

Вплив іонів металів на функціонування антиоксидантної системи та ферменти міжклітинного матриксу пухлин за умов їх різної чутливості до доксорубіцину

Ю.В. Лозовська¹, Н.Ю. Лук'янова¹, І.М. Андрусішина², І.М. Тодор¹, А.П. Бурлака¹, І.І. Ганусевич¹, В.Ф. Чехун¹

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

²ДУ «Інститут медицини праці імені Ю.І. Кундієва НАМН», Київ; e-mail: Lozovskaya.2012@ukr.net

Досліджено вміст есенційних макро- і мікроелементів: міді, цинку, магнію, заліза та кальцію у плазмі крові та пухлинній тканині тварин з чутливою та резистентною до доксорубіцину карциносаркомою Уокер-256 та їх асоціативний зв'язок із функціональним станом металовмісних ензимів антиоксидантної системи (АОС): металотеонеїн-1 (МТ-1), церулоплазмін, феритин, міслопероксидаза, трансферин та активністю протеолітичних ферментів: матриксні металопротейнази (ММП-2 та ММП-9). Показано, що у плазмі крові тварин з чутливою та резистентною до доксорубіцину карциносаркомою порівняно із інтактними збільшується вміст співвідношень Cu/Zn (2,8 раза) і Ca/Mg (1,4 раза). Встановлено, що відмінності між вмістом макро- і мікроелементів у плазмі крові тварин із чутливими та резистентними карциносаркомами порівняно із інтактними позначилися на функціонуванні показників прооксидантно-антиоксидантної системи: збільшенні МТ-1 (у 2,7 та 1,6 раза відповідно) та церулоплазміні (1,2 та 1,6 разів відповідно) та феритину (у 4,6 та 9,7 раза відповідно) на фоні зменшення міслопероксидази (у 5 та 7,5 раза відповідно) та трансферину (1,3 та 1,9 раза відповідно). Виявлено, що у пухлинній тканині тварин із резистентною карциносаркомою порівняно із чутливою вміст цих показників також відрізнявся: зменшення МТ-1 (1,7 раза), збільшення феритину (у 65 разів), збільшення вмісту трансферину (у 2,5 раза). Показано, що зміна прооксидантно-антиоксидантного балансу у тварин-пухлиноносіїв супроводжувалося збільшенням протеолітичної активності ферментів-ремодуляторів міжклітинного матриксу: ММП-2 та ММП-9. Збільшення вмісту міді та заліза у плазмі крові та пухлинній тканині тварин з резистентною до доксорубіцину карциносаркомою призводить до ініціації генерування вільнорадикальних сполук та більш вираженої активації ММП-2 та ММП-9. Отримані результати дають підстави вважати, що іонний дисбаланс здатен призводити до конформації біополімерів АОС та зміни їх функції. Подібні перетворення відбуваються при формуванні резистентного фенотипу пухлин, що може бути експериментально обґрунтованою підставою для застосування хелатуючих агентів з метою підвищення чутливості резистентних новоутворень до дії цитостатиків.

Ключові слова: макро- і мікроелементи; карциносаркома Уокер-256; металотеонеїн-1; церулоплазмін; феритин; трансферин; міслопероксидаза; матриксні металопротейнази.

ВСТУП

Нині одним з найбільш значущих видів лікування всіх злоякісних захворювань залишається хіміотерапія, яка базується на засадах органотропності препаратів та індивіду-

альній чутливості пухлин до дії цитостатиків [1, 2]. Проте за останнє десятиріччя на фоні застосування сучасних стратегій протипухлинної терапії спостерігається тенденція зростання кількості новоутворень, резистентних до дії цитостатиків [3, 4]. Так, за даними

© Ю.В. Лозовська, Н.Ю. Лук'янова, І.М. Андрусішина, І.М. Тодор, А.П. Бурлака, І.І. Ганусевич, В.Ф. Чехун

американського протиракового товариства, більш ніж 50% злоякісних пухлин молочної залози є нечутливими до антрациклінових антибіотиків, що становить нагальну потребу у розробці нових методів лікування, які повинні базуватися на вивченні тих ланок патогенезу, корекція яких сприятиме покращенню клінічних результатів [5].

Для забезпечення метаболічної активності пухлинних клітин, у тому числі резистентних до цитостатиків, важливе місце займає їх окисно-відновна адаптація в організмі, котра залежить від багатьох факторів: статусу есенційних мікроелементів, який залучається до процесів вільнорадикального утворення та водночас впливає на конформацію та активність металовмісних макромолекул антиоксидантної системи (АОС) [6, 7]. Метаболізм металопротеїнів АОС а саме: металотеонеїну (МТ-1), церулоплазміну, феритину, мієлопероксидази змінюється з формуванням резистентності пухлин до дії цитостатиків [8–10]. Водночас відомо, що порушення іонної рівноваги у системі пухлина–організм впливає не тільки на функції цих білків АОС, а і на активність групи протеаз, які задіяні у модифікації компонентів міжклітинного матриксу, зокрема, матриксних металопротеїназ (ММП-2 та ММП-9) [11]. У доступних нам джерелах інформації практично не зустрічається даних щодо особливостей мікроелементного гомеостазу в організмі пухлиноносія при формуванні резистентного фенотипу новоутворень до дії цитостатиків та відповідно їхньої ключової ролі у функціонуванні протеїнів АОС та активації або пригніченні ММП-2, ММП-9.

