

С.В. Гоголь

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

Ключові слова: рак передміхурової залози, аргіназа, орнітиндекарбоксилаза, поліаміноксидаза, діагностика, прогноз.

ЕКСПРЕСІЯ БІЛКІВ ФЕРМЕНТІВ ОБМІНУ ПОЛІАМІНІВ У ЗЛОЯКІСНИХ ПУХЛИНАХ ПЕРЕДМІХУРОВОЇ ЗАЛОЗИ ЛЮДИНИ

Ферменти, залучені в обмін поліамінів (ПА), відіграють важливу роль у регуляції процесів росту, диференціювання та запрограмованої загибелі клітин. Проведення дослідження цих ферментів у тканині раку передміхурової залози (РПЗ) є доцільним як для поглиблення знань щодо патогенезу цього захворювання, так і для оцінки можливості застосування показників обміну ПА як додаткових критеріїв для прогнозу перебігу РПЗ. **Мета:** дослідити рівень експресії ферментів обміну ПА (аргінази (Arg I), орнітиндекарбоксилази (ОДК), поліаміноксидази (ПАО)) у клітинах РПЗ залежно від стадії захворювання. **Об'єкт і методи:** досліджено рівні експресії білків Arg I, ОДК та ПАО у 35 зразках (операційний матеріал) РПЗ I–IV стадії із застосуванням біохімічних, імунологічних, молекулярних методів, а також математичної обробки результатів за допомогою комп'ютерної програми TotalLab. **Результати:** виявлено зниження рівнів експресії білків Arg I та ОДК у клітинах РПЗ у міру прогресування захворювання. Найвищі рівні експресії Arg I та ОДК виявлено у зразках РПЗ I стадії, найнижчі (на 34,2 та 50,7% відповідно) — в пухлинах IV стадії. Рівні експресії ПАО у клітинах РПЗ з підвищенням стадії захворювання, навпаки, зростають: у хворих із IV стадією цей показник підвищився на 42,6% порівняно з I стадією. **Висновок:** визначення рівнів експресії білків ферменту обміну ПА в РПЗ може бути запропоновано для уточнення діагностики та прогнозу перебігу РПЗ.

Рак передміхурової залози (РПЗ) — одне із найпоширеніших злоякісних новоутворень у чоловіків віком старше 50 років. У більшості країн Європи та Америки РПЗ посідає перше-друге місця у структурі онкологічної захворюваності чоловічого населення. Темпи приросту захворюваності на РПЗ одні з найвищих серед усіх злоякісних новоутворень [1]. Більшість із існуючих маркерів РПЗ не є високоспецифічними та достатньо надійними. Вважають доцільним розширення їх спектра, оскільки це надасть додаткову інформацію про пухлину та слугуватиме не тільки для прогнозу перебігу захворювання, а й сприятиме індивідуалізації терапевтичних схем, розробці нових режимів персоналізованого лікування. На сьогодні приділяється велика увага вивченню маркерів не лише в крові та сечі, а й нових тканинних маркерів, оскільки відмінності молекулярного профілю злоякісних пухлин мають вирішальне значення. Відомо, що проліферація клітин не може відбуватися за відсутності або навіть браку певної кількості поліамінів (ПА). Але в пухлинах різного гістогенезу процеси синтезу і катаболізму ПА, а також вміст окремих їх фракцій суттєво відрізняються [2].

Щодо тканини передміхурової залози відомо, що орнітиндекарбоксилаза (ОДК) експресується як при доброякісній гіперплазії цього органа, так і в пухлинних клітинах. Надмірна експресія ОДК,

виявлена в субпопуляції епітеліальних клітин простати, спостерігається на ранніх етапах РПЗ і зменшується у міру прогресування пухлини. Водночас надекспресія цього ферменту недостатня для індукції канцерогенезу [3].

