впливу ІМ на біологічні властивості НФ і 4 клітинних ліній гормонозалежних злоякісних пухлин: РПЗ (LNCaP та DU-145) та РМЗ (MCF-7 та MDA-MB-231) людини.

Аналіз цитоморфологічних особливостей клітин НФ людини, що зазнали впливу ІМ, свідчить про відсутність будь-яких змін їхньої будови.

Дослідження цитологічних препаратів, виготовлених із клітин лінії LNCaP, які не зазнали впливу ІМ (контроль), а також тих, які культивувалися у присутності цього матеріалу, показали нижченаведене. Клітини культур контролю характеризувалися різноманітним ростом: у вигляді відокремлених клі-

тин, невеликих груп та скупчень, ланцюжків і лише окремих, більших за чисельністю, клітинних угруповань. Клітини досліджених культур, які зазнали впливу ІМ, за цитоархітектонікою мало чим відрізнялися від клітин контролю. Водночас у значній кількості клітин виявлено появу відростків, що сприяло їх тіснішому зв'язку між собою. Такі зміни зумовлювали утворення значної кількості добре згрупованих, великих за розміром структур осередкового типу та великих площин із достатньо щільно з'єднаними між собою пухлинними клітинами (ПК) (рис. 1). Аналогічна закономірність стосовно підвищення адгезивних властивостей ПК була властива і для другої клітинної культури РПЗ людини — DU-145. За умов культивування без додавання ІМ розміщення клітини лінії DU-145 носило сегрегований характер. Клітини мали округлу, овальну, полігональну форму, незначний за об'ємом ободок цитоплазми та бульбашкоподібне ядро з одним, рідше двома, ядерцями. Внаслідок культивування клітин цієї лінії із ІМ відбувалась агрегація клітин в осередки різної величини та форми, в яких клітини мали щільніше розміщення. Тобто адгезивні властивості клітин під впливом цього біосумісного матеріалу зростали. Зазначимо, що при мікроскопічному дослідженні цитологічних препаратів клітин лінії DU-145 (як і лінії LNCaP) спостерігали дифузне дрібнозернисте фонове накопичення цього матеріалу, а подекуди — намістопоподібне скупчення його конгломератів (див. рис. 1).

При дослідженні впливу ІМ на клітини ліній MCF-7 та MDA-MB-231, які отримані від хворих на РМЗ, встановлено закономірності, аналогічні описаним для клітин ліній РПЗ. На відміну від контролю, де в основному виявляли лише незначні угруповання великих за розмірами ПК із пінчастою цитоплазмою та бульбашкоподібним ядром з інтенсивно забарвленим ядерцем, у клітинних культурах після впливу ІМ спостерігали досить великі за площею скупчення клітин, а також дифузно розсіяну або у вигляді скупчень зернистість досліджуваної речо-



**Рис. 1.** Клітини ліній РМЗ та РПЗ людини. Розрізнене розміщення невеликої кількості ПК у контролі,  $\times 400$ . Дифузне розміщення нерозчинних зерен ІМ,  $\times 1000$ . Забарвлення гематоксиліном та еозином

вини. Інколи вона створювала фон, який перешкоджав визначенню архітектури клітин (див. рис. 1).

Таким чином, результати цитоморфологічних досліджень впливу ІМ свідчать, що протестований біосумісний імплантаційний матеріал індукує *in vitro* підвищення адгезивних властивостей клітин ліній РПЗ (LNCaP, DU-145) та РМЗ (MCF-7, MDA-MB-231) людини.

**Вплив ІМ на рецепторний статус НФ і клітин ліній РПЗ та РМЗ людини.** У ході дослідження експресії рецепторів стероїдних гормонів та рецептора епідермального фактора росту в НФ людини встановлено, що для цих клітин характерний середній рівень експресії ER $\alpha$ , ER $\beta$ , PR, AR і низький рівень експресії HER2/neu (84,5  $\pm$  6,6 бала H-Score). Культивування НФ людини у присутності ІМ не впливало на рецепторний статус досліджуваних клітин ( $p > 0,05$ ).