Отже, на нашу думку, визначення ролі есенційного статусу мікроелементів у активації чи пригніченні активності металовмісних протеїнів АОС та ферментів протеолізу міжклітинного матриксу при неопластичних процесах дасть змогу розширити уявлення щодо механізмів патогенезу, у тому числі нечутливих до дії цитостатиків злоякісних новоутворень.

Метою нашої роботи було дослідити зміни вмісту есенційних макро- і мікроелементів:

міді, цинку, магнію, заліза та кальцію у плазмі крові та пухлинній тканині тварин з чутливою та резистентною до доксорубіцину карциносаркомою Уокер-256 та їх асоціативний зв'язок із функціональним станом металовмісних ензимів антиоксидантної системи: МТ-1, церулоплазміном, феритином, мієлопероксидазою, трансферином та активністю протеолітичних ферментів ММП-2 та ММП-9.

МЕТОДИКА

Досліди проведено на 150 самицях безпорідних щурів (150–200 г) з віварію ІЕПОР ім. Р.Є. Кавецького НАН України. Усі дослідження здійснювали згідно з нормами, встановленими законом України “Про захист тварин від жорстокого поводження” та вимогам Європейської конвенції про захист хребетних тварин (Страсбург, 1986). Тварин поділили на три групи. До 1-ї контрольної групи ввійшли інтактні тварини, до 2-ї і 3-ї дослідних груп – тварини з перещепленою чутливою і резистентною до доксорубіцину карциносаркомою Уокер-256 відповідно. Для отримання резистентного фенотипу пухлини до дії доксорубіцину дослідним тваринам було проведено 12 курсів хіміотерапії цим препаратом. Кількість перещеплень вихідної пухлини та пухлини в процесі формування резистентності була однаковою.

Вміст хімічних елементів: магнію (Mg), кальцію (Ca), цинку (Zn), заліза (Fe) та міді (Cu) у пухлинній тканині та плазмі крові тварин визначали методом атомно-емісійної спектроскопії на приладі Optima 2100 DV фірми «Perkin-Elmer» (США) [12]. Вміст заліза у плазмі крові досліджували за допомогою автоматичного біохімічного аналізатора Chem Well 2900 (США).

Визначали вміст МТ-1 та феритину у сироватці крові та гомогенаті пухлин щурів з карциносаркомою Уокер-256 імуноферментним методом – ІФА (ELISA) із застосуванням відповідних наборів реактивів: Uscer (Китай) за допомогою автоматичного біохімічного та імуноферментного аналізатора Chem Well 2900.

Гомогенат пухлинної тканини отримували у фізіологічному розчині у співвідношенні 1/3.

У крові тварин аналізували активність церулоплазміну та вміст трансферину, швидкість генерування супероксидних радикалів методом електронного парамагнітного резонансу за температури рідкого азоту 77 К [13]. Вміст трансферину та швидкість генерування супероксидних радикалів також визначали у в пухлинній тканині із використанням спінового TEMPONE-H.

Дослідження активності МПО у плазмі крові виконано згідно з методом Schierwagen і співавт. [14]. До 100 мкл зразків плазми додавали 50 мкл калій-фосфатного (K_2HPO_4) буфера (рН 7,4) та центрифугували при 15000g упродовж 15 хв при 4°C. Після цього додавали 10 об'ємів 50 ммоль/л K_2HPO_4 буфера (рН 6,0), який містить 0,5% гексадецилтриметиламоніум броміду («Fluka Chemie Buchs», Швейцарія) та інкубували при 60°C протягом 2 год. Після обробки ультразвуком та центрифугування додавали о-діанзидин дигідрохлорид («Sigma-Aldrich Co.», Німеччина) та 0,3% H_2O_2 . Оптичну густину вимірювали при довжині хвилі 405 нм та нормували за вмістом загального білка.

Активність желатиназ у зразках сироватки крові та пухлинної тканини тварин досліджували методом зимографії в поліакриламідному гелі (із додаванням желатину як субстрату) на основі SDS-електрофорезу білків. Протеолітич-

ну активність оцінювали вимірюванням площі зони лізису, використовуючи для порівняння стандартний набір ММП-2 і ММП-9 («Sigma», Німеччина). Результати аналізували за допомогою стандартної програми TotalLab 1.01 [15].

Статистичну обробку проводили за допомогою програмного забезпечення STATISTICA 6.0 з використанням пакету прикладних програм MS Excel 2010. Достовірність відмінностей між показниками різних груп оцінювали за допомогою критерію t Стьюдента. Коефіцієнт кореляції обчислювали за Пірсоном. Відмінності вважали вірогідними при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

На початку нашої роботи аналізували та зіставляли вміст есенційних елементів у пухлинній тканині та плазмі крові тварин з карциносаркомою Уокер-256 у разі різної чутливості пухлин до дії доксорубіцину. Показано, що у плазмі крові тварин-пухлиноносіїв вміст міді був вищим (2–2,8 раза), а магнію (1,3 раза) та цинку (1,4–1,6 раза) – нижчим порівняно зі значеннями інтактних тварин ($P < 0,05$). Слід зазначити, що більш виражені зміни вмісту іонів металів виявлено у плазмі крові тварин із нечутливою до цитостатиків пухлиною (табл. 1).

