

Н.Ю. Лук'янова  
Т.В. Борікун  
Д.В. Демаш  
І.М. Тодор  
Т.В. Задворний  
Д.М. Сторчай  
Т.М. Яловенко  
А.О. Павлова  
Ю.В. Лозовська  
Л.А. Налескіна  
Л.М. Кунська  
В.Ф. Чехун

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

**Ключові слова:** залізо, мікроРНК, метилування, карцинома Герена, резистентність, динаміка росту.

## ЗМІНИ СПЕКТРА МЕТАЛОВМІСНИХ ПРОТЕЇНІВ ТА ФАКТОРІВ ЇХ ЕПІГЕНЕТИЧНОЇ РЕГУЛЯЦІЇ В ДИНАМІЦІ РОСТУ ЧУТЛИВОЇ ТА РЕЗИСТЕНТНОЇ КАРЦИНОМИ ГЕРЕНА

**Мета:** проаналізувати зміни спектра металовмісних протеїнів та окремих факторів їх епігенетичної регуляції у сироватці крові (СК) та пухлинній тканині (ПТ) тварин у динаміці росту чутливої та резистентної карциноми Герена (КГ). **Об'єкт і методи:** дослідження проведено на щурах із вихідною та резистентною до доксорубіцину та цисплатину КГ. У ПТ та СК за допомогою імуноферментного аналізу та низькотемпературного електронного парамагнітного резонансу визначали рівні феритину, трансферину, церулоплазміну та комплексів вільного заліза. За допомогою методу полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі оцінювали ступінь метилування генів *fth1* та *tfr1*, а також рівні експресії мікроРНК-122, -133a, -200b та -320a. **Результати:** показано, що у динаміці росту КГ відбуваються суттєві зміни показників обміну та епігенетичної регуляції металовмісних білків як у ПТ, так і у СК. Визначено низку відмінностей, які характерні для чутливих та резистентних до доксорубіцину та цисплатину пухлин, а також для різних стадій їх росту. **Висновки:** отримано дані, які свідчать про важливу роль металовмісних білків та їх регуляції у процесі росту пухлин та розвитку резистентності до протипухлинних препаратів. Ці результати можуть бути використані для покращення диференційної діагностики новоутворень та оцінки чутливості пухлин до цитостатиків.

### ВСТУП

На сьогодні, незважаючи на численні різнопланові дослідження молекулярних механізмів, які лежать в основі пухлинного процесу, лишаються нерозв'язаними багато проблем експериментальної та клінічної онкології. Відомо, що пухлину можна розглядати як облігатного паразита, який не може існувати окремо від організму господаря. У процесі співіснування пухлини взаємодіють із прилеглими тканинами та організмом в цілому, і детальне розуміння цих процесів може розкрити нові можливі механізми лікування хворих на рак [1].

Обмін ендогенного заліза — це один із метаболічних шляхів, суттєві зміни у якому визначаються як у пухлині, так і у організмі. Залізо є важливим кофактором, який бере участь у перенесенні кисню, перебігу окисно-відновних реакцій, синтезі аденозинтрифосфату, транскрипції, трансляції тощо. Пухлинні клітини (ПК) характеризуються підвищеними потребами у цьому мікроелементі, оскільки він необхідний для процесів їх росту та активної проліферації. Наслідком цього часто є виснаження запасів заліза у організмі, розвиток анемії та інших патологічних станів [2].

Якщо детальніше розглядати процеси обміну заліза, то можна виділити такі основні його ланки: надхо-

дження у клітину (наприклад, за участю трансферину (Тф) та його рецепторів), депонування (феритин (Фр)) та виведення з клітини (гепсидин (Гп) та феропортин (Фп)) [3]. Більшість із цих білків також визначаються у сироватці крові (СК), що дозволяє простежити зміни їх співвідношення на різних стадіях пухлинного росту та залежно від фенотипових особливостей пухлин. З одного боку, це може надати краще розуміння змін, які лежать в основі тих чи інших проявів пухлинного процесу, а з іншого — вказати на додаткові мішені, які дозволять покращити якість протипухлинної терапії.

Зважаючи на те, що різні стадії пухлинного процесу характеризуються різною швидкістю росту, потреби пухлин у залізі з її ростом змінюються нерівномірно. Відповідно, можна на рівні пухлини і організму визначити параметри, пов'язані з обміном цього мікроелемента, характерні для латентної, експоненційної та термінальної фази пухлинного росту [4]. Ці дані дозволять поглибити наші знання про особливості пухлинного росту на різних його етапах, а також визначити нові маркери для кращої диференційної діагностики пухлин.

Враховуючи зазначене, метою роботи було проаналізувати зміни спектра металовмісних протеїнів та окремих факторів їх епігенетичної регуляції у СК та пухлинній тканині (ПТ) тварин в динаміці росту чутливої та резистентної карциноми Герена (КГ).

## ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

**Тварини та експериментальна модель.** Дослідження виконано на 80 щурах-самцях з вихідною (Герен/S) і резистентною до цисплатину (Герен/СР) та доксорубіцину (Герен/Дох) КГ. Пухлини перещеплювали підшкірно із розрахунку  $2 \cdot 10^6$  клітин на тварину [5]. Штами пухлин було отримано з Клітинного банку ліній з тканин людини і тварин Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р.Є. Кавецького Національної академії наук України. Для визначення змін показників, які характеризують метаболізм ендогенного заліза на рівні пухлини та організму тварин, досліджували зразки ПК та СК на різних стадіях росту КГ. Відбір зразків СК та ПТ здійснювали на 7-му (латентна фаза), 14-ту (експоненційна фаза) та 20-ту добу (термінальна фаза) після перещеплення пухлини.

**Імуноферментний аналіз.** Визначення рівня Фр та Тф у СК та ПТ досліджених тварин здійснювали за допомогою автоматичного біохімічного та імуноферментного аналізатора Chem Well 2900 (США) із застосуванням відповідного набору реактивів (Uscer, Китай). Зразки СК для імуноферментного аналізу отримували відповідно до рекомендацій, зазначених в інструкціях до наборів, гомогенат ПТ готували в PBS у співвідношенні 1:3. Усі зразки зберігали при температурі  $-20^\circ\text{C}$ .