Клітини гормоночутливої лінії РМЗ людини MCF-7 характеризуються високим рівнем ER $\alpha$  (291,0  $\pm$  2,4 бала H-Score), PR (291,0  $\pm$  2,4 бала H-Score) та AR (214,0  $\pm$  7,5 бала H-Score), середнім рівнем ER $\beta$  (176,4  $\pm$  6,8 бала H-Score) і відсутністю HER2/neu. Культивування клітин MCF-7 з ІМ призводило до певного зниження рівня експресії ER $\alpha$  (в 1,2 раза,  $p < 0,05$ ), ER $\beta$  (в 1,4 раза,  $p < 0,05$ ), PR (в 1,2 раза,  $p < 0,05$ ) та AR (в 1,2 раза,  $p < 0,05$ ). Негайивний рецепторний статус клітин гормонорефрактерної лінії MDA-MB-231 після культивування з ІМ не змінювався (таблиця).

Клітини обох ліній РПЗ (DU-145 та LNCaP) характеризувалися наявністю рецепторів стероїдних гормонів та HER2/neu. Не зважаючи на те що клітини лінії DU-145 є гормонорефрактерними, у них встановлено такий же високий рівень експресії AR (282,0  $\pm$  14,0 бала H-Score) як і у гормоночутливих клітинах LNCaP (270,0  $\pm$  8,0 бала H-Score). Для клітин обох досліджуваних ліній були притаманні високий рівень ER $\beta$ , низький ER $\alpha$  та середній рівень експресії PR. Не визначено достовірних відмінностей між показниками експресії HER2/neu у лініях DU-145 та LNCaP, яка в обох випадках була низькою. Культивування клітин обох ліній РПЗ людини у присутності ІМ призводило до зниження рівня експресії усіх досліджуваних рецепторів, незалежно від чутливості до гормональної терапії. Зокрема, у клітинах лінії

LNCaP виявлено зниження показника експресії ER $\alpha$  (у 2,0 раза,  $p < 0,05$ ), ER $\beta$  (в 1,5 раза,  $p < 0,05$ ), PR (у 3,8 раза,  $p < 0,05$ ), HER2/neu (у 2,8 раза,  $p < 0,05$ ) та AR (в 1,3 раза,  $p < 0,05$ ). У клітинах лінії DU-145 найбільше зниження експресії під дією ІМ було характерним для PR та HER2/neu (на 79,5%,  $p < 0,05$  та 74,2%,  $p < 0,05$  відповідно).

Отже, культивування клітин ліній РПЗ та РМЗ з ІМ призводить до зниження показників експресії рецепторів стероїдних гормонів та рецептора епідермального фактора росту (див. таблицю).

**Вплив ІМ на експресію молекул адгезії у НФ і клітинах ліній РПЗ та РМЗ людини.** Проаналізовано вплив ІМ на експресію молекул адгезії E- та N-кадгерин у НФ людини та ПК ліній РПЗ та РМЗ людини. Встановлено, що НФ людини характеризувалися високими рівнями експресії E- та N-кадгерину (273,0  $\pm$  6,3 та 269,6  $\pm$  5,6 бала H-Score), який не змінювався після їх культивування з досліджуваною речовиною. Клітини обох ліній РПЗ характеризуються низьким рівнем експресії E-кадгерину, тоді як рівень N-кадгерину у клітинах DU-145 був в 1,4 раза нижчим порівняно із клітинами LNCaP (див. таблицю).

Під дією ІМ відбувається значне підвищення експресії E-кадгерину у клітинах ліній LNCaP та DU-145 (у 23,0 ( $p < 0,05$ ) та 4,7 ( $p < 0,05$ ) раза відповідно). Також зафіксовано підвищення рівня N-кадгерину в клітинах лінії DU-145 в 1,4 ( $p < 0,05$ ) раза, на відміну від клітин гормоночутливої лінії LNCaP, де його експресія залишалася на сталому рівні та становила 256,0  $\pm$  10,6 бала H-Score.

Культивування з ІМ клітин лінії MCF-7 РМЗ людини, які характеризувалися високим рівнем експресії E-кадгерину (268,0  $\pm$  4,6 бала H-Score) та низьким рівнем N-кадгерину (59,0  $\pm$  1,6 бала H-Score) призводило до підвищення у 3,8 ( $p < 0,05$ ) раза експресії останнього (див. таблицю). У клітинах іншої лінії РМЗ — MDA-MB-231 під дією ІМ виявлено також значне зростання експресії як E-кадгерину (у 3,6 раза,  $p < 0,05$ ), так і N-кадгерину (у 6,8 раза,  $p < 0,05$ ).