Крім того встановлено, що вміст цинку і магнію суттєво зменшується у резистентних

Таблиця 1. Кількісні зміни вмісту есенційних елементів у пухлинній тканині та плазмі крові тварин із чутливою та резистентною карциносаркомою Уокер-256

Вміст елемента	Контрольна група тварин	Тварини із чутливою до доксорубіцину пухлиною		Тварини із резистентною до доксорубіцину пухлиною	
	плазма	плазма	пухлина	плазма	пухлина
Cu	0,8 5 ± 0,11	1,78 ± 0,11*	1,68 ± 0,33	2,37 ± 0,23**	2,70 ± 0,58**
Zn	1,21 ± 0,16	0,87 ± 0,01*	10,98 ± 1,83	0,75 ± 0,02**	9,17 ± 1,75
Ca	80,12 ± 2,31	93,15 ± 9,41	131,16 ± 19,31	120,53 ± 12,18**	65,09 ± 15,41**
Fe	19,01 ± 0,90	29,15 ± 4,12*	25,18 ± 4,79	39,34 ± 3,25**	34,51 ± 5,23**
Mg	20,01 ± 0,90	16,41 ± 2,11*	349,62 ± 32,64	21,35 ± 1,85	181,42 ± 9,73**

Примітка: тут і в табл. 2 і 3 * $P < 0,05$ щодо значень інтактної групи та тварин-пухлиноносіїв; ** $P < 0,05$ щодо значень у тварин з чутливою до доксорубіцину карциносаркомою.

пухлинних клітинах внаслідок їх залучення у механізми лізосомальної секвестрації доксорубіцину [16].

Існує думка, що зміни у гомеостазі макро- і мікроелементів є доказом їх залучення у комплексоутворення з протеїнами, а конкуруюча дія між ними позначається на активності металовмісних ферментів [7, 8, 10]. Саме тому нами було проаналізовано та зіставлено співвідношення вмісту Ca/Mg у пухлинній тканині та плазмі крові тварин, оскільки цей показник може слугувати маркером активації епітеліально-мезенхімального переходу через рецептор TRPM7 [17]. Показано, що у плазмі крові тварин-пухлиноносіїв цей показник був вищим у 1,4 раза відносно значень інтактних тварин ($P < 0,05$). Проте зіставлення співвідношень вмісту Ca/Mg у плазмі крові та пухлинній тканині тварин із різною чутливістю пухлин не виявили відмінності між ними (рис. 1).

На наступному етапі роботи було проаналізовано характер змін співвідношень вмісту Cu/Zn у пухлинній тканині та плазмі крові тварин, оскільки дисбаланс цих мікроелементів позначається на активності цілої низки ферментів системи антиоксидантного захисту та у функціонуванні ензимів, що залучені у процеси протеолізу міжклітинного матриксу [7, 8, 10].

Так, було з'ясовано, що у плазмі крові тварин-пухлиноносіїв співвідношення вмісту

Cu/Zn було у 2,8 раза вищим, ніж у інтактних тварин ($P < 0,05$). Водночас у плазмі крові та пухлинній тканині тварин із резистентною карциносаркомою Уокер-256 цей показник зростає у 1,5 раза порівняно зі значенням у тварин із чутливою пухлиною (рис. 2). Отримані результати є свідченням того, що із формуванням резистентного фенотипу пухлин до дії доксорубіцину в організмі тварин відбуваються суттєві зміни гомеостазу цих елементів.

Враховуючи вищесказане, було доцільним проаналізувати активність тих металовмісних протеїнів, які мають найбільш високу спорідненість до міді та цинку, зокрема – МТ-1, церулоплазміну, мієлопероксидази (табл. 2).

Серед численних даних літератури, які присвячені дослідженням функцій металотіонеїнів в організмі, перше місце займають праці, котрі стосуються їх значення у транспорті іонів, особливо цинку, захисті від металіндукованого пошкодження та антиоксидантній функції [18]. Крім того, є докази того, що МТ-1 відіграє вагомую роль у виникненні та розвитку хіміорезистентності злоякісних новоутворень, тим самим сприяючи підвищенню проліферативної активності пухлинних клітин [19]. Проте відомо, що антиоксидантна роль МТ-1 залежить від функціонування їх доменів, які є досить чутливими до гомеостазу Zn та Cu. Так, за фізіологічних умов один із доменів МТ-1 (α -домен) здатен

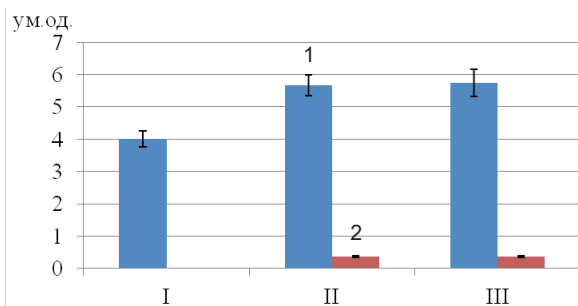


Рис. 1. Зміни співвідношення вмісту Ca/Mg у плазмі крові та пухлинній тканині тварин з чутливою та резистентною карциносаркомою: I – контрольна група тварин (інтактні); II – тварини із чутливою до доксорубіцину пухлиною; III – тварини із резистентною до доксорубіцину пухлиною; 1 – плазма; 2 – пухлина

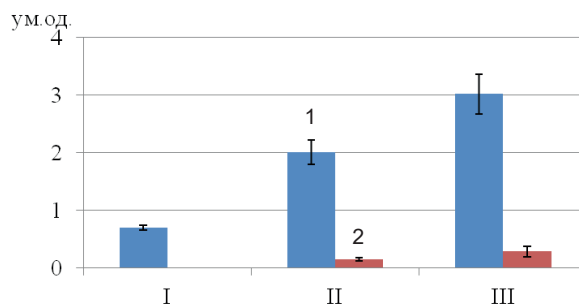


Рис. 2. Зміни співвідношення вмісту Cu/Zn у плазмі крові та пухлинній тканині тварин з чутливою та резистентною карциносаркомою Уокер-256. I – контрольна група тварин (інтактні); II – тварини із чутливою до доксорубіцину пухлиною; III – тварини із резистентною до доксорубіцину пухлиною; 1 – плазма; 2 – пухлина