**Метод низькотемпературного електронного парамагнітного резонансу (ЕПР).** Вміст Тф, церулоплазміну (Цп) та комплексів вільного заліза (ВЗ) визначали у зразках СК та ПК за допомогою методу ЕПР на комп'ютеризованому спектрометрі Р-1307 (Росія) за температури 77 К. Для цього зразки цільної крові або ПК заморожували у спеціальних прес-формах і зберігали у рідкому азоті. Дослідження проводили за таких параметрів: ширина смуги 1525 Гс; частота 9,15 ГГц; потужність мікрохвиль 40 мВт; амплітудна модуляція 10,0 Гс; частота модуляції 100 кГц. Значення  $g$  було розраховане з використанням стандартної формули:

$$g = hv/\beta H,$$

де  $h$  — стала Планка;  $v$  — частота;  $\beta$  — магнетон Бора;  $H$  — зовнішнє магнітне поле в резонансі [6].  $g$ -Фактор для Тф становив 4,25; для Цп — 2,05, а для комплексів ВЗ — 2,2. Рівень активних форм Тф, Цп та комплексів ВЗ визначали за інтенсивністю спектрів ЕПР порівняно з відповідними стандартами.

**Метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) для визначення експресії мікроРНК.** Виділення тотальної РНК з клітин проводили за допомогою комерційного набору Рибо-золь (Амплісенс, Росія). Кількість виділеної РНК визначали на спектрофотометрі NanoDrop 2000c Spectrophotometer (ThermoScientific, США). Чистоту контролювали на спектрофотометрі, використовуючи співвідношення величин оптичного поглинання при довжині хвиль 260 та 280 нм. РНК розчиняли у буфері Tris-EDTA та зберігали при  $-20^\circ\text{C}$  до проведення ПЛР. Одноланцюгову кДНК синтезували з 100 нг загальної РНК з використанням набору TaqMan для зворотної транскрипції.

Для проведення ПЛР зі зворотною транскриптазою використовували спеціальну реакційну суміш, склад якої визначено виробником. Як ендогенний контроль використовували малу ядерцеву РНК RNU48. Відносна експресія досліджуваних мікроРНК була визначена порівняльним СТ методом. Дослід проведений у трьох повторях для кожного зразка [7].

**Статистичний аналіз** проводили з використанням програмного забезпечення STATISTICA 7.0 (StatSoft Inc.). Для оцінки значущості відмінностей між групами використовувався  $t$ -критерій Стьюдента. Значущими вважались відмінності, для яких  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Дослідження були спрямовані на оцінку змін рівнів низки прогностичних маркерів, які виникають у ПТ, а також у СК щурів на різних етапах росту КГ з різним ступенем чутливості до цисплатину та доксорубіцину. Порушення обміну ендогенного заліза у організмі тварин з пухлиною оцінювали за змінами рівнів металовмісних білків (Фр, Тф, Цп), оскільки від цього залежать такі характеристики ПК, як проліферативна та інвазивна активність, чутливість до цитостатиків. Для оцінки відповідних змін у ПТ нами було проведено дослідження трьох основних ланок обміну заліза — надходження (Тф, рецептор Тф), депонування (Фр) та виведення (Гп).

Залізовмісний білок Фр може зв'язувати велику кількість (до 4000) атомів заліза і у ПК виконує депонуючу функцію, зменшуючи кількість токсичного ВЗ, яке є джерелом утворення вільних радикалів і оксидативного пошкодження органел клітин. В організмі Фр є одним з найпоширеніших переносників заліза і медіатором при перенесенні заліза до Тф [8].

У наших дослідженнях ми спостерігали різке зниження вмісту Фр у СК на усіх стадіях пухлинного росту порівняно з показниками інтактних тварин ( $78,0 \pm 0,2$  нг/мл) (рис. 1). Максимальне зниження показників Фр у СК відзначено у термінальній фазі ( $12,1 \pm 0,4$ ... $13,1 \pm 0,3$  нг/мл), що свідчить про виснаження запасів заліза в організмі тварин, викликаних пухлинним ростом, а також про розвиток анемічних процесів. Слід зазначити, що ми не виявили достовірних відмінностей між показниками вмісту Фр у СК щурів із вихідним та резистентними до Герен/СР та Герен/Дох штамами КГ.

При вивченні змін вмісту Фр у ПТ КГ ми виявили достовірне підвищення вмісту цього білка у всіх досліджених штамах порівняно з показниками не-трансформованих тканин щурів ( $599 \pm 72$  мкг/г тканини) (рис. 1, б). Отримані дані узгоджуються з наведеними вище результатами визначення цього білка у СК експериментальних тварин і свідчать про виснаження запасів заліза не лише у організмі, а й у пухлині, оскільки воно необхідне для активного росту та проліферації ПК.

При порівняльному аналізі рівнів Фр у ПТ різних штамів КГ у різних фазах росту ми відзначали відмінний характер змін вмісту цього білка. Так, у тка-

нини штаму Герен/СР вміст Фр достовірно підвищувався в експоненційній фазі порівняно з латентною, а у ПК штаму Герен/Дох його вміст був найвищим протягом всього періоду росту пухлин. У Герен/С рівень Фр зростав лише у термінальній фазі росту пухлин. На всіх стадіях пухлинного росту найнижчі рівні Фр були у тканині вихідного штаму КГ, а найвищі — у Герен/Дох.

Оскільки відомо, що важливе місце у регуляції експресії Фр посідають епігенетичні механізми, нами проведено оцінку змін ступеня метилювання промоторних ділянок гена *fth1* (кодує важкі ланцюги Фр) [9] (рис. 2). Показано, що найвищий рівень метилювання CpG-острівців відзначають у клітинах вихідного штаму КГ, що відповідало найнижчим показникам його експресії з-поміж трьох досліджених штамів. Показники метилювання промоторів цього гена у клітинах резистентних штамів достовірно не відрізнялися на кожній зі стадій пухлинного росту і були нижчими за відповідні значення клітин штаму Герен/С.