Таким чином отримані нами результати імунітохімічного дослідження впливу ІМ на адгезивні властивості НФ і клітин ліній РПЗ та РМЗ людини

Таблиця

Вплив ІМ на молекулярний профіль НФ людини та клітин ліній РМЗ та РПЗ людини

Клітинна лінія		Рецепторний статус					Молекули адгезії		Проліферативна активність Ki-67
		ER $\alpha$	ER $\beta$	PR	HER2	AR	E-cadherin	N-cadherin	
НФ людини	Контроль	165,4 $\pm$ 12,3	151,5 $\pm$ 7,4	104,3 $\pm$ 8,0	84,5 $\pm$ 6,6	176,5 $\pm$ 8,6	273,0 $\pm$ 6,3	269,6 $\pm$ 5,6	260,0 $\pm$ 8,3
	+ ІМ	156,0 $\pm$ 9,0	137,6 $\pm$ 8,1	109,6 $\pm$ 7,6	86,6 $\pm$ 10,0	180,0 $\pm$ 8,6	282,6 $\pm$ 3,3	276,6 $\pm$ 4,3	255,0 $\pm$ 6,6
MCF-7	Контроль	291,0 $\pm$ 2,4	176,4 $\pm$ 6,8	291,0 $\pm$ 2,4	0	214,0 $\pm$ 7,5	268,0 $\pm$ 4,6	59,0 $\pm$ 1,6	291,0 $\pm$ 2,4
	+ ІМ	<b>236,5<math>\pm</math>6,3*</b>	<b>130,3<math>\pm</math>7,2*</b>	<b>243,5<math>\pm</math>8,2*</b>	0	<b>175,3<math>\pm</math>6,0*</b>	278,3 $\pm$ 2,6	<b>227,0<math>\pm</math>8,2*</b>	284,3 $\pm$ 5,6
MDA-MB-231	Контроль	0	124,7 $\pm$ 5,8	0	0	42,6 $\pm$ 6,2	49,0 $\pm$ 1,3	31,0 $\pm$ 0,7	268,0 $\pm$ 1,9
	+ ІМ	0	<b>80,4<math>\pm</math>6,0*</b>	0	0	35,5 $\pm$ 4,4	<b>176,6<math>\pm</math>4,3*</b>	<b>213,0<math>\pm</math>7,5*</b>	273,4 $\pm$ 9,3
LNCaP	Контроль	98,0 $\pm$ 12,0	280,0 $\pm$ 10,6	150,0 $\pm$ 17,6	94,0 $\pm$ 4,0	270,0 $\pm$ 8,0	11,3 $\pm$ 1,5	247,0 $\pm$ 11,6	265,0 $\pm$ 20,5
	+ ІМ	<b>49,0<math>\pm</math>5,6*</b>	<b>186,5<math>\pm</math>11,3*</b>	<b>40,5<math>\pm</math>4,0*</b>	<b>33,0<math>\pm</math>5,6*</b>	<b>204,0<math>\pm</math>10,3*</b>	<b>260,0<math>\pm</math>12,5*</b>	256,0 $\pm$ 10,6	265,3 $\pm$ 7,5
DU-145	Контроль	80,0 $\pm$ 13,0	276,0 $\pm$ 9,3	117,0 $\pm$ 2,4	84,0 $\pm$ 11,3	282,0 $\pm$ 14,0	35,0 $\pm$ 6,6	175,0 $\pm$ 12,7	174,0 $\pm$ 24,6
	+ ІМ	<b>56,0<math>\pm</math>2,4*</b>	<b>187,4<math>\pm</math>7,3*</b>	<b>24,5<math>\pm</math>5,6*</b>	<b>21,6<math>\pm</math>5,3*</b>	<b>193,6<math>\pm</math>8,5*</b>	<b>164,6<math>\pm</math>8,6*</b>	<b>246,0<math>\pm</math>3,5*</b>	179,6 $\pm$ 8,6

\* $p < 0,05$  порівняно з контролем.

свідчать про зростання показників експресії E- та N-кадгерину у клітинах злоякісних пухлин.

**Вплив ІМ на проліферативну активність фібробластів і клітин ліній РПЗ та РМЗ людини.** Результати дослідження експресії Ki-67 НФ людини після впливу на них ІМ продемонстрували відсутність ефекту останнього: інтактні НФ характеризувались експресією Ki-67 —  $260,0 \pm 8,3$  бала Н-Score, при дії ІМ — становила  $255,0 \pm 6,6$  бала Н-Score.

У ході аналізу результатів імуноцитохімічного дослідження експресії Ki-67 у клітинах ліній РПЗ встановлено, що клітини гормонорезистентної лінії DU-145 мають дещо вищі (в 1,5 раза,  $p < 0,05$ ) показники проліферативної активності порівняно з гормоночутливими клітинами лінії LNCaP. Культивування клітин обох ліній з ІМ не призводило до достовірної зміни експресії Ki-67, а тому й не викликало змін їх проліферативної активності (див. таблицю). Клітини обох ліній РМЗ характеризувались високим рівнем експресії Ki-67, який не змінювався після культивування клітин з ІМ.

Отже, нами визначено, що культивування НФ людини, клітин РПЗ та РМЗ з ІМ не впливало на рівень їх проліферативної активності.

**Вплив ІМ на рівень експресії мікроРНК-221 та мікроРНК-320а у НФ і клітинах ліній РПЗ та РМЗ людини.** Відомо, що виникнення та прогресія злоякісних новоутворень може бути наслідком зміни рівня певних мікроРНК. Показано, що більше 2 тис. мікроРНК людини потенційно здатні регулювати роботу сотень генів. Ці молекули контролюють експресію генів на посттранскрипційному рівні, викликаючи деградацію мРНК-мішеней, або порушення трансляції і тим самим відіграють ключову роль у підтримці клітинного гомеостазу, беруть участь у регуляції клітинного циклу, диференціюванні, у процесах апоптозу, інвазії та, що важливо, здатні виступати в ролі найважливіших регуляторів, пов'язаних із пухлинним ростом [23, 24].

За участю мікроРНК у пухлинному процесі їх можна розділити на онкогенні мікроРНК (зміна експресії яких призводить до пухлинного росту) та онкосупресорні (експресія яких інгібує розвиток та знижує виживаність трансформованих клітин) [24].

Нами проведено дослідження експресії мікроРНК в НФ людини. Як видно з даних (рис. 2), рівні мікроРНК-221 та мікроРНК-320а становили  $0,10 \pm 0,04$  та  $0,15 \pm 0,02$  ум. од. та не змінювалися після культивування з ІМ.

Рівень онкогенної мікроРНК-221 у клітинах гормоночутливої лінії РМЗ (MCF-7) становив  $0,71 \pm 0,12$  ум. од., тоді як у клітинах гормонорезистентної лінії MDA-MB-231 її рівень був значно вищим —  $21,25 \pm 0,90$  ум. од. (рис. 3). Показники експресії онкосупресорної мікроРНК-320а становили  $0,11 \pm 0,30$  та  $76,63 \pm 2,60$  ум. од. відповідно. Під дією ІМ відбувається підвищення рівня експресії онкогенної мікроРНК-221 у 8,9 раза ( $p < 0,05$ ) у клітинах лінії MCF-7, при цьому показники мікроРНК-320а до-

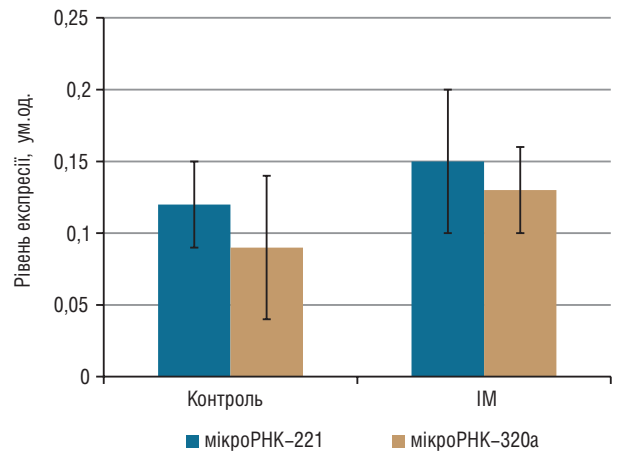


Рис. 2. Вплив ІМ на експресію мікроРНК в НФ людини

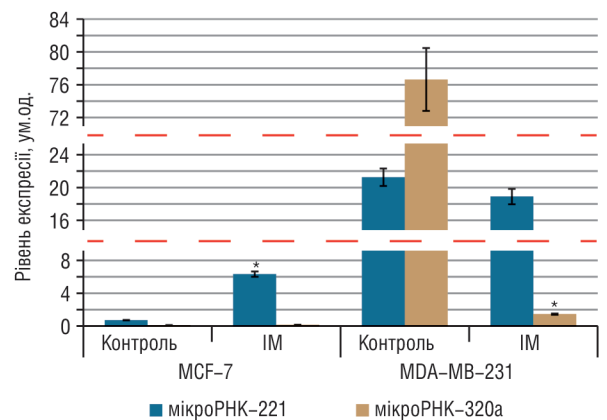


Рис. 3. Вплив ІМ на експресію мікроРНК у клітинах ліній РМЗ людини з різною чутливістю до гормональної терапії \* $p < 0,05$  порівняно з контролем.

стовірно не змінювалися. Водночас у клітинах гормонорезистентної лінії MDA-MB-231 нами виявлено зниження у 52,4 раза ( $p < 0,05$ ) рівня онкосупресорної мікроРНК-320а.

Показано, що культивування клітин ліній РПЗ людини з ІМ призводить до підвищення експресії мікроРНК-221 та зниження рівня мікроРНК-320а: відповідно у клітинах у лінії LNCaP — у 4,0 ( $p < 0,05$ ) та 6,0 ( $p < 0,05$ ) раза, лінії DU-145 — у 2,0 ( $p < 0,05$ ) та 3,5 ( $p < 0,05$ ) раза (рис. 4).

Отже, нами виявлено, що культивування гормоночутливих та гормонорезистентних ліній РМЗ та РПЗ людини з ІМ призводить до зміни співвідношення онкогенної мікроРНК-221 та онкосупресорної мікроРНК-320а.

Розроблення і використання нових терапевтичних підходів до пацієнтів із метастазами в кістках потребує глибокого розуміння молекулярних механізмів — як власне метастатичних процесів, так і можливої взаємодії між пухлинними клітинами та імплантатами, що використовуються при ендопротезуванні. Біоімплантати, що використовуються для заміщення ураженої кістки, можуть бути виготовлені з різних матеріалів; кожен наявний клас матеріалів має різні властивості як з біологічної, так і

з механічної точки зору. Усі ці особливості потрібно ретельно вивчити з метою уникнення таких негативних ефектів, як відторгнення імплантів, а також додаткової операції для пацієнтів [15].

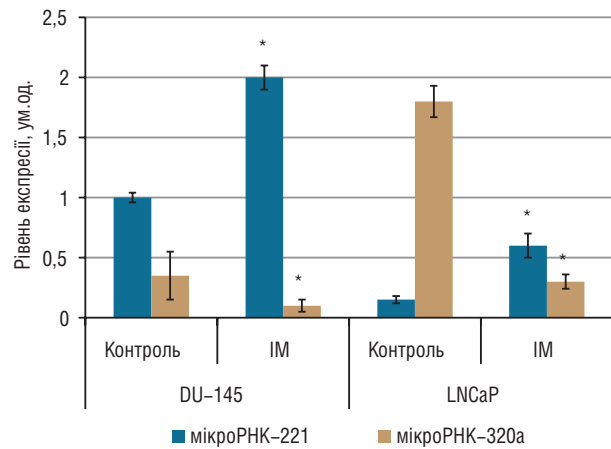
У ході проведеного нами дослідження в системі *in vitro* встановлено, що культивування клітин ліній РМЗ та РПЗ людини з ІМ призводить до зміни адгезивних властивостей клітин та експресії рецепторів стероїдних гормонів, а також балансу онкогенних та онкосупресорних мікроРНК. З метою виявлення можливих протеїн-протеїнових взаємодій (protein-protein interaction) між досліджуваними молекулами нами проведено біоінформатичний аналіз (рис. 5) за допомогою бази даних та алгоритму STRING v.11.0 (<https://version11.string-db.org>). Отримані результати представлено у вигляді карти-схеми, яка відображає відомі та прогнозовані білкові взаємодії (включаючи як прямі (фізичні), так і непрямі (функціональні) асоціації). Між 6 протеїнами (вузлами на карті) встановлено 14 можливих взаємодій (лінії/ребра між вузлами). Згідно з отриманими результатами, зниження рівня експресії рецепторів стероїдних гормонів, зокрема AR, а також HER2/neu призводить до підвищення рівня експресії таких адгезивних молекул, як E- та N-кадгерин.

У формуванні метастатичних ніш РПЗ та РМЗ у кістковій тканині, а також набуття певного фенотипу клітинами, які метастазують, окрім білок-білкових взаємодій значну роль відіграє епігенетична регуляція. Зокрема, відомо, що мікроРНК є як внутрішньоклітинним, так і гуморальним фактором, оскільки вони здатні запускати процеси остеогенезу та остеолізу.

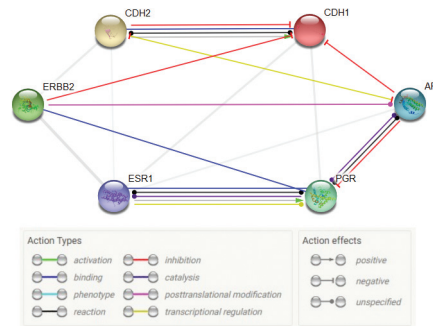
При виборі мікроРНК нами проаналізовано ряд баз даних (TargetScan, miRTarBase, miRBase, DIANA TOOLS та ін.), де наявна інформація щодо ролі мікроРНК у регуляції різних процесів, асоційованих з остеогенезом та онкогенезом, а також їх потенційні мішені. Нами вибрано мікроРНК-221 та -320a, оскільки експериментально доведено їх участь у злоякісній трансформації, метастазуванні пухлин, а також у нормі вони залучені у процеси формування кісток.

У свою чергу, виявлене нами зниження рівнів експресії рецепторів стероїдних гормонів у клітинах ліній РМЗ та РПЗ людини можна пояснити високою концентрацією іонів  $Ca^{2+}$ , що виділяється у процесі метастатичного руйнування кісток або ж, як у досліджуваному випадку, — з імплантів. Показано [25, 26], що  $Ca^{2+}$  здатний інгібувати експресію AR та ER $\alpha$  у клітинах ліній РМЗ та РПЗ і таким чином брати участь у процесах злоякісного росту.

Подібні результати, що вказують на можливу участь ГАП, хоч і природного походження, у посиленні патологічного процесу, пов'язаного з раком молочної залози продемонстровано в дослідженні [27]. Встановлено, що кристали ГАП посилюють мітогенез у клітинних лініях РМЗ MCF-7 та



**Рис. 4.** Вплив ІМ на експресію мікроРНК у клітинах ліній РПЗ людини з різною чутливістю до гормональної терапії \* $p < 0,05$  порівняно з контролем.



**Рис. 5.** Карта взаємодії білків, експресія яких досліджувалася у клітинах ліній РМЗ та РПЗ людини ERBB2-Her2/neu, CDH1-E-кадгерин, CDH2-N-кадгерин, ESR-ER $\alpha$ , PGR-PR.

Hs578T, підвищують продукцію різних матричних металопротеїназ (ММП), включаючи ММП-2, -9 та -13, а також значно підвищують рівень простагландину  $E_2$ .

Проте, варто зазначити, що дослідження у системі *in vitro* не забезпечують специфічного для тканини мікросередовища і не відображають величезної кількості біологічних процесів, типів клітин та молекулярних взаємодій, які відбуваються на рівні тканини і організму. Таким чином, отримані нами результати є підставою для продовження вивчення взаємодій між біосумісними ІМ та злоякісно трансформованими клітинами РМЗ та РПЗ людини в системі *in vivo*.

## ВИСНОВКИ

1. При аналізі цитоморфологічних особливостей клітин, що зазнали впливу ІМ, виявлено односпрямований характер змін, що свідчать про підвищення їх адгезивних властивостей. Про це свідчить утворення великих за площею, досить щільно розмішених скупчень клітин із відростками в усіх досліджуваних клітинних лініях.

2. Виявлено, що культивування клітин з ІМ призводить до зниження рівня рецепторів стероїдних гормонів у клітинах ліній РМЗ та РПЗ людини.

3. Культивування клітин з ІМ призводить до зростання показників експресії E- та N-кадгерину, особливо виражене у клітинах обох ліній РПЗ людини.

4. Встановлено, що під дією ІМ у гормоночутливих клітинах РМЗ та РПЗ відбувається підвищення рівня експресії онкогенної мікроРНК-221, а також зниження рівня експресії онкосупресорної мікроРНК-320a у клітинах гормонорезистентних ліній РМЗ та РПЗ.

5. Визначено, що ІМ не впливають на рецепторний статус та показники експресії молекул адгезії у клітинах НФ.

Робота виконана за підтримки проекту «Експериментальна оцінка ефективності застосування та алгоритму тестування біосумісності вітчизняних імплантацийних матеріалів на базі фосфатів кальцію для відновлення функції опорно-рухового апарату при злоякісному процесі» (№ держреєстрації 0117U001729) цільової програми наукових досліджень НАН України «Матеріали для медицини і медичної техніки та технології їх отримання і використання» на 2017–2021 рр.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Lyubimova NV, Kushlinsky NE. Biochemical markers of bone metastasis. *Advances mol oncol* 2015; (1): 61–75 (in Russian).
2. Chen Y-C, Sosnoski DM, Mastro AM. Breast cancer metastasis to the bone: mechanisms of bone loss. *Breast cancer res* 2010; **12**: 215–25.
3. Gartrell BA, Coleman R, Efstathiou E, *et al.* Metastatic prostate cancer and the bone: significance and therapeutic options. *European Urol* 2015; **68** (5): 850–8.
4. Moiseenko VM, Blinov NN. Metastatic bone disease in solid tumors and the possibility of using clodronate (Bonafos) in clinical oncology (literature review). SPb, 1995. 47 c. (in Russian).
5. Bondarenko IM, Aseev OI, Dmitrenko KO. Pre-treatment factors in the prognosis of the effectiveness of hormone therapy for metastatic breast cancer in menopausal ailments. *Topical issues of pharmaceutical and medical science and practice* 2008; **21** (1): 8–14 (in Ukrainian).
6. 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** (6): 394–424.
7. Cancer in Ukraine, 2016–2017. Incidence, mortality, activities of oncological service. *Bulletin of national cancer registry of Ukraine*, № 19, Kyiv, 2018. 131 p.
8. Kampova-Polevaya EB, Chistyakova SS. Clinical mammary: current state of the problem. *GEOTAR-Media*, 2006. 399 p. (in Russian).
9. Aapro SM. Denosumab for bone metastases from breast cancer: a new therapy option? *J clin oncol* 2011; **114**: 1419–20.
10. Moiseenko VM. Palliative treatment of patients with solid tumors with metastatic bone lesions. *Practical oncology* 2001; **1** (5): 33–8.
11. Ashkar S, Weber GF, Panoutsakopoulou V, *et al.* Eta-1(osteopontin): an early component of type-1 (cell-mediated) immunity. *Science* 2000; **287** (5454): 860–4.
12. Denhardt DT, Noda M, O'Regan AW, *et al.* Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival. *J Clin Invest* 2001; **107** (9): 1055–61.
13. Mazzali M, Kipari T, Ophascharoensuk V, *et al.* Osteopontin — a molecule for all seasons. *QJM* 2002; **95** (1): 3–13.
14. Amiraslanov AT, Amiraslanov AA, Ibragimov EE, *et al.* Types of complications in arthroplasty of large joints in patients with bone tumors. *Bulletin of the Russian Oncology Center NN Blokhin RAM* 2009; **20** (1): 17–21 (in Russian).
15. Shevchenko SD. Organ-preserving operations for malignant bone tumors in children. *International medical journal* 2009; (1): 75–9 (in Russian).
16. Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, *et al.* Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* 2005; **121** (3): 335–48.
17. Condeelis J, Pollard JW. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell* 2006; **124** (2): 263–6.
18. Guerrieri AN, Montesi M, Sprio S, *et al.* Innovative options for bone metastasis treatment: an extensive analysis on biomaterials-based strategies for orthopedic surgeons. *Front Bioeng Biotechnol* 2020; **8**: 589964.
19. McClelland RA, Wilson D, Leake R., *et al.* A multicentre study into the reliability of steroid receptor immunocytochemical assay quantification. *European J Cancer Clin Oncol* 1991; **27** (6): 711–15.
20. Fedchenko N, Reifenrath J. Different approaches for interpretation and reporting of immunohistochemistry analysis results in the bone tissue — a review. *Diag pathol* 2014; **9**: 221.
21. Kramer MF. Stem-loop RT-qPCR for miRNAs. *Current protocols in molecular biology* 2011; **95** (1): 15–20.
22. Torres A, Torres K., Wdowiak P, *et al.* Selection and validation of endogenous controls for microRNA expression studies in endometrioid endometrial cancer tissues. *Gynecol oncol* 2013; **130** (3): 588–94.
23. Nicoloso MS, Spizzo R, Shimizu M, *et al.* MicroRNAs—the micro steering wheel of tumour metastases. *Nat Rev Cancer* 2009; **9** (4): 293–302.
24. Heneghan HM, Miller N, Kerin MJ. MiRNAs as biomarkers and therapeutic targets in cancer. *Curr Opin Pharmacol* 2010; **10** (5): 543–550.
25. Journé F, Dumon JC, Kheddoumi N, *et al.* Extracellular calcium downregulates estrogen receptor alpha and increases its transcriptional activity through calcium-sensing receptor in breast cancer cells. *Bone* 2004; **35** (2): 479–88.
26. Gong YUEWEN, Blok LJ, Perry JE, *et al.* Calcium regulation of androgen receptor expression in the human prostate cancer cell line LNCaP. *Endocrinol* 1995; **136** (5): 2172–8.
27. Morgan MP, Cooke MM, Christopherson PA, *et al.* Calcium hydroxyapatite promotes mitogenesis and matrix metalloproteinase expression in human breast cancer cell lines. *Mol Carcinogenesis* 2001; **32** (3): 111–7.

#### EXPERIMENTAL EVALUATION OF INFLUENCE OF IMPLANTATION MATERIALS BASED ON CALCIUM PHOSPHATES ON MOLECULAR-BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF NORMAL AND MALIGNANT TRANSFORMED CELLS OF HORMONE-DEPENDENT TUMORS

N. Yu. Lukyanova, T.V. Zadvorny,  
T.V. Borikun, V.F. Chehun

RE Kavetsky Institute of Experimental Pathology,  
Oncology and Radiobiology, National Academy  
of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

**Summary. Aim:** to study the effect of implant materials (IM) based on calcium phosphates on the molecular biological characteristics of normal and malignant

nantly transformed hormone-dependent cells in the *in vitro* system. **Objects and methods:** cells of normal human fibroblasts, prostate cancer lines (LNCaP and DU-145) and breast cancer (MCF-7, MDA-MB-231) were cultured with IM at a dose corresponding to IC30 (100 µg/ml) during 48 hours. Expression levels of molecular markers were determined by immunocytochemical method. MicroRNA levels were assessed by quantitative PCR. Analysis of functional relationships and interactions between experimental molecules was performed using the STRING v.11.0 algorithm. Statistical analysis of the results was performed using the Statistics 6.0. Software. **Results:** the analysis of cytomorphological features of cells exposed to IM revealed a unidirectional change that indicate an increase in their adhesive properties, as evidenced by the increase in expression of E- and N-cadherin in cells of human breast and prostate cancer cells. It was found that under the action of the tested substance in the cancer cells is an increase in the expression of oncogenic miRNA-221, which reduces the level of steroid hormone receptors. It was determined that IM does not affect the receptor status, the

expression of adhesion molecules and Ki-67 in cells of normal fibroblasts. **Conclusions:** the cultivation of malignantly transformed cells of the human breast cancer and prostate cancer with IM leads to a decrease in their invasive properties due to changes in cytoarchitectonics and adhesive characteristics. The established changes in the posttranscriptional regulation of proteins associated with receptor status in the cells of breast and prostate cancer under the influence of phosphate-based IM require further research.

---

**Key Words:** implant materials, breast cancer, prostate cancer, bone metastasis, receptor status, adhesion, miRNA.

**Адреса для листування:**

Лук'янова Н.Ю.

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

03022, Київ, вул. Васильківська, 45

E-mail: nataluk10@gmail.com

Одержано: 30.11.2020