зв'язуватись з чотирма атомами Zn, а другий (β -домен) – з трьома атомами Cu. Крім того, обидва домени можуть з'єднуватись лише з атомами Zn. Таким чином, існування певного фізіологічного антагонізму між катіонами Zn^{2+} і Cu^{2+} призводить до зміни функціонування МТ-1 [20]. На наш погляд, цей факт заслуговує уваги, оскільки існують дані про те, що довготривала дія доксорубіцину призводить до зниження вмісту Zn у плазмі крові хворих на рак молочної залози [21].

Результати нашого дослідження показали, що у плазмі крові тварин-пухлиноносіїв вміст МТ-1 збільшився у 2,7 раза порівняно зі значеннями інтактних тварин на фоні незначного зниження вмісту Zn. Цей феномен антагоністичних зв'язків пов'язують із лабільністю та вибірковістю зв'язуючої функції доменів МТ-1. На відміну від цього, у плазмі крові та пухлинній тканині тварин із резистентною до доксорубіцину карциносаркомою Уокер-256 спостерігали синергічне достовірне зниження вмісту МТ-1 та Zn (у 1,7 раза) порівняно зі значеннями у тварин з чутливою карциносаркомою. Отримані результати підтверджують той факт, що формування резистентного до доксорубіцину фенотипу пухлин супроводжується більш суттєвим зниженням вмісту Zn, що позначилося на функціонуванні МТ-1, а саме зниженні його активності.

Разом із цим відомо, що структурно-функціональні характеристики церулоплазміну також можуть змінюватися внаслідок дисбалансу макро- і мікроелементів в організмі [10]. Так, було показано, що доксорубіцин може зв'язуватись із церулоплазміном, тим самим сприяючи видаленню міді із каталітичного центру та зниженню активності білка [22].

Варто зазначити, що активність церулоплазміну у плазмі крові тварин-пухлиноносіїв була вищою у 1,2 раза порівняно із інтактними (табл. 2). Також встановлено, що у плазмі крові тварин з резистентними пухлинами цей показник збільшується у 1,5 раза, а вміст міді у 1,4 раза порівняно зі значеннями у тварин із чутливими до цитостатика пухлинами ($P < 0,05$). Одночасне збільшення активності церулоплазміну та вмісту міді у плазмі крові із резистентною до цитостатика пухлиною є свідченням пригнічення оксидазної функції цього білка завдяки порушенню активності каталітичного центра. Досить інформативною, на наш погляд, є оцінка функціональної активності церулоплазміну із урахуванням співвідношень вмісту Cu/церулоплазміну та церулоплазміну/трансферину, оскільки їх зростання у плазмі крові спостерігаються при порушенні резервної можливості церулоплазміну щодо транспортування іонів міді та участі у регуляції обміну заліза.

Таблиця 2. Кількісні зміни вмісту та активності металовмісних протеїнів у плазмі крові та пухлинній тканині тварин із чутливою та резистентною карциносаркомою Уокер-256

Металовмісні протеїни	Контрольна група тварин	Тварини із чутливою до доксорубіцину пухлиною		Тварини із резистентною до доксорубіцину пухлиною	
	плазма	плазма	пухлина	плазма	пухлина
Металотеонеїн-1, мг/л	282,40 ± 9,73	760,21 ± 23,73*	2650,43 ± 34,12	465,18 ± 45,73**	1521,62 ± 38,12**
Церулоплазмін, ум.од.	0,50 ± 0,16	0,60 ± 0,02*	–	0,80 ± 0,11**	–
Феритин, нг/мл	6,15 ± 2,14	28,62 ± 0,17	6,02 ± 0,11	56,91 ± 0,23**	390,09 ± 17,19**
Трансферин, ум.од.	0,93 ± 0,90	0,48 ± 0,17*	0,39 ± 0,15	0,70 ± 0,15**	0,96 ± 0,09**
Мієлопероксидаза, ум.од.	0,15 ± 0,03	0,03 ± 0,001	–	0,02 ± 0,002	–

Для більш детального аналізу структурно-функціональних змін церулоплазміну при наявності в організмі злоякісного новоутворення, у тому числі при формуванні резистентного фенотипу, є доцільним визначення вмісту трансферину. Показано, що разом вони утворюють молекулярну систему, яка здатна регулювати вміст іонів заліза (Fe^{2+}), сумарну антиоксидантну активність сироватки крові та окиснення Fe^{2+} церулоплазміном [23]. Отже, нами було виявлено, що у плазмі крові тварин-пухлиноносіїв спостерігається зниження вмісту трансферину порівняно зі значеннями тварин інтактної групи ($P < 0,05$). Це зниження супроводжувалося достовірним збільшенням вмісту заліза, що є підтвердженням переваження ним системи транспортування та накопичення в організмі. Водночас у пухлинній тканині тварин із резистентною до доксорубіцину карциносаркомою збільшувався вміст трансферину та заліза у 2 та 1,4 раза відповідно порівняно із чутливою.

Таким чином, ми встановили зміни резервної можливості церулоплазміну щодо транспортування іонів міді та його фероксидазної активності у тварин-пухлиноносіїв порівняно із інтактними (рис. 3).