Вперше аргіназа (Arg) була виявлена в печінці свавців як термінальний фермент циклу сечовини. В інших тканинах, які позбавлені повного метаболізму сечовини, також виявляється її активність. У цьому разі важливість Arg може полягати, зокрема, у продукції орнітину для синтезу ПА. Є дані, які свідчать, що у тканинах раку шлунка, стравоходу, легені, при різних формах лейкозів активність Arg суттєво вища порівняно з нормальними тканинами [4, 5].

Показано підвищену активність Arg і при РПЗ. Було виявлено, що експресія Arg II більш виражена в андрогензалежних клітинних лініях і менш помітна в андрогеннезалежних клітинних лініях РПЗ. Крім того, показано, що експресія орнітинамінотрансферази (ОАТ) — ферменту, також відповідального за синтез орнітину, обернено корелює з експресією Arg II. Сукупність даних свідчить про зв'язок експресії Arg II, ОАТ і синтезу ПА [6]. Стосовно активності ферменту є відомості, що специфічна активність Arg II вища в карциномах передміхурової залози, ніж при доброякісній гіперплазії останньої [7].

Поліаміноксидаза (ПАО) представляє новий клас катаболічних ферментів в метаболізмі ПА, здатних до їх ефективного окиснення. На сьогодні зростає інтерес до катаболізму ПА, оскільки доведена його роль у визначенні чутливості клітин до різних протипухлинних чинників [8, 9]. Вважають, що катаболічний шлях ПА у ссавців складається із двох ферментів: спермідин/спермін ацетилтрансферази (ССАТ) [10] і ПАО, яка переважно каталізує окиснення N-ацетилполіамінів, утворених ССАТ. Це окиснення призводить до утворення H_2O_2 -ацетамідопропанолу і путресцину або спермідину залежно від вихідного субстрату.

Дослідження показали, що ПАО проявляє велику специфічність до спермідину як субстрату [11]. Ці дані вказують, що оксидаза є додатковим ферментом у катаболізмі ПА і переважно використовує їх як субстрат. ПАО значною мірою індукує протипухлинні аналоги ПА, подібно до ССАТ [12], що свідчить про те, що активність ПАО може відігравати безпосередню роль у загибелі клітин внаслідок утворення токсичного H_2O_2 . Крім того, окиснення ПА нещодавно було охарактеризовано як критичний етап у детоксикації одного з протипухлинних поліамінових аналогів. Пухлинні клітини, які мають низький або незначений рівень здатності до окиснення ПА, значно чутливіші до цитотоксичних ефектів [13].

Мета роботи — дослідити рівень експресії ферментів обміну ПА (Arg I, ОДК, ПАО) у клітинах РПЗ залежно від стадії захворювання.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Проведено дослідження операційного матеріалу 35 хворих на РПЗ I–IV стадії (таблиця), які отримували лікування у відділенні пластичної та реконструктивної онкоурології Національного інституту раку МОЗ України. Діагноз РПЗ був гістологічно верифікований у Національному інституті раку. Жоден із хворих до проведення операції не отримував медикаментозного лікування. Пацієнти були поінформовані щодо мети проведення досліджень і надали згоду на використання свого клінічного матеріалу в наукових цілях.

Таблиця

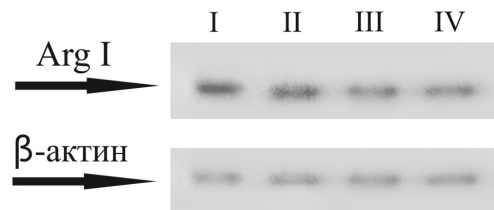
Розподіл хворих за стадіями РПЗ	
Стадія	Кількість хворих
I	7
II	13
III	8
IV	7

Для визначення рівня експресії Arg I, ОДК та ПАО з пухлинної тканини готували екстракти згідно з методом [14]. Концентрацію загального білка в зразках визначали за допомогою методу [15]. Гель-електрофорез білкових препаратів (клітинних екстрактів пухлин), денатурованих за допомогою SDS, проводили за модифікованою методикою [16]. Використано МкАт до Arg I, ОДК та ПАО (Mouse monoclonal IgG «Santa Cruz Biotechnology», США); кон'югати: Polyclonal Goat Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP («Santa Cruz