Іншим важливим епігенетичним регулятором експресії Фр є мікроРНК [10]. Відомо, що мікроРНК-133а інгібує експресію легких ланцюгів Фр, а мікроРНК-200b — важких. Крім того, в літературі знаходимо повідомлення, що мікроРНК-200b підвищує чутливість ПК до цисплатину [11]. Відповідно, наступним етапом наших досліджень було визначення змін експресії зазначених мікроРНК у ПТ КГ залежно від фази росту до протипухлинних препаратів, а також від фази росту.

Нами встановлено (рис. 3), що у ПК усіх досліджених штамів знижується експресія обох мікроРНК в експоненційній та термінальній фазах росту порівняно з латентною. Це також вказує на підвищення експресії як важких, так і легких ланцюгів Фр у ПТ для збільшення кількості доступного заліза шляхом його депонування.

Залізо є основним елементом, що забезпечує клітинну проліферацію. Як відомо, у ПК відбувається значне підвищення рівня заліза для забезпечення їх посиленних метаболічних та проліферативних потреб. З іншого боку, вміст ВЗ у ПК може знижуватися внаслідок його виснаження, що також свідчить про підвищену потребу у цьому елементі у клітинах, які швидко ростуть і діляться [12]. Одним з основних показників, який характеризує обмін заліза у ПК, є кількість комплексів ВЗ. Зазвичай зміни цього показника корелюють із вмістом Фр, оскільки однією з основних функцій Фр є зв'язування та депонування реакційно здатних іонів заліза. Зростання кількості комплексів ВЗ у клітинах може, з одного боку, свідчити про підвищені потреби клітин у цьому мікроелементі (проліферація, активні процеси окиснення, потреби клітин у енергії тощо), а з іншого — призводити до утворення вільних радикалів у реакціях Фентона та Габера — Вайса та до розвитку оксидативних уражень [13]. У ході наших досліджень ми відмічали достовірно зростання вмісту комплексів ВЗ у ПК усіх трьох досліджених штамів КГ в експоненційній та термінальній фазах росту (рис. 4). Отримані дані

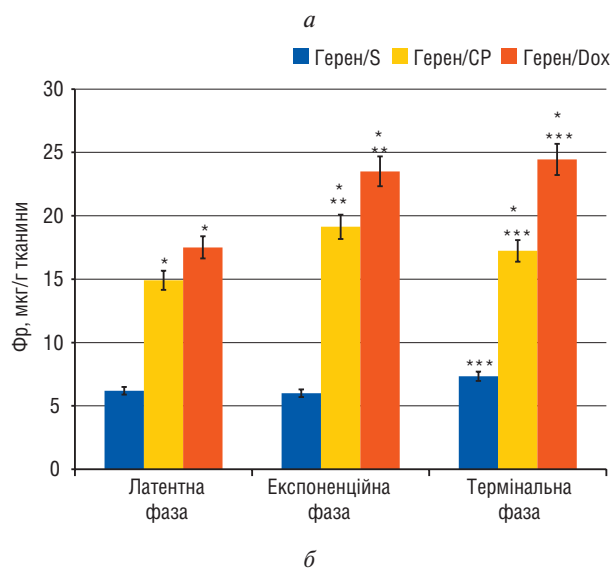
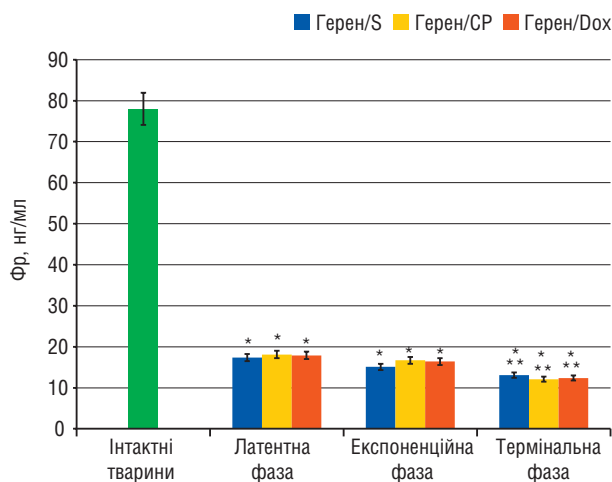


Рис. 1. Зміни вмісту Фр у СК (а) та ПТ (б) тварин із чутливою (вихідною) та резистентною до дії цитостатиків КГ на різних фазах росту.

\* $p < 0,05$  порівняно з інтактними тваринами; \*\* $p < 0,05$  порівняно з латентною фазою; \*\*\* $p < 0,05$  порівняно з латентною та експоненційною фазами

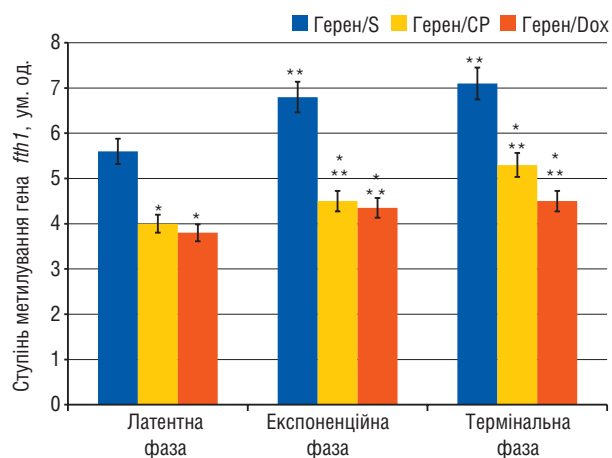
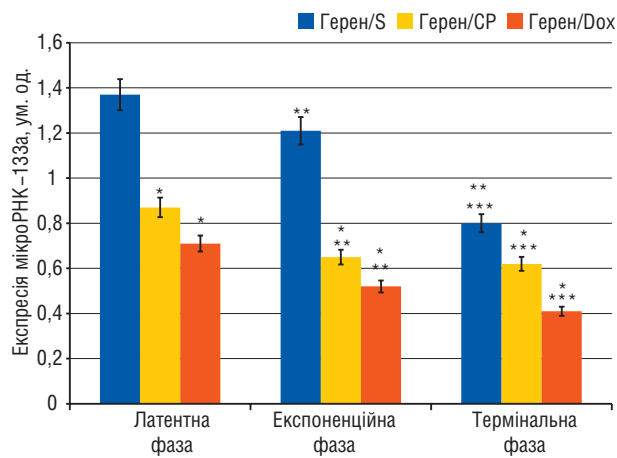