Так, у плазмі крові дослідних груп виявлено вірогідне зростання значень співвідношень Cu /церулоплазміну та церулоплазміну/трансферину

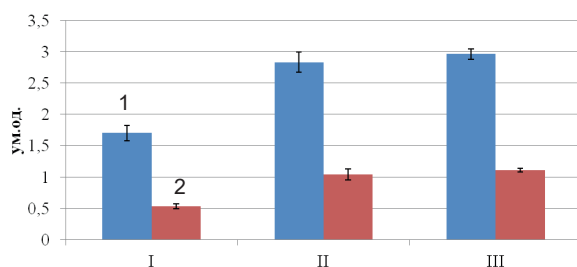


Рис. 3. Зміни співвідношення вмісту Cu /церулоплазміну (1) та церулоплазміну/трансферину (2) у плазмі крові тварин з чутливою та резистентною карциносаркомою Уокер-256: I – контрольна група тварин; II – тварини із чутливою до доксорубіцину пухлиною; III – тварини із резистентною до доксорубіцину пухлиною; 1 – Cu /церулоплазмін, 2 – церулоплазмін/трансферин

порівняно із контролем у 1,8 та 2,2 раза відповідно ($P < 0,05$). Однак зазначені показники достовірно не відрізнялись у групах тварин-пухлиноносіїв з чутливою та резистентною карциносаркомою Уокер-256.

Активність молекули церулоплазміну також впливає на регуляцію функції гемвмісного ферменту мієлопероксидази, створюючи несприятливі умови для розвитку патогенів та водночас сприяючи активації фагоцитів. У пацієнтів із її дефіцитом виявляється пригнічена цитотоксична активність нейтрофілів щодо пухлинних клітин. Збільшення активності церулоплазміну в умовах надлишку міді призводить до блокування активного центру мієлопероксидази. Водночас у молекулі мієлопероксидази порушується функціонування сайтів для зв'язування іонів міді, що призводить до її конформаційних змін та інгібування функції [24]. Наші результати досліджень доводять, що активність мієлопероксидази у плазмі крові тварин-пухлиноносіїв нижча у 5 разів порівняно з інтактними. Слід зазначити, що зниження активності цього ферменту призводило до достовірного зростання вмісту міді, особливо у щурів із резистентною пухлиною.

Таким чином, не викликає сумніву той факт, що зміна активності церулоплазміну та мієлопероксидази при виникненні та розвитку пухлинного процесу може бути наслідком порушення первинної ланки їх регуляції – іонного гомеостазу. Крім того, порушення обміну зазначених катіонів та споріднених з ними металовмісних протеїнів супроводжуються змінами вмісту заліза та функціонування протеїну-регулятора його обміну – феритину. У плазмі крові тварин з чутливою та резистентною карциносаркомою Уокер-256 вміст феритину перевищував значення інтактних щурів у 4,6 та 9,7 раза відповідно. Водночас ці зміни супроводжувалися достовірним збільшенням вмісту заліза у плазмі крові тварин-пухлиноносіїв.

Встановлений феномен значного зростання вмісту феритину у резистентній до доксорубіцину карциносаркомі є свідченням активації

його антиоксидантної функції внаслідок зміни редокс-статуса пухлинних клітин. Саме тому, на наш погляд, було доцільно проаналізувати особливості генерування супероксидних радикалів у плазмі крові та пухлинній тканині дослідних тварин з урахуванням есенційного статусу (табл. 3).

У плазмі крові дослідних тварин порівняно з інтактними збільшувалася швидкість генерування супероксидних радикалів у 16 та 22 рази відповідно ($P < 0,05$). Водночас у резистентній карциносаркомі значення цього показника було вищим у 1,2 раза, ніж у щурів з чутливою пухлиною. Отримані результати є свідченням того, що формуванням резистентного фенотипу пухлин до дії доксорубіцину супроводжується суттєвою дисфункцією мітохондрій, що у свою чергу призводить до ініціації генерації вільнорадикальних сполук. Нами виявлено високий ступінь асоціативного зв'язку між збільшенням вмісту міді та швидкістю генерації супероксидних радикалів у плазмі крові та пухлинній тканині тварин з чутливою ($r = 0,62$; $r = 0,67$) та резистентною ($r = 0,72$; $r = 0,76$) карциносаркомами. Аналогічна залежність спостерігалася між збільшенням вмісту заліза та швидкістю генерації супероксидних радикалів у плазмі крові та пухлинній тканині тварин з чутливою ($r = 0,54$; $r = 0,64$) та резистентною ($r = 0,58$; $r = 0,67$) до доксорубіцину карциносаркомами.

Таким чином, показано що процес ге-

нерації вільнорадикальних сполук може постійно ініціюватись надлишком вмісту цих катіонів, викликаючи виснаження системи АОС та активацію мідь та цинкзалежних ММП-2 та ММП-9. У плазмі крові дослідних тварин активність желатиназ значно перевищує значення у інтактних щурів ($P < 0,05$). Проте у плазмі крові та пухлинній тканині щурів з вихідним штамом карциносаркоми Уокер активність ММП-2, яка за даними літератури асоційована з інвазивністю та метастатичним потенціалом пухлини, була незначною, тоді як у тварин з резистентною карциносаркомою вона збільшилася у 70 та 11 разів (див. табл. 3). Водночас концентрація ММП-9 у плазмі крові та пухлинній тканині тварин з резистентною карциносаркомою перевищувала у 3,8 та 11 разів значення у щурів з чутливою пухлиною.