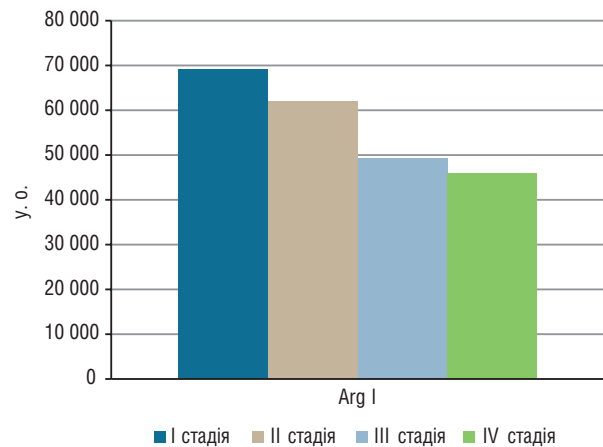
Biotechnology», США). Дані вестерн-блотингу були математично оброблені за допомогою комп'ютерної програми TotalLab.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Найвищі рівні експресії Arg I у клітинах РПЗ спостерігали на початкових стадіях захворювання. Рівень експресії Arg I в пухлинах I і II стадії відрізняється мало (рис. 1): різниця рівнів експресії Arg I становить лише 8,1%. Але надалі, з прогресуванням захворювання, рівень експресії Arg I знижується. Так, у тканині РПЗ III і IV стадії помітно значне зниження цього показника порівняно з I (на 28,8 і 34,2% відповідно) та II стадією (на 20,7 і 26,1% відповідно). Отже, можна припустити, що найвища активність молекулярно-біологічних процесів, регульованих Arg I (тобто метаболізм аргініну), актуальна на початкових етапах пухлинного росту.



а



б

Рис. 1. Рівень експресії Arg I у клітинах РПЗ I–IV стадії. а — дані вестерн-блот аналізу; б — математична візуалізація даних вестерн-блот аналізу

Аналогічні результати отримано при дослідженні рівня експресії ОДК — ключового ферменту синтезу ПА. На рис. 2 представлені дані щодо рівнів експресії ОДК в клітинах РПЗ I–IV стадії. Найвищі рівні експресії ОДК у пухлинних клітинах РПЗ спостерігали також на початкових стадіях (див. рис. 2). За рівнем експресії ОДК різниця між I та II стадіями більша, ніж аналогічна різниця за показниками Arg I (див. рис. 1), розбіжність становить 21,6%. Надалі, з прогресуванням хвороби рівень експресії ОДК знижується ще активніше. Так, у групах РПЗ III і IV стадії зниження рівня експресії ОДК порівняно з I стадією становить на 33,1 і 50,7% відповідно; порівняно з II стадією —

на 10,6 і 28,7% відповідно. Отже, найвища активність процесу синтезу ПА, яка регулюється ОДК, вочевидь, важлива на початкових етапах посилення клітинної проліферації і пухлинного росту.

Ці результати цілком підтверджуються даними літератури. Так, показано, що ОДК надекспресується в пухлинних тканинах, при цьому явище надмірної експресії ОДК, очевидно, відбувається на ранніх етапах канцерогенезу передміхурової залози [3].