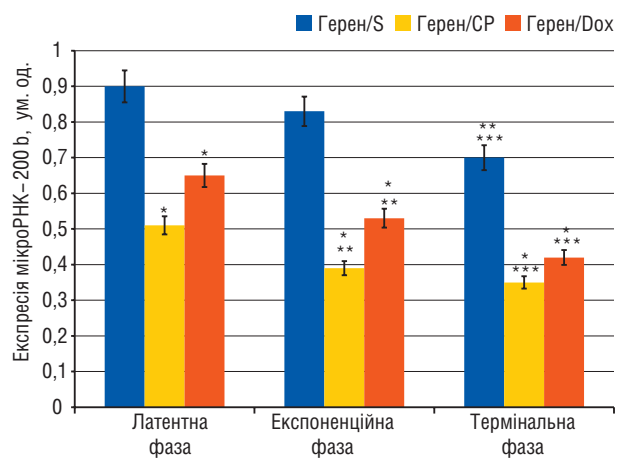
Рис. 2. Зміни рівня метилювання промотора гена *fth1* у клітинах вихідного та резистентних до цисплатину та доксорубіцину штамів КГ.

\* $p < 0,05$  порівняно з вихідним штамом; \*\* $p < 0,05$  порівняно з латентною фазою





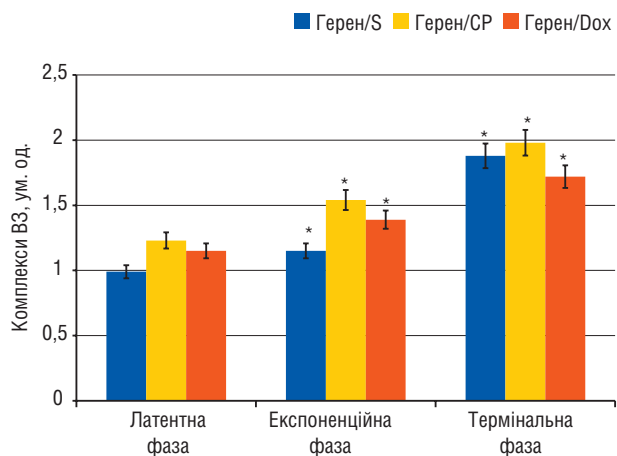
а



б

**Рис. 3.** Зміни рівня експресії мікроРНК-133а (а) та -200б (б) у клітинах вихідного та резистентних штамів КГ.

\* $p < 0,05$  порівняно з вихідним штамом; \*\* $p < 0,05$  порівняно з латентною фазою; \*\*\* $p < 0,05$  порівняно з латентною та експоненційною фазами



**Рис. 4.** Зміни кількості комплексів В3 у ПТ КГ (ум. од.). \* $p < 0,05$  порівняно з латентною фазою

узгоджуються з наведеними вище результатами щодо вмісту Фр у ПК КГ і свідчать про виснаження запасів цього мікроелемента у ПК.

Окрім синтезу ДНК, В3 бере участь у процесах транскрипції РНК, тому потреба у залізі залежить від активності цих процесів. Високі рівні за-

ліза в ПК впливають не лише на генетичний апарат, а й на епігенетичну регуляцію, зокрема синтез мікроРНК. Усі мікроРНК у процесі дозрівання проходять одні й ті самі стадії, і ключовим у цьому процесі є гемз'язуючий білок DGCR8 [14].

На поверхні клітини комплекс Тф — залізо зв'язується з рецепторами Тф (TfR1, 2) та потрапляє у клітину за допомогою ендцитозу. Divalent metal transporter 1 (DMT1) вивільняє залізо в цитоплазму, де зберігається пул В3. При життєдіяльності клітини В3 зв'язується з Фр або використовується мітохондріями для синтезу гему і біогенезу Fe-S кластера. Гем має вирішальне значення для дозрівання первинних транскриптів мікроРНК (PRI-мікроРНК), він зв'язується з мікропроцесорним комплексом, що складається з DGCR8 і Drosha. Попередники мікроРНК (pre-miRNA) експортуються з ядра в цитоплазму, де, залежно від рівня заліза, відбувається димеризація полі-С-зв'язуючого білка РСВР2. РСВР2 зв'язується з DICER і забезпечує формування зрілої мікроРНК. Підвищення рівня В3 у клітині призводить до мономеризації РСВР2 і переходу його в неактивну форму, що знижує загальний рівень функціональних мікроРНК в клітині [15].

Іншим загальноприйнятим показником, який характеризує обмін заліза у організмі, є рівень Тф у СК. Основною функцією Тф є перенесення тривалентного заліза з кров'ю і надходження його до клітин за рахунок зв'язування з відповідними рецепторами [16]. У нашому дослідженні ми відзначали різке зниження рівнів Тф у СК тварин з пухлинами усіх досліджених штамів порівняно з показниками інтактних щурів (рис. 5). Найвищі рівні Тф у СК спостерігали у латентній фазі. Найнижчі — у термінальній.

Найбільш виражене зниження рівнів Тф було характерне для тварин з вихідною КГ, тоді як рівень цього білка у СК із резистентними пухлинами не відрізнявся на кожній зі стадій пухлинного росту.