У літературі є дані щодо зростання концентрації активних форм желатиназ при активації процесів генерації вільнорадикальних сполук. Відомо, що профермент активується за допомогою дисоціації зв'язку Zn^{2+} – цистеїн при взаємодії з реактивними формами кисню, які є тіолмодифікуючими агентами. Крім того виявлено, що збільшення вмісту Cu^{2+} сприяє селективній посттрансляційній активації ММП через механізм «ectodomain shedding» [25].

Отже, багаторівнева система регуляції активності ММП-2 та ММП-9 в організмі

Таблиця 3. Зміни швидкості генерування супероксидних радикалів у плазмі (нмоль/10⁵клітин · хв) і пухлині (нмоль/г тканини · хв) та активності желатиназ (ум. од.) у тварин з чутливою та резистентною карциносаркомою Уокер-256

Показники	Контрольна група тварин	Тварини із чутливою до доксорубіцину пухлиною		Тварини із резистентною до доксорубіцину пухлиною	
	плазма	плазма	пухлина	плазма	пухлина
Швидкість генерування супероксидних радикалів	0,13 ± 0,07	2,20 ± 0,17	1,90 ± 0,08	2,83 ± 0,19	2,17 ± 0,10*
Матриксна металопротеїназа-2	0,14 ± 0,01	2,15 ± 0,01*	1,81 ± 0,81	150,41 ± 21,18	20,11 ± 15,41**
Матриксна металопротеїназа-9	0,66 ± 0,02	120,15 ± 30,11*	2,51 ± 1,41	465,65 ± 43,15*	24,11 ± 4,5

пухлиносія пов'язана з швидкістю генерації вільнорадикальних сполук, особливостями функціонування ензимів АОС, що значною мірою асоціюється з первинною ланкою регуляції цих процесів – балансом макро- і мікроелементів.

Підсумовуючи вищенаведене, можна констатувати, що формування резистентного фенотипу пухлини до доксорубіцину (порівняно з чутливою) супроводжується суттєвими відмінностями мікроелементного гомеостазу в організмі пухлиносія, що у свою чергу позначилося на переформатуванні активності різних ланок АОС, а саме – пригнічення активності МТ-1 та мієлопероксидази, активації прооксидантних властивостей церулоплазміну та антиоксидантної функції феритину. Встановлено, що зміни мікроелементного гомеостазу та про- та антиоксидантної рівноваги у цих тварин стало ініціюючим фактором для більш вираженої активації ферментів, які задіяні у модифікації компонентів міжклітинного матриксу – ММП-2 та ММП-9.

Отримані результати узгоджуються із постулатами феноменологічної моделі іонної регуляції життєдіяльності нормальних та пухлинних клітин в організмі. Згідно з цією теорією, кожна клітина у складі популяції є саморегулюючою системою, компоненти якої взаємопов'язані та дають змогу утримувати гомеостаз у запрограмованих межах. Існує думка, що порушення механізмів іонної регуляції в організмі є еволюційним фактором ризику виникнення неоплазій, оскільки макро- і мікроелементи задіяні у широкій мережі метаболічних шляхів, а їх дисбаланс може призводити до конформації біополімерів та зміни їх функції. Подібні перетворення ймовірно змінюють активність ферментів АОС та молекулярно-біологічний профіль пухлинних клітин, сприяючи формуванню резистентних до цитостатиків пухлин.

ВИСНОВКИ

1. У плазмі крові тварин з чутливою та резистентною до доксорубіцину карциносар-

комою Уокер-256 порівняно із інтактними достовірно збільшується співвідношення вмісту Cu/Zn і Ca/Mg. Зміни мікроелементного гомеостазу у тварин-пухлиносіїв позначаються на компонентах про- та антиоксидантної систем: МТ-1, церулоплазміну, мієлопероксидази, феритину на фоні збільшення активності ферментів-ремодуляторів міжклітинного матриксу: ММП-2 та ММП-9.

2. Доведено, що формування резистентності до доксорубіцину карциносаркомою Уокер-256 супроводжується суттєвими змінами співвідношення вмісту міді, заліза, кальцію, цинку, магнію у плазмі крові та пухлинній тканині тварин. Збільшення вмісту міді та заліза у плазмі крові та пухлинній тканині тварин з резистентною до доксорубіцину карциносаркомою призводить до ініціації генерування вільнорадикальних сполук та більш вираженої активації ММП-2 та ММП-9. Встановлений факт може бути експериментально обґрунтованою підставою для застосування хелатуючих агентів для підвищення чутливості резистентних новоутворень до дії цитостатиків.

Робота виконана за підтримки Цільової програми наукових досліджень ВБФМБ НАН України «Молекулярно-генетичні і біохімічні механізми регуляції клітинних та системних взаємодій за фізіологічних та патологічних станів» (2017-2021) в рамках НДР «Молекулярно-біологічні фактори гетерогенності злоякісних клітин та варіабельність клінічного перебігу гормонозалежних пухлин» (2.2.5.411, 0117U002034).

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of coauthors of the article.