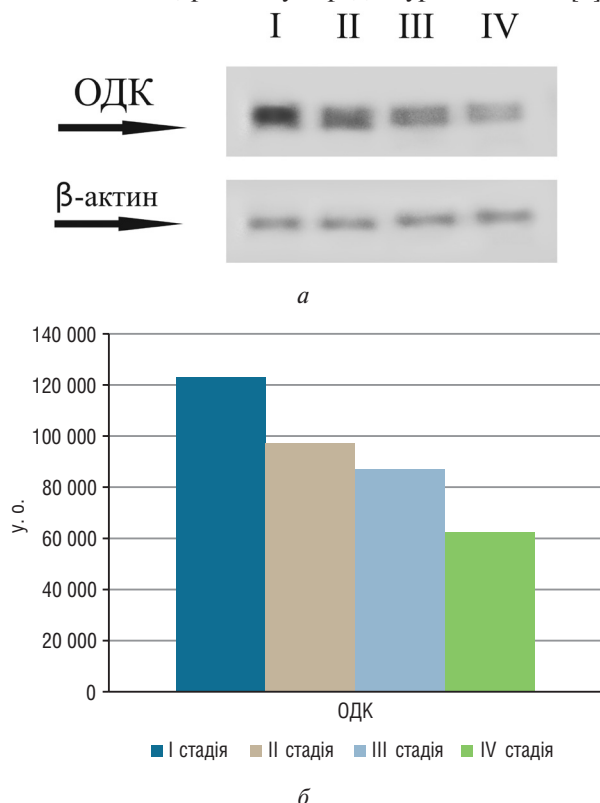


Рис. 2. Рівень експресії ОДК у клітинах РПЗ I–IV стадії. *a* — дані вестерн-блот аналізу; *б* — математична візуалізація даних вестерн-блот аналізу.

Виявлено, що рівень експресії ПАО підвищується у процесі прогресування РПЗ (рис. 3). Найнижчі рівні експресії ПАО спостерігали в пухлинах I стадії. Надалі з прогресуванням хвороби рівень експресії ПАО підвищується. У групах II, III і IV стадії помітне значне підвищення рівня експресії ПАО: порівняно з I стадією рівень експресії ПАО при II стадії зростає на 24,6%, при III стадії — на 33,5%, при IV стадії — на 42,6%. Такі результати узгоджуються з даними публікацій в літературі [17]. Інші автори зазначають, що ПАО може індукувати протипухлинні аналоги ПА [18], і що її активність може відігравати безпосередню роль у загибелі клітин через утворення токсичного H_2O_2 . Існують відомості, що рівень експресії ПАО є нижчим у більшості пухлин (включаючи пухлини передміхурової залози) порівняно з нормальними тканинами [19–21]. Протиріччя у результатах теоретично узгоджуються з даними метааналізу профілів експресії генів у злоякісних пухлинах передміхурової залози [22] та свідчать, що метаболізм ПА є одним із найбільш нерегульованих шляхів у патогенезі РПЗ.

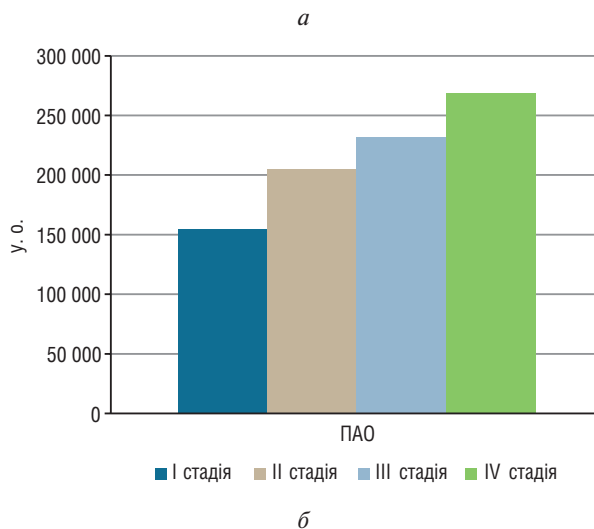
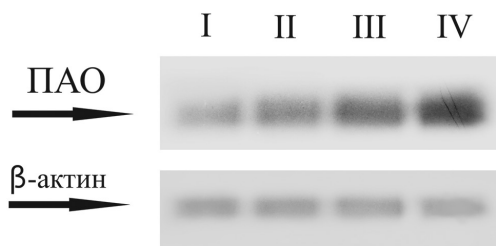