Як зазначено вище, для надходження іонів заліза у клітину необхідно, щоб на її поверхні експресувалися відповідні рецептори, зокрема — рецептор Тф 1-го типу (TfR1). Зміни експресії цього рецептора тісно пов'язані з потребами клітини в іонах заліза, зокрема, експресія цього білка стимулюється низьким вмістом В3 у клітині [17]. При достатній кількості заліза в клітині воно ковалентно зв'язується із залізорегуляторним білком 1 (iron regulatory protein 1, IRP1) та залізов'язуючими ділянками мікроРНК (IRE) в 5'-UTR мікроРНК Tfr. При нестачі заліза утворюється комплекс IRP1-IRE, який призводить до трансляції TfR1 [18]. Це забезпечує своєчасну реакцію на зміну концентрації заліза в клітині. Епігенетичні механізми є основним чинником, який впливає на рівень мікроРНК TfR1, доступної для трансляції білка. До них відносять рівні метилування промоторних ділянок гена *tfr1* та мікроРНК-320a [19]. У результаті проведених досліджень показано, що процес росту експериментальних пухлин супроводжувався підвищенням рівня метилування промотора гена *tfr1* на всіх

досліджених моделях пухлинного росту (рис. 6), починаючи з латентної фази росту. Найнижчий ступінь метилування промоторних ділянок гена *tfr1* фіксували у пухлинах штаму Герен/S, а найвищий — у пухлинах Герен/СР.

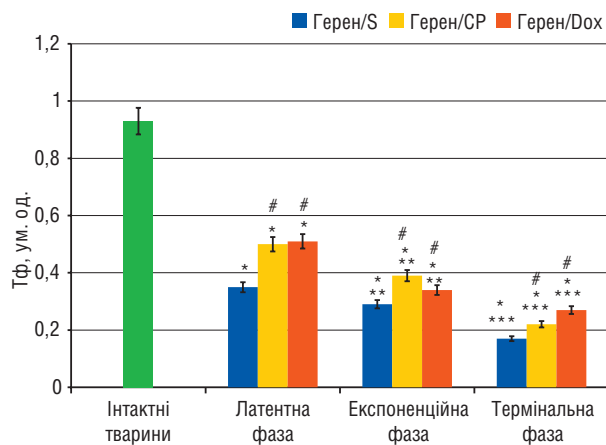
Відомо, що Tfr1 є прямою мішенню мікроРНК-320а. Зниження рівня експресії мікроРНК-320а спричиняє підвищення рівня Tfr1 і його експозицію на поверхні трансформованих клітин [20]. Окрім того, під її регуляторним контролем перебуває кілька інших білків — transient receptor potential channel C5 (TRPC5) та nuclear factor of activated T-cells isoform c3 (NFATC3), відповідальних за розвиток резистентності до доксорубіцину [21]. Як свідчать дані рис. 7, найбільш суттєві відмінності експресії цієї мікроРНК характерні для резистентного до доксорубіцину штаму КГ. Крім того, протягом росту пухлин відзначали зниження рівнів мікроРНК-320а в усіх досліджуваних пухлинах. Оскільки відомо, що ця мікроРНК є онкосупресорною, а її мішенями, окрім Tfr1, є також  $\beta$ -катенін, цикліни та інтегрини, це робить її перспективним маркером перебігу пухлинного процесу [22].

Відомо, що ще однією із важливих складових обміну заліза в клітинах є Гп — гормон, який регулює виведення заліза з клітин за участю Фп. Фп здатен виводити з клітин іони дивалентного заліза у випадку його надлишку в клітині, а також є необхідним для забезпечення достатнього ступеня насичення Тф залізом у крові [19]. Пп блокує роботу транспортера шляхом зв'язування і перенесення Фп із клітинної поверхні в цитоплазму. Одним із важливих регуляторів експресії цього гормону на системному рівні є мікроРНК-122. У нормі мікроРНК-122 синтезується в основному в печінці, забезпечуючи нормальний гомеостаз заліза. При розвитку пухлини внаслідок метаболічних порушень (перерозподіл заліза в організмі, порушення гормональної регуляції, гіпоксія) відбуваються порушення рівнів цієї мікроРНК як в ПТ, так і в СК [23].

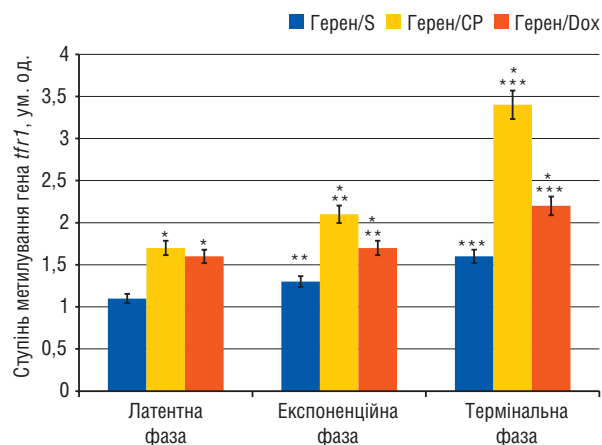
Як видно із рис. 8, у динаміці росту КГ спостерігали зниження рівнів мікроРНК-122 у термінальній фазі росту. Оскільки відомо, що мікроРНК-122 також бере участь у відповіді на гіпоксію та репрограмування метаболізму глюкози в ПК [24], різнонаправлені зміни експресії цієї мікроРНК у пухлинах із різною чутливістю до цитостатиків в експоненційній фазі росту свідчать про її зв'язок з розвитком резистентності та особливостями метаболізму резистентних клітин.

Виявлено значні різнонаправлені зміни рівнів мікроРНК-122 у СК тварин з пухлиною в експоненційній та термінальній фазах росту КГ (рис. 9). Ці зміни можуть бути пов'язані з розвитком пухлинного процесу та опосередковані васкуляризацією пухлин. Порушення балансу мікроРНК-122 у СК є одним із механізмів, за участю яких пухлина змушує організм забезпечувати її потреби, зокрема, у глюкозі [24].