**Ю.В. Лозовская, Н.Ю. Лукьянова,
И.Н. Андрусишина, И.Н. Тодор,
А.П. Бурлака, И.И. Ганусевич, В.Ф. Чехун**

ВЛИЯНИЕ ИОНОВ МЕТАЛЛОВ НА ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ И ФЕРМЕНТЫ МЕЖКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА ОПУХОЛЕЙ ПРИ ИХ РАЗЛИЧНОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К ДОКСОРУБИЦИНУ

Исследовано содержание эссенциальных макро- и микроэлементов: меди, цинка, магния, железа и кальция в плазме крови и опухолевой ткани животных с чувствительной и резистентной к доксорубину карциносаркомой Уокер-256, а также их ассоциативную связь с функциональным состоянием металлосодержащих ферментов антиоксидантной системы (АОС): металлотеоин-1 (МТ-1), церулоплазмин, ферритин, миелопероксидаза, трансферрин и активностью протеолитических ферментов: матриксные металлопротеиназы (ММП-2 и ММП-9). Показано, что в плазме крови животных с чувствительной и резистентной к доксорубину карциносаркомой по сравнению с интактными наблюдается увеличение соотношения содержания Cu/Zn (2,8 раза) и Ca/Mg (1,4 раза). Установлено, что различия между содержанием микро- и макроэлементов в плазме крови животных с карциносаркомой по сравнению с контролем, отразились на показателях прооксидантно-антиоксидантной системы: увеличении содержания МТ-1 (в 2,7 и 1,6 раза соответственно) и церулоплазмину (1,2 и 1,6 раза соответственно) и ферритина (в 4,6 и 9 раза соответственно) на фоне уменьшения миелопероксидазы (в 5 и 7,5 раза соответственно) и трансферрина (1,3 и 1,9 раза соответственно). Выявлено, что в опухолевой ткани животных с резистентной карциносаркомой по сравнению с чувствительной содержание этих показателей отличались: уменьшение МТ-1 (1,7 раза), увеличение ферритина (в 65 раз), увеличение содержания трансферрина (в 2,5 раза). Показано, что изменение прооксидантно-антиоксидантного баланса у животных-опухоленосителей сопровождалось увеличением протеолитической активности ферментов-ремоделеров межклеточного матрикса: ММП-2 и ММП-9. Отмечено, что увеличение содержания меди и железа в плазме крови и опухолевой ткани животных с резистентной к доксорубину карциносаркомой приводит к инициации генерирования свободнорадикальных соединений и более выраженной активации ММП-2 и ММП-9. Полученные результаты дают основания считать, что ионный дисбаланс может привести к конформационным модификациям биополимеров АОС и изменениям их функций. Подобные преобразования выявлены при формировании резистентного фенотипа опухолей, что является экспериментальным обоснованием для применения хелатирующих агентов, с целью повышения чувствительности резистентных новообразований к действию цитостатиков.

Ключевые слова: макро- и микроэлементы; карцино-

саркома Уокер-256; металлотеоин-1; церулоплазмин; ферритин; трансферрин; миелопероксидаза; матриксные металлопротеиназы.

Yu.V. Lozovska¹, N.Yu. Lukianova¹, I.M. Andrusishyna², I.M. Todor¹, A.P. Burlaka¹, I.I. Ganusevych¹, V.F. Chekhun¹

EFFECT OF METAL IONS ON FUNCTIONING OF ANTIOXIDANT SYSTEM AND ENZYMES OF EXTRACELLULAR MATRIX IN TUMORS DIFFERED IN THEIR DOXORUBICIN SENSITIVITY

¹R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology, NAN of Ukraine;

²SI «Kundiiev Institute of Occupational Health, NAMN of Ukraine»; e-mail: Lozovskaya.2012@ukr.net

The content of the essential macro- and microelements (MaE and ME) – copper, zinc, magnesium, iron and calcium was measured in blood plasma (BP) and tumor tissue (TT) of the animals engrafted with Walker 256 carcinosarcoma (tumor strains sensitive or resistant to doxorubicin). Also, the link between the content of these elements and the functional state of metal-containing enzymes of antioxidant system (metallothionein-1 – MT-1, ceruloplasmin – CP, ferritin – FR, myeloperoxidase – MPO, transferrin – TF) as well proteolytic enzymes (matrix metalloproteinases – MMP-2 and -9) was studied. In BP of animals engrafted with either sensitive or resistant to doxorubicin carcinosarcoma Cu/Zn and Ca/Mg ratios increase 2.8-fold and 1.4-fold, respectively as compared to the intact animals. The differences between MaE and ME content in the animals with tumors differed in doxorubicin sensitivity as compared to the intact animals affected the indices of prooxidant-antioxidant system: 2.7 and 1.6-fold increase of MT-1 (for sensitive and resistant tumors, correspondingly), 1.2 and 1.6-fold increase of CP, and 4.6- and 9-fold increase of FR against 5 and 7.5-fold decrease of MPO and 1.3 and 1.9-fold decrease in TF. In TT of the animals engrafted with the resistant strain 1.7-fold decrease of MT-1, 65-fold increase of FR, and 2.5-fold increase of TF was evident as compared with TT of animals engrafted with the sensitive strain. The change in prooxidant-antioxidant balance in tumor-bearing animals was accompanied by the increased proteolytic activity of the enzymes involved in remodeling extracellular matrix, MMP-2 and MMP-8 ($p < 0.05$). Increased copper and iron content in BP and TT of the animals with doxorubicin-resistant Walker 256 carcinosarcoma could initiate of free-radical compounds generation and enhancement of MMP-2 and MMP-9 activation. Therefore, the ionic misbalance might be the cause of changes of the antioxidant system functions contributing to the formation of the resistant phenotype of neoplasms. This provides the rationale for the use of chelating agents for increasing sensitivity of resistant neoplasms to cytostatics.

Key words: macro- and microelements; Walker 256 carcinoma; metallothionein-1; ceruloplasmin, ferritin, transferrin, myeloperoxidase, matrix metalloproteinases.

REFERENCES

- Baudino AT. Targeted cancer therapy: the next generation of cancer treatment. *Curr Drug Discov Technol.* 2015;12(1):3-20.
- Nikolaou M, Pavlopoulou A, Georgakilas AG, and Kyrodimos E. The challenge of drug resistance in cancer treatment: a current overview. *Clin Exp Metastasis.* 2018;35(4):309-18.
- Nedeljković M, Damjanović A. Mechanisms of chemotherapy resistance in triple-negative breast cancer-how we can rise to the challenge. *Cells.* 2019;8(9):1-32.
- Li Y, Gao X, Yu Z, Liu B, Pan W, Li N. Reversing multidrug resistance by multiplexed gene silencing for enhanced breast cancer chemotherapy. *ACS Appl Materials Interfaces.* 2018; 10(18): 15461-6.
- Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin.* 2019; 69(1):7-34.
- Guengerich FP. Introduction to Metals in Biology 2018: Copper homeostasis and utilization in redox enzymes. *J Biol Chem.* 2018;293(13): 4603-5.
- Chekhun VF, Lozovska YV, Burlaka AP, Lukyanova NY, Todor IN, and Naleskina L A. Peculiarities of antioxidant system and iron metabolism in organism during development of tumor resistance to cisplatin. *Exp Oncol.* 2014;36(3):196-201
- Lozovska YuV, Naleskina LA, Zadvorniy TV, Andrusishina IM, Zhulkevych IV, Stakhovskiy EO, Kunska LM, Lukianova NYu. Relationship aggressiveness of prostate cancer with tumor-associated serum markers. *Fiziol Zh.* 2019;65(6):70-80.
- Khan AA, Alsahli MA, Rahmani AH. Myeloperoxidase as an active disease biomarker: Recent biochemical and pathological perspectives. *Med Sci.* 2018;33:6(2):1-21.
- Chen SH, Chang JY. New insights into mechanisms of cisplatin resistance: From tumor cell to microenvironment. *Int J Mol Sci.* 2019;20(17): 4136.
- Rahmatm Nosrati, Sorayya Kheirouri, Ramin Ghodsi, Habib Ojaghi. The effects of zinc treatment on matrix metalloproteinases: A systematic review. *J Trace Elements Med Biol.* 2019;56:107-15.
- Andrusishina IM, Lampeka OG, Golub IO, et al. Estimation of the damage to the professional community in professional contingents for the additional method of atomic energy spectroscopy from inductively coupled plasma. *UkrTsNMI and the PCR of the registry No. 72- K.: Avitsen* 2014: 60. [Ukrainian].
- Burlaka AP, Sydorik CP. Radical forms of acid and nitrogen oxides during the fat process. *K.: Naukova Dumka.* 2006:228. [Ukrainian].
- Schierwagen C, Bylund-Fellenius AC, Lundberg C. Improved method for quantification of tissue PMN accumulation measured by myeloperoxidase activity. *J Pharmacol Methods.* 1990;23(3):179-86.
- Solovyeva NI, Ryzhakova OS. Methods for determining the activity of matrix metalloproteinases. *Clin Lab Diagnostics.* 2010;2:17-21. [Russian].
- Trapani V, Luongo F, Arduini D, Wolf FI. Magnesium modulates doxorubicin activity through drug lysosomal sequestration and trafficking. *Chem Res Toxicol.* 2016;29(3):317-22.
- Kim SW, Lee YJ, Chung JW, et al. A higher ratio of serum calcium to magnesium is associated with aggressive clinicopathological characteristics in the patients who underwent radical prostatectomy. *Korean J Urol Oncol.* 2018;16(1):25-31.
- Samina Alam, Shannon L Kelleher. Cellular mechanisms of zinc dysregulation:A perspective on zinc homeostasis as an etiological factor in the development and progression of breast cancer. *Nutrients.* 2012;4:875-903.
- Carpene E, Andreani G, Isani G. Metallothionein functions and structural characteristics. *J Trace Elements Med Biol.* 2007;21:35-9.
- Pekarik V, Gumules J, Masarik M, et al. Prostate cancer, miRNAs, metallothioneins and resistance to cytostatic drugs. *Curr Med Chem.* 2013;20(4): 534-44.
- King JC, Cousins RJ; edited by Shils ME. Shike M, Ross AC, et al. Zinc. In: *Modern Nutrition in Health and Disease* (10th ed.). Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkin.2005; 271-85.
- Mel'nikova NB, Volkov AA, Kononova SV, Krainova TA, Efremova LM, Anastasiev VV. Doxorubicin complexes with copper ions of the active center of ceruloplasmin. *Pharmaceutical Chem J.* 2006;40(5):284-8.
- Sorokina LV, Boichuk LV, Melnikov OR. Peculiarities of the antioxidant system of blood plasma in mice with highly angiogenic Lewis lung carcinoma. *Rep Nat Acad Sci Ukr.* 2012;1:174-9.
- Maryam Shabani, Mohsen Ani, Ahmad Movahedian, Seyed Ziyae Aldin Samsam Shariat. Kinetic investigation of myeloperoxidase upon interaction with copper, cadmium, and lead ions. *Iran Biomed J.* 2011;15(3):107-12.
- Catherine A Parr-Sturgess, Claire L Tinker, Claire A Hart, Michael D, et al. Modulates zinc metalloproteinase-dependent ectodomain shedding of key signaling and adhesion proteins and promotes the invasion of prostate cancer epithelial cells. *Mol Cancer Res.* 2012;10(10):1282-93.

Матеріал надійшов до редакції 02.06.2020