Рис. 3. Рівень експресії ПАО у клітинах РПЗ I–IV стадії. *a* — дані вестерн-блот аналізу; *б* — математична візуалізація даних вестерн-блот аналізу

Зазначимо, що твердження про перспективність ферментів біосинтезу ПА як мішеней для протипухлинної терапії вже встигло зайняти місце в науковій літературі. Існують публікації щодо впливу інгібіторів біосинтезу ПА (здебільшого інгібіторів ОДК) на ріст модельних пухлин та перебіг канцерогенезу [2, 3]. Дані щодо особливостей метаболізму ПА, зокрема активності/експресії ферментів їх обміну (Arg, ОДК, ССАТ, спермінсинтази, ПАО тощо) та рівня окремих фракцій ПА в пухлинах передміхурової залози, могли би стати науковою основою для розроблення нових інгібіторів синтезу ПА як протипухлинних засобів таргетної дії. Окрім цього, дані щодо експресії ферментів обміну ПА в пухлинах можуть бути використані як потенційні маркери для прогнозу перебігу захворювання. Все вищезазначене вказує на перспективність вивчення особливостей обміну ПА в пухлинах передміхурової залози людини.

ВИСНОВКИ

1. Найвищі рівні експресії Arg I і ОДК виявлено на початкових стадіях РПЗ, найнижчі рівні (на 34,2 і 50,7% відповідно) — у пухлинах IV стадії. Очевидно, при кінцевих стадіях захворювання синтез ПА (в якому беруть безпосередню участь Arg I і ОДК) значно гальмується.

2. Виявлено зростання рівня експресії ПАО у клітинах РПЗ у процесі прогресування хвороби: найвищий (на 42,6%) рівень експресії ПАО виявлено у пухлинах IV стадії. Очевидно, посилена експресія ПАО виснажує пул ПА у клітинах РПЗ на пізніх стадіях.

3. Визначення рівнів експресії білків ферментів обміну ПА в РПЗ може бути запропоновано для уточнення діагностики та прогнозу перебігу РПЗ.

ПОДЯКА

Висловлюємо щирі подяки лікарям відділення пластичної та реконструктивної онкоурології Національного інституту раку МОЗ України і особисто — кандидату медичних наук, лікарю-урологу вищої категорії Ю.В. Вітруку.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Ferlay J, Autier P, Boniol M. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2010. *Ann Oncol* 2011; **18**: 581–92.
2. Soda K. The mechanisms by which polyamines accelerate tumor spread. *J Exp Clin Cancer Res* 2011; **30** (1): 95.
3. 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.
4. Akram J, Mahmoud A, Hamid-Reza R. Rhodanese and arginase activity in normal and cancerous tissues of human breast, esophagus, stomach and lung. *Arch Iran Med* 2001; **4**: 88–92.
5. Gogol SV, Yanish YuV, Zaletok SP, Ivanivska TS. Arginase activity and expression in the peripheral blood cells of patients with the different forms of leukemia. *Oncology* 2018; **20**, 4 (78): 265–8 (in Ukrainian).
6. Mumenthaler SM, Yu H, Tze S, et al. Expression of arginase II in prostate cancer. *Int J Oncol* 2008; **32** (2): 357–65.
7. Harris BE, Pretlow TP, Bradley EL, et al. Arginase activity in prostatic tissue of patients with benign prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma. *Cancer Res* 1983; **43** (6): 3008–12.
8. Bergeron RJ, Feng Y, Weimar WR, et al. A comparison of structure-activity relationships between spermidine and spermine analogue antineoplastics. *J Med Chem* 1997; **40**: 1475–94.
9. Casero JrRA, Woster PM. Terminally alkylated polyamine analogues as chemotherapeutic agents. *J Med Chem* 2001; **44**: 1–26.
10. Casero JrRA, Pegg AE. Spermidine/spermine N1 acetyltransferase — the turning point in polyamine metabolism. *FASEB J* 1993; **7**: 653–61.
11. Vujcic S, Diegelman P, Bacchi CJ, et al. Identification and characterization of a novel avin-containing spermine oxidase of mammalian cell origin. *Biochem J* 2002; **367**: 665–75.
12. Wang Y, Devereux W, Woster PM, et al. Cloning and characterization of a human polyamine oxidase that is inducible by polyamine analogue exposure. *Cancer Res* 2001; **61**: 5370–3.
13. Lawson KR, Marek S, Linehan JA, et al. Detoxification of the polyamine analogue N1-ethyl-N11-(cycloheptyl)methyl-4,8-diazaundecane (CHENSpm) by polyamine oxidase. *Clin Cancer Res* 2002; **8**: 1241–7.
14. Sovak M, Bellas R, Kim D, et al. Aberrant nuclear factor-κB/Rel expression and pathogenesis of breast cancer. *J Clin Invest* 1997; **100**: 2952–60.
15. 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.
16. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; **227**: 680–5.
17. Ha HC, Woster PM, Yager JD, Casero JrRA. The role of polyamine catabolism in polyamine analogue-induced programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 11557–62.
18. Wang Y, Devereux W, Woster PM, et al. Cloning and characterization of a human polyamine oxidase that is inducible by polyamine analogue exposure. *Cancer Res* 2001; **61**: 5370–3.
19. Wallace HM, Duthie J, Evans DM, et al. Alterations in polyamine catabolic enzymes in human breast cancer tissue. *Clin Cancer Res* 2000; **6**: 3657–61.