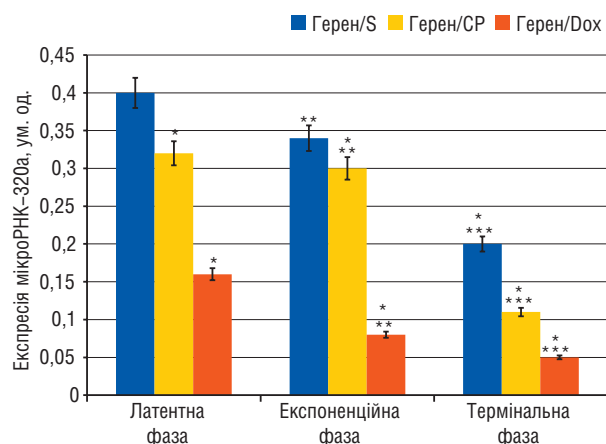
Метаболізм металовмісних протеїнів тісно пов'язаний із мультифункціональним протеїном СК — Цп. Відомо, що цей протеїн, виконуючи антиоксидантну функцію, сприяє перетворенню  $Fe^{2+}$  у  $Fe^{3+}$  з наступ-



**Рис. 5.** Зміни рівня Тф у СК тварин із чутливою та резистентною до дії цитостатиків КГ на різних фазах росту. \* $p < 0,05$  порівняно з інтактними тваринами; \*\* $p < 0,05$  порівняно з латентною фазою; \*\*\* $p < 0,05$  порівняно з латентною та експоненційною фазами; # $p < 0,05$  порівняно з вихідним штамом КГ

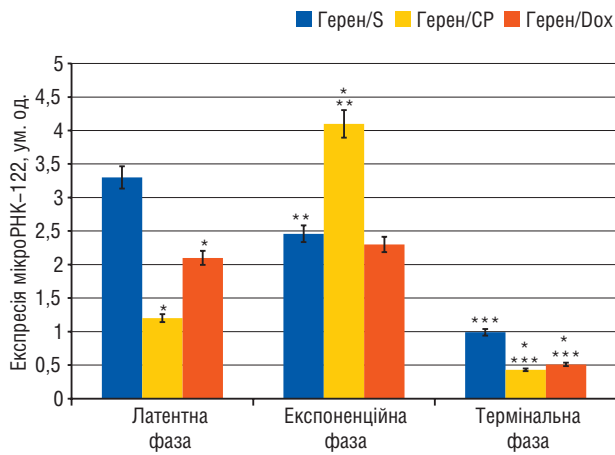


**Рис. 6.** Рівень метилування промотора рецептора Тф 1 (TfR1) (ум. од.) у ПК тварин із чутливою та резистентною до дії цитостатиків КГ на різних фазах пухлинного росту. \* $p < 0,05$  порівняно з вихідним штамом КГ; \*\* $p < 0,05$  порівняно з латентною фазою; \*\*\* $p < 0,05$  порівняно з латентною та експоненційною фазами.



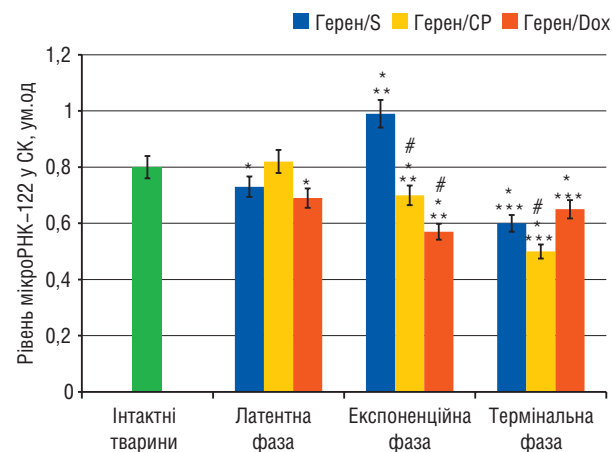
**Рис. 7.** Зміни експресії мікроРНК-320а у ПТ тварин із чутливою та резистентною до дії цитостатиків КГ у різних фазах росту.

\* $p < 0,05$  порівняно з вихідним штамом КГ; \*\* $p < 0,05$  порівняно з латентною фазою; \*\*\* $p < 0,05$  порівняно з латентною та експоненційною фазами



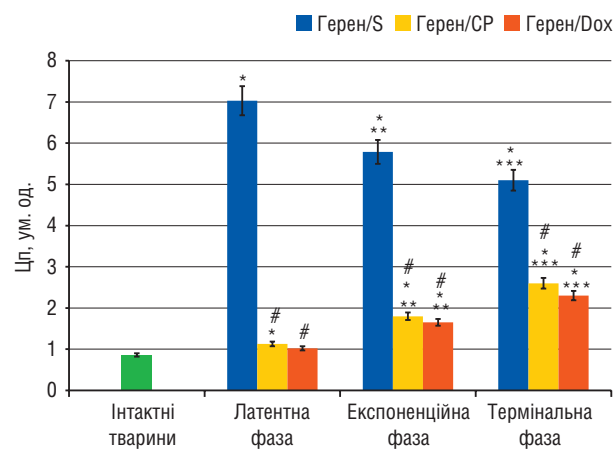
**Рис. 8.** Особливості експресії мікроРНК-122 у ПТ тварин із КГ.

\* $p < 0,05$  порівняно з вихідним штамом КГ; \*\* $p < 0,05$  порівняно з латентною фазою; \*\*\* $p < 0,05$  порівняно з латентною та експоненційною фазами



**Рис. 9.** Рівні мікроРНК-122 у СК тварин з КГ.

\* $p < 0,05$  порівняно з інтактними тваринами; \*\* $p < 0,05$  порівняно з латентною фазою; \*\*\* $p < 0,05$  порівняно з латентною та експоненційною фазами; # $p < 0,05$  порівняно з вихідним штамом КГ



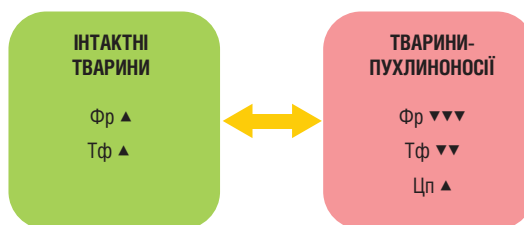
**Рис. 10.** Зміни активності Цп у СК тварин із чутливою та резистентною до дії цитостатиків КГ.

\* $p < 0,05$  порівняно з інтактними тваринами; \*\* $p < 0,05$  порівняно з латентною фазою; \*\*\* $p < 0,05$  порівняно з латентною та експоненційною фазами; # $p < 0,05$  порівняно з вихідним штамом КГ

ним його включенням в апотрансферин [4]. Нашими дослідженнями встановлено, що у всіх тварин з перещепленою КГ відмічали різке зростання активності Цп у СК порівняно з інтактними незалежно від чутливості пухлин до цитостатиків та фази пухлинного росту (рис. 10). Це узгоджується з результатами інших дослідників, які вказували на підвищену активність Цп як на маркер запальних процесів в організмі. Найвищу активність цього білка ми реєстрували у щурів, яким була перещеплена вихідна КГ. Слід зазначити, що характер змін активності Цп у динаміці пухлинного росту вихідної та резистентних до цитостатиків пухлин КГ достовірно відрізнявся. Зокрема, ми відзначали достовірне її зниження в експоненційній та термінальній фазах пухлинного росту вихідної КГ, тоді як у випадку резистентних штамів характер змін був протилежним.

Таким чином, у результаті проведених досліджень нами встановлено низку змін, пов'язаних з обміном ендогенного заліза, які виникають у ПТ КГ з різною чутливістю до цитостатиків у динаміці росту утворення. Зокрема, нами виявлено, що у СК тварин з пухлиною відбувається різке підвищення вмісту Фр і Тф, а також зростання активності Цп (рис. 11), що пов'язано з розвитком запального процесу у пухлинному вогнищі. При цьому підвищення активності Тф було найбільш вираженим у тварин із вихідною КГ. Отже, зазначені показники у перспективі можуть бути використані для неінвазивної діагностики пухлин, а також (у випадку високих показників активності Цп) для виявлення пухлин, резистентних до дії цитостатиків.

При порівняльному аналізі пухлин вихідного та резистентних до цитостатиків штамів КГ нами встановлено спектр показників, які відповідали кожному з досліджених маркерів (рис. 12). Так, для пухлин вихідного штаму, незалежно від фази росту пухлини, був характерним підвищений ступінь метилування промону-



**Рис. 11.** Зміни профілю металовмісних білків у СК інтактних тварин та тварин із перещепленою КГ



**Рис. 12.** Зміни показників обміну заліза, характерні для пухлин з різною чутливістю до цисплатину та доксорубіцину

Таблиця  
Характер змін показників обміну заліза у експоненційній та термінальній фазах росту досліджених штамів КГ порівняно з латентною фазою

Показники		Експоненційна фаза	Термінальна фаза
Пухлинні	Фр	— ▲▲	▲ ▲
	Метилування <i>fth1</i>	▲ ▲ ▲	▲ ▲ ▲
	мікроРНК-133a	▼ ▼ ▼	▼▼ ▼▼
	мікроРНК-200b	— ▼▼▼	▼▼ ▼▼
	Комплекси ВЗ	▲ ▲ ▲	▲ ▲ ▲
	Метилування <i>tfr1</i>	— ▲▲ ▲	▲▲ ▲▲ ▲
	мікроРНК-320	— ▼ ▼▼▼	▼▼ ▼▼ ▼▼
	мікроРНК-122	▼ ▲▲ ▲	▼▼ ▼▼ ▼▼
	Сироваткові	Фр	— — —
Тф		▼ ▼ ▼	▼▼▼ ▼▼ ▼▼
Цп		▼ ▲ ▲	▼ ▲ ▲
мікроРНК-122		▲▲ ▼▼ ▼	▼▼ ▼ ▼

Блакитним виділено показники вихідного штаму КГ, жовтим – резистентного до цисплатину, а червоним – до доксорубіцину.

▲ – достовірно ( $p < 0,05$ ) вище, ніж у латентній фазі.

▼ – достовірно ( $p < 0,05$ ) нижче, ніж у латентній фазі.

тора гена *fth1*, низькі показники експресії мікроРНК-133a, -200b та -320, а також висока активність Цп у СК.

Для пухлин, резистентних до доксорубіцину, характерний високий ступінь метилування промотора гена рецептора Тф 1, а також підвищений рівень Фр у ПТ. У пухлинах, резистентних до цисплатину, також визначався високий ступінь метилування промотора гена *tfr1*, підвищена експресія мікроРНК-133a, знижена – мікроРНК-122, а також високий рівень Фр у ПТ.

Крім того, нами встановлено низку особливостей процесів обміну заліза, які виникають у різних фазах пухлинного росту (таблиця).

У більшості випадків зміни, які відбуваються в експоненційній фазі росту, стають більш вираженими у термінальній. Водночас є низка показників, які мають різний характер змін у пухлинах із різною чутливістю до цитостатиків (рівень Фр у ПТ, експресія мікроРНК-122, метилування промотора гена *tfr1*, активність Цп у СК). Спостереження за особливостями змін зазначених показників у динаміці росту

пухлин може також використовуватися для оцінки їх чутливості до протипухлинної терапії.

Отже, використання показників, які характеризують обмін металовмісних білків, може суттєво покращити як діагностику злоякісних новоутворень, так і прогнозування перебігу захворювання, а також допомогти обрати найбільш ефективні схеми терапії.

## ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що у процесі росту пухлин відбуваються суттєві зміни обміну металовмісних білків як на рівні ПТ, так і на рівні організму.

2. Виявлено низку білкових та епігенетичних позапухлинних маркерів, які характерні для розвитку пухлинного процесу і дозволяють виявити його ще у латентній фазі.

3. Описано комплекс показників обміну металовмісних білків, які дозволяють оцінити ступінь чутливості пухлин до схем протипухлинної терапії з використанням цисплатину або доксорубіцину.

Роботу виконано в рамках цільової програми наукових досліджень ВБФМБ НАН України «Функціональна геноміка і метаболоміка в системній біології» (номер державної реєстрації теми 0112U002197; 2012–2016 рр.).

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. **Кавецький РЄ.** Пухлина і організм. Київ: Госмедиздат УССР, 1962. 301 с.
2. **Richardson DR, Kalinowski DS, Lau S, et al.** Cancer cell iron metabolism and the development of potent iron chelators as anti-tumor agents. *BBA* 2009; **1790** (7): 702–17.
3. **Hentze MW, Muckenthaler MU, Andrews NC.** Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell* 2004; **117** (3): 285–97.
4. **Torti SV, Torti FM.** Iron and cancer: more ore to be mined. *Nat Rev Cancer* 2013; **13** (5): 342–55.
5. **Yurchenko OV, Todor IN, Tryndyak VP, et al.** Resistance of Guerin's carcinoma cells to cisplatin: Biochemical and morphological aspects. *Exp Oncol* 2003; **25**: 64–8.
6. **Al'Tshuler SA, Kozyrev BM.** Electron paramagnetic resonance. New York: Acad Press 2013. 382 p.
7. **Schmittgen TD, Livak KJ.** Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols* 2008; **3** (6): 1101–8.
8. **Pang M, Connor JR.** Role of ferritin in cancer biology. *J Cancer Sci Ther* 2015; **7**: 155–60.
9. **Tryndyak VP, Pogribny IP, Kovalchuk O, et al.** Epigenetic profiling of multidrug-resistant human MCF-7 breast adenocarcinoma cells reveals novel hyper- and hypomethylated targets. *Mol Cancer Ther* 2007; **20**: 1089–98.
10. **Xu Z, Shi Z, Li Y.** The crosstalk between micro RNA and iron homeostasis. *Int J Genomic Med* 2014; **2013** (1): 112–5.
11. **Wu Y, Xiao Y, Ding X, Zhuo Y, et al.** A miR-200b/200c/429-binding site polymorphism in the 3' untranslated region of the AP-2α gene is associated with cisplatin resistance. *PLoS One* 2011; **6** (12): e29043.
12. **Toyokuni S.** Role of iron in carcinogenesis: cancer as a ferrotoxic disease. *Cancer Sci* 2009; **100** (1): 9–16.
13. **Galaris D, Skiada V, Barbouti A.** Redox signaling and cancer: the role of «labile» iron. *Cancer Lett* 2008; **266** (1): 21–9.
14. **Barr I, Smith AT, Chen Y, Senturia R, et al.** Ferric, not ferrous, heme activates RNA-binding protein DGCR8 for primary microRNA processing. *PNAS* 2012; **109** (6): 1919–24.
15. **Winter J, Jung S, Keller S, et al.** Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol* 2009; **11** (3): 228–34.



16. Chua AC, Knuiman MW, Trinder D, *et al.* Higher concentrations of serum iron and transferrin saturation but not serum ferritin are associated with cancer outcomes. *Am J Clin Nutr* 2016; **104** (3): 736–42.
17. Wang B, Zhang J, Song F, *et al.* EGFR regulates iron homeostasis to promote cancer growth through redistribution of transferrin receptor 1. *Cancer Lett* 2016; **381** (2): 331–40.
18. Cheng CM, Wang D, Cao X, *et al.* Iron Regulatory protein 1 suppresses hypoxia-induced iron uptake proteins expression and decreases iron levels in HepG2 Cells. *J Cell Biochem* 2015; **116** (9): 1919–31.
19. Davis M, Clarke S. Influence of microRNA on the maintenance of human iron metabolism. *Nutr* 2013; **5** (7): 2611–28.
20. He DX, Gu XT, Jiang L, *et al.* A methylation-based regulatory network for microRNA 320a in chemoresistant breast cancer. *Mol Pharm* 2014; **86** (5): 536–47.
21. Schaar DG, Medina DJ, Moore DF, *et al.* miR-320 targets transferrin receptor 1 (CD71) and inhibits cell proliferation. *Exp Hemat* 2009; **37** (2): 245–55.
22. Sun JY, Huang Y, Li JP, *et al.* MicroRNA-320a suppresses human colon cancer cell proliferation by directly targeting  $\beta$ -catenin. *Mol Cell Biol Res Commun* 2012; **420** (4): 787–92.
23. Lukianova NY, Borikun TV, Yalovenko TM, Chekhun VF. Role of miRNA-122 and miRNA-200b in intratumor heterogeneity formation and human breast cancer prognosis. *Int J Current Res Rev* 2016; **8** (17): 50–9.
24. Fong MY, Zhou W, Liu L, *et al.* Breast-cancer-secreted miR-122 reprograms glucose metabolism in premetastatic niche to promote metastasis. *Nat Cell Biol* 2015; **17** (2): 183–94.

#### CHANGES IN THE RANGE OF METALLOPROTEINS AND THEIR REGULATORY FACTORS IN GROWTH DYNAMIC OF SENSITIVE AND RESISTANT GUERIN CARCINOMA

*N. Yu. Lukianova, T.V. Borikun, D.V. Demash, I.M. Todor, T.V. Zadvornyi, D.M. Storchai, T.M. Yalovenko, A.O. Pavlova, J.V. Lozovska, L.A. Naleskina, L.M. Kunska, V.F. Chekhun*

**Summary. Aim:** to analyze changes in the range of metal-containing proteins and certain factors of their

*epigenetic regulation in serum and tumor tissue of animals in dynamics of growth of sensitive and resistant Guerin carcinoma (GC). Subject and methods:* the study was conducted on rats with sensitive and resistant to doxorubicin and cisplatin GC. Levels of ferritin, transferrin, ceruloplasmin and free iron complexes were measured in tumor tissue and blood serum using ELISA and low-temperature EPR. *fth1* and *tfr1* promoters methylation and expression levels of microRNA-122, -133a, -200b and -320a were evaluated using RT-PCR. **Results:** we showed that the dynamics of growth of GC is accompanied by significant changes in expression and epigenetic regulation of metal-containing proteins in tumor tissue and serum. Also we determined differences which allowed to differentiate sensitive and resistant to doxorubicin and cisplatin tumors, as well as stages of their growth. **Conclusions:** obtained data showed the important role of metal-containing proteins and their regulation in the process of tumor growth and development of resistance to anticancer drugs. These results can be used to improve differential diagnosis of tumors and to assess their sensitivity to cytotoxic drugs.

**Key Words:** iron, microRNA, methylation, Guerin carcinoma, resistance, growth dynamics.

#### Адреса для листування:

Лук'янова Н.Ю.  
03022, Київ, вул. Васильківська, 45  
Інститут експериментальної патології,  
онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького  
НАН України  
E-mail: lu\_na\_u@rambler.ru

Одержано: 05.12.2016