

ЗМІНА МОРФОСТРУКТУРНИХ ХАРАКТЕРИСТИК ТА МЕТАБОЛІЧНОГО ПРОФІЛЮ КАРЦИНОСАРКОМИ УОКЕР-256 ПІД ВПЛИВОМ ЕКЗОГЕННОГО ЛАКТОФЕРИНУ

Л.А. НАЛЄСКИНА¹, Н.Ю. ЛУК'ЯНОВА¹, Ю.В. ЛОЗОВСЬКА¹, І.М. ТОДОР¹,
І.М. АНДРУСІШИНА², Л.М. КУНСЬКА¹, В.Ф. ЧЕХУН¹

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

² ДУ «Інститут медицини праці імені Ю.І. Кундієва НАМН», Київ 01033, Україна

E-mail: Naleskina@ukr.net¹, nataluk10@gmail.com¹, lozovskaya.2012@ukr.net¹, andrusyshyna.in@gmail.com²,
luba110@ukr.net¹, chekhun@onconet.kiev.ua¹

На сьогодні численними дослідженнями експериментальної онкології доведено, що результати фундаментальних розробок, проведених на сучасному методичному рівні, можуть слугувати вагомим підґрунтям для використання у клінічній практиці. Визначити в системі *in vivo* на моделі карциносаркоми Уокер-256 гальмуючий ефект екзогенного лактоферину (ЛФ) у дозах 1 та 10 мг/кг маси тварин, безпечність його застосування, особливості змін цитоархітектоніки пухлинної тканини, порушення показників енергетичного обміну та есенційного гомеостазу на рівні пухлини та організму, а також асоціативні зв'язки і механізми, що обумовлюють зазначені перебудови. Використані безпорідні щури з перещепленою карциносаркомою Уокер-256, яким внутрішньоочередово 9 разів вводили екзогенний ЛФ у дозах 1 та 10 мг/кг маси тварин, та тварини, що слугували контролем. Застосовано морфологічний метод дослідження для оцінки змін цитоархітектоніки пухлин під впливом ЛФ. Для визначення безпечності застосування екзогенного ЛФ використано цитогенетичний метод *Hayashi*. Вміст есенційних елементів визначали за допомогою методу атомно-емісійної спектроскопії, визначення вмісту показників енергетичного обміну здійснювали за допомогою атомно-біохімічного та імуноферментного аналізатора. Встановлено, що екзогенний ЛФ у досліджених дозах призводить до гальмування росту карциносаркоми Уокер-256, проявом чого є односпрямовані зміни їх архітектоніки: сегрегація пухлинних клітин, пікноз, гіперхроматоз ядер, явища некробіозу, некроз, і як наслідок зменшення загальної кількості пухлинних клітин, з боку судин — делятація, потоншення стінок, крововиливи. Відбуваються зміни біоенергетичного фенотипу пухлинних клітин: зниження вмісту глюкози та лактату. Під впливом ЛФ порушується гомеостаз есенційних елементів, зокрема кальцію, заліза, цинку у пухлинній тканині та плазмі крові. На підставі проведених зіставлень щодо порушень під впливом екзоген-

ного ЛФ цитоархітектоніки пухлин, зокрема у судинному руслі, та визначеними змінами їх метаболічного профілю з'ясовано механізми, які можуть обумовлювати зазначену дію ЛФ.

Ключові слова: карциносаркома Уокер-256, екзогенний лактоферин, цитоархітектоніка пухлин, енергетичний обмін, глюкоза, лактат, есенційні елементи.

Вступ. Не викликає сумніву той факт, що ні одне інноваційне вирішення проблеми не може бути започатковане без численних фундаментальних випробувань, які мають за мету не лише отримання кінцевого результату, але і глибоке вивчення тих взаємозв'язаних ланок у ланцюгу складних механізмів, що лежать в його основі.