20. Quash G, Keouloungkhot T, Gazzolo L, et al. Diamine oxidase and polyamine oxidase activities in normal and transformed cells. *Biochem J* 1979; **177**: 275–82.

21. Takenoshita S, Matsuzaki S, Nakano G, et al. Selective elevation of the N1-acetylspermidine level in human colorectal adenocarcinomas. *Cancer Res* 1984; **44**: 845–7.

22. Rhodes DR, Barrette TR, Rubin MA, et al. Metaanalysis of microarrays: interstudy validation of gene expression profiles reveals pathway dysregulation in prostate cancer. *Cancer Res* 2002; **62**: 4427–33.

EXPRESSION OF PROTEINS OF POLYAMINE METABOLISM FERMENTS IN HUMAN PROSTATE MALIGNANT TUMORS

S.V. Gogol

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

Summary. *Enzymes involved in polyamine exchange (PA) play an important role in regulating the growth, differentiation, and programmed cell death processes. The study of these enzymes in prostate cancer (PC) tissue is appropriate both for deepening knowledge about the pathogenesis of the disease and for evaluating the possibility of using PA metabolism as additional criteria for predicting the course of PC. Objective:* to study the expression level of PA metabolites (arginase (Arg I), ornithine decarboxylase (ODC), polyamine oxidase (PAO)) in PC cells depending on the stage of the disease. **Object and methods:** the expression levels of Arg I, ODC, and PAO proteins in 35 samples (operational material) of PC stage I–IV were investigated using biochemical, immunological, molecular methods, as well as mathematical processing of results using a TotalLab computer program. **Results:** reduced levels of expression of Arg I and ODC proteins in PC cells as disease progressed. The highest levels of Arg I and ODC expression were detected in samples of PC stage I, the lowest (by 34.2 and 50.7%, respectively) in stage IV tumors. On the contrary, PAO expression levels in PC cells with increasing stage of the disease are increasing: in patients with stage IV, this indicator increased by 42.6% compared with stage I. **Conclusion:** determination of expression levels of proteins of polyamine metabolism enzymes in PC can be proposed as additional criteria for specifying the diagnosis and prognosis of PC.

Key words: prostate cancer, arginase, ornithine-decarboxylase, polyaminooxidase, diagnosis, prognosis.

Адреса для листування:

Гоголь С.В.
03022, Київ, вул. Васильківська, 45
Інститут експериментальної патології,
онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького
НАН України
E-mail: tantattoo72@gmail.com

Одержано 29.11.2019