У медицині, зокрема в онкології, основою для вирішення питання щодо клінічного значення будь-якої речовини, яка передбачається як потенційний засіб для застосування, є результати експериментальних досліджень в системі *in vivo* [1, 2]. Оскільки в останнє десятиріччя в літературі з'являється все більше публікацій про те, що одним із ключових факторів змін метаболічних процесів в організмі хворого на рак є порушення гомеостазу есенційних елементів, увага багатьох дослідників зосереджена на вивченні тих основних металозв'язуючих протеїнів, які здійснюють як депонуючу функцію, так і є транспортерами катіонів [3–5]. Найбільш широким спектром функціональної активності серед протеїнів-регуляторів обміну есенційних елементів, зокрема залізовв'язуючих, таких як феритин, трансферин, гепсидин, володіє лактоферин (ЛФ) [6, 7]. Так, ЛФ відіграє важливу роль у здійсненні процесів проліферації, інвазії, міграції та апоптозу, а також характеризується імуномодулюючою, протизапальною та протипухлинною дією [8, 9]. Даніми експериментальних досліджень, існуючими

© Л.А. НАЛЄСКИНА, Н.Ю. ЛУК'ЯНОВА,
Ю.В. ЛОЗОВСЬКА, І.М. ТОДОР, І.М. АНДРУСІШИНА,
Л.М. КУНСЬКА, В.Ф. ЧЕХУН, 2020

в літературі, та власними спостереженнями в системі *in vitro* показано вплив ЛФ на процеси проліферації, інвазивні та адгезивні властивості пухлинних клітин раку молочної та передміхурової залози людини [10, 11].

Існують повідомлення щодо модулюючої ролі екзогенного ЛФ при деяких гістогенетичних формах злоякісних новоутворень, підтверджених результатами фундаментальних досліджень [12, 13]. В аспекті цього проводяться пошукові дослідження, спрямовані на отримання та удосконалення екзогенних форм ЛФ для тестування їх на токсичність та можливість застосування для оцінки протипухлинної дії [13, 14].

Мета нашого дослідження полягала у визначенні в системі *in vivo* на моделі карциносаркоми Уокер-256 гальмуючого ефекту ЛФ у дозі 1 та 10 мг/кг маси тварини, безпечності його застосування, особливостей змін цитоархітекtonіки пухлинної тканини, порушень показників енергетичного обміну та есенційного гомеостазу на рівні пухлини та організму, а також асоціативних зв'язків і механізмів, що обумовлюють зазначені перебудови.

Матеріали та методи. Для порівняння отриманих даних усі тварини поділені на три групи. До першої увійшли інтактні тварини, до другої (дослідна група 1) – щури з перещепленою карциносаркомою Уокер-256, до третьої (дослідна група 2) – тварини з перещепленою карциносаркомою Уокер-256, яким внутрішньоочередно 9 разів вводили ЛФ у дозах 1 та 10 мг/кг тварини. Перше введення ЛФ проводили на третю добу після перещеплення пухлини, а наступні вісім ін'єкцій тварини отримували кожного дня. Вибір обраних доз ЛФ обумовлено результатами попередніх досліджень протипухлинного ефекту цього протеїну на моделях тварин із карциномою Ерліха та гепатоми 22а [15, 16]. Усі дослідження проведені в експоненційній фазі росту перещепленої пухлини. Тварин виводили з експерименту шляхом декапітації після ін'єкційного введення седативного засобу.

В експериментах використано екзогенний рекомбінантний людський лактоферин, створений та наданий колегами Інституту фізіології НАН Білорусі в рамках спільного проекту, що фінансується НАН України та НАН Біло-

русі «Молекулярно-біологічні ефекти та механізми впливу лактоферину на пухлинні клітини в системах *in vitro* та *in vivo*» – Контракт № 07-04-15. Згідно ЕПР-досліджень, використаний лактоферин не містить зв'язані (парамагнітні) іони заліза.

Морфологічні дослідження проводили на пухлинній тканині (ПТ) тварин з карциносаркомою Уокер-256, оброблених за стандартними умовами гістологічної техніки із наступним забарвленням парафінових зрізів гематоксиліном та еозином. У цих же препаратах досліджено зміни морфометричних параметрів клітин під дією ЛФ. Площу визначали за загальновідомою формулою обчислення по периметру клітини чи ядра. Морфологічні та морфометричні дослідження здійснені з використанням мікроскопу Primo Star (Carl Zeiss) з програмним забезпеченням AxioVision Rel. 4.7.

Крім того, визначали ДНК-статус пухлинних клітин із застосуванням методу проточної цитофлуориметрії з подальшим аналізом даних у програмі ModFit V3.2. Алгоритм підготовки проб для дослідження розподілу клітин за фазами клітинного циклу був наступним. Вихідна концентрація клітин становить $2 \cdot 10^6$ клітин на пробу. У проби додавали 2 мл ФСБ, осаджували (1500 об/хв, 5 хв), надосадову рідину зливали, додавали 150 мкл 0,1%-ного бичачого сироваткового альбуміну. Далі по краплинах з постійним перемішуванням в усі проби додавали 4 мкл 70%-ного етанолу та інкубували 1 год за температури 4 °С, осаджували шляхом центрифугування (1500 об/хв, 5 хв), надосадову рідину зливали. В усі проби додавали 2 мл фізрозчину, осаджували при центрифугуванні (1500 об/хв, 5 хв), надосадову рідину зливали. Далі додавали 10 мкл РНК-ази та інкубували 40 хв за 37 °С. В усі проби, крім контролю, додавали 30 мкл пропідіум йодиду та інкубували 30 хв за температури 37 °С, потім ще 30 хв за кімнатної температури в темряві, додавали 2 мл ФСБ, осаджували шляхом центрифугування (1500 об/хв, 5 хв), надосадову рідину зливали. Готові проби фіксували у 600 мкл 0,1%-ного розчину параформальдегіду [17].

Для оцінки безпечності застосування ЛФ використано цитогенетичний метод Hayashi [18, 19]. Дослідження проведено на еритроци-

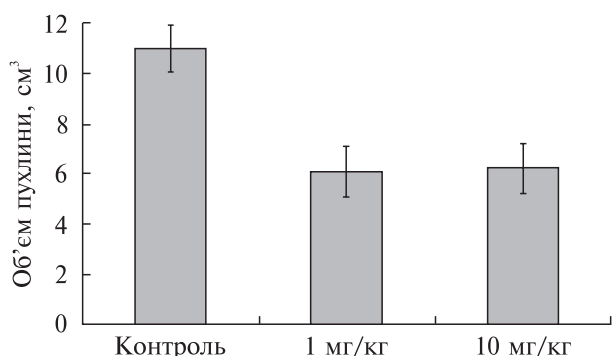


Рис. 1. Вплив екзогенного ЛФ на ріст карциносаркоми Уокер-256

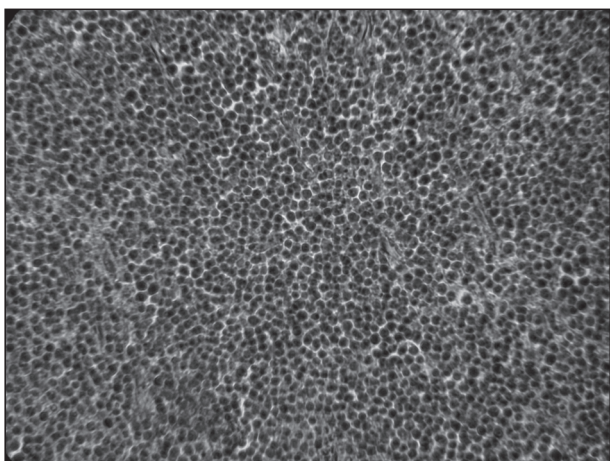


Рис. 2. Карциносаркома Уокер-256 (контроль). Забарвл. гематоксилін та еозин. Зб. $\times 100$

тах кісткового мозку (КМ) тварин, який отримували із стегнової кістки і готували суспензію у середовищі RPMI. Після цього визначали концентрацію клітин і робили мазки. Цитологічні препарати підсушували при кімнатній температурі, фіксували у метанолі 2 хв і фарбували акридиновим помаранчевим (12,5 мг/мл фосфатного буферу рН = 6,4–6,5) впродовж 1 хв. У еритроцитах КМ досліджували мікроядра (МЯ) та співвідношення клітин еритроїдного ряду: нормохроматофільних (НХЕ) та поліхроматофільних еритроцитів (ПХЕ). Підрахунки МЯ проводили на флуоресцентному мікроскопі Micros MC 300 при загальному збільшенні приладу $\times 400$ шляхом визначення кількості клітин з МЯ серед 1000 ПХЕ. Співвідношення ПХЕ та НХЕ як показника цитотоксичного ефекту розраховували на 2000 клітин. Слід

значити, що акридиновий помаранчевий забарлював ПХЕ у помаранчевий колір, НХЕ – у зелений, МЯ – у яскраво-жовтий.

Вміст есенційних елементів: цинку (Zn), кальцію (Ca), заліза (Fe) у ПТ та плазмі крові (ПК) тварин визначали за допомогою методу атомно-емісійної спектроскопії з індуктивно зв'язаною плазмою (АЕС-ІЗП) на приладі Optima 2100 DV фірми Perkin-Elmer (США) [20]. Для визначення елементного складу у ПК брали 0,5 мл проби, до якої додавали 4,5 мл 10%-ного розчину HNO_3 (Merck) та піддавали центрифугуванню впродовж 20 хв при 5 000 об/хв. Для визначення зазначених есенційних елементів у ПТ брали 0,1 г проби та 3,0 мл конц. HNO_3 (Merck) і проводили мінералізацію у мікрохвильовій печі MWS-2 Berghoff.

Визначення вмісту показників енергетичного обміну (глюкози та лактату) у ПК та ПТ тварин здійснювали за допомогою автоматичного біохімічного та імуноферментного аналізатора Chem Well 2900 (USA). Супернатант з ПТ готували у фізіологічному розчині у співвідношенні 1/3. Усі зразки центрифугували при 1000 об/хв впродовж 15 хв та зберігали при -20°C .

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 t-критерію Ст'юдента. Коефіцієнт кореляції обчислювали за Пірсоном. Відмінності вважали достовірними при $p < 0,05$.

Результати досліджень та їх обговорення. Аналіз експериментальних досліджень в системі *in vivo* показав, що ЛФ, введений у дозі 10 мг/кг маси, гальмував ріст карциносаркоми Уокер-256 на 44,5 % ($p < 0,05$) порівняно із пухлинами тварин контрольної групи (рис. 1). Аналогічні дані отримані при застосуванні ЛФ у дозі 1 мг/кг, яка призводила до затримки росту пухлини на 43,6 % ($p < 0,05$).

Для об'єктивізації змін у пухлинній тканині, які призводять до гальмуючого впливу екзогенного ЛФ, проведено цитоморфологічне вивчення архітектоніки пухлин тварин з карциносаркомою Уокер-256 після 9-разового внутрішньоочеревинного введення шурам цього чинника у дозах 1 мг/кг та 10 мг/кг на вагу

тварини. Мікроскопічне дослідження гістологічних препаратів пухлин цих тварин проведено у порівняльному аспекті: у шурів, яким вводили екзогенний ЛФ, та тих, які не отримували ЛФ і слугували контролем. Дослідження карциносарком контрольної групи показало, що у всіх тварин пухлинні клітини розташовувались щільно, компактно по відношенню одна до одної, у вигляді великих пластів. Клітини характеризувались незначно вираженим поліморфізмом, мали округлу форму, були невеликих розмірів. Основну частину займали центрально розташовані, інтенсивно забарвлені, гіперхромні з компактно упакованим хроматином мономорфні ядра. Ядерця не визначались. Цитоплазма була скудною, гомогенною, оксифільною. Осередків некрозу та некробіотичних змін небагато, частіше вони зустрічались у центральній частині пухлини. Значні за розмірами ділянки пухлинних клітин були розділені між собою ледь помітними прошарками сполучнотканинних волокон. Судини у карциносаркомі Уокер-256 визначались у незначній кількості, в основному капілярного типу, більшість по периферії пухлини (рис. 2).

Під впливом внутрішньоочеревинно уведеного тваринам з карциносаркомою Уокер ЛФ у дозі 1 мг/кг у пухлинній тканині на фоні збереженої її загальної структури спостерігалась сегрегація пухлинних клітин порівняно із компактним їх розташуванням у контролі (рис. 3).

Збільшувалась кількість осередків з ознаками некробіозу, некрозу. Вони спостерігались як у центральній частині пухлини, так і по периферії. З'являлись делятовані судини, виповнені кров'ю.

При збільшенні дози ЛФ до 10 мг/кг зміни у пухлинній тканині мали односпрямований характер з тими, що були визначені при морфологічному дослідженні пухлин тварин, які зазнали впливу ЛФ у дозі 1 мг/кг. У той же час дія ЛФ у дозі 10 мг/кг призводила до дещо більш виражених змін при збереженій загальній архітектоніці пухлини. Проявом цього у центральних та периферичних ділянках карциносаркоми Уокер-256 було більш виражене розмежування пухлинних клітин, які за розмірами виявились дещо більшими, ніж у контролі. Ядра також несуттєво збільшувались і характеризувались вираженим гіперхроматозом. Визначались об-

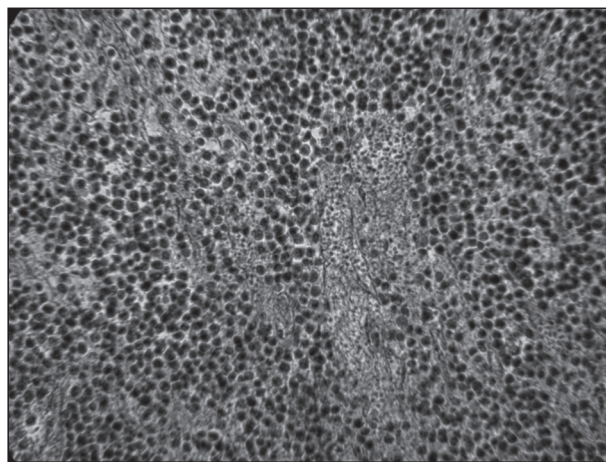


Рис. 3. Зміни у карциносаркомі Уокер-256 внаслідок дії ЛФ у концентрації 1 мг/кг. Під впливом цього чинника спостерігається сегрегація пухлинних клітин. Забарвл. гематоксилін та еозин. Зб. $\times 100$

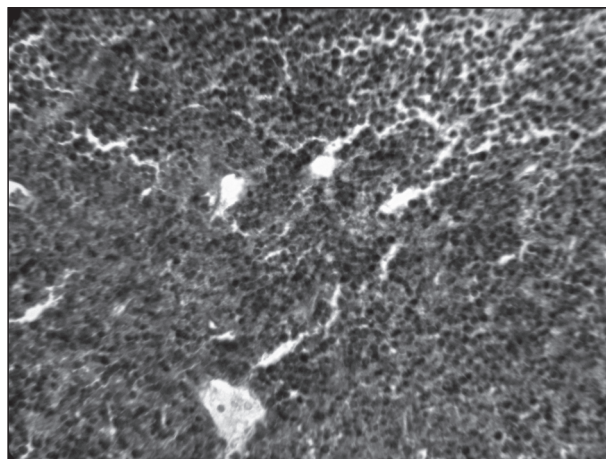


Рис. 4. Карциносаркома Уокер-256 після впливу ЛФ. Осередок пухлинних клітин з ознаками некротичних змін. Забарвл. гематоксилін та еозин. Зб. $\times 100$

ширні осередки некробіотичних та некротичних змін (рис. 4).

Оскільки останнім часом для інтерпретації результатів цитоморфологічних досліджень фахівці знов звернулись до використання доказових інформативних методів, зокрема, морфометричних та денситометричних для визначення змін розмірів та форми ядра, самої клітини, співвідношення ядра щодо клітини в цілому, нами проведено порівняльний аналіз таких морфометричних параметрів пухлинних клітин тварин з карциносаркомою Уокер-256,

як площа клітини, ядра, коефіцієнт його форми (відношення найменшого розміру до найбільшого), до і після дії ЛФ.

Узагальнені дані представлені у таблиці 1. Саме таким чином є змога отримати об'єктивні характеристики щодо клітинної атипії за показниками морфометричних параметрів самих клітин, щільності їх ядер, особливостей мітотичного режиму [21].

При аналізі величини площі ядра пухлинних клітин максимальні значення ($19,35 \pm 3,01$ мкм²) спостерігались у групі тварин, яким вводили ЛФ у дозі 10 мкг/кг, що підтверджується і при аналізі периметру ядер клітин. При цьому площа та периметр клітин в обох групах достовірно не відрізнялися від контролю. У той же час найбільший периметр ядра ($17,22 \pm 3,40$ мкм²) спостерігався у групі тварин, яким вводили ЛФ у дозі 10 мкг/кг маси тіла тварини у порівнянні з $12,15 \pm 2,56$ мкм² у контролі. Зазначені зміни можуть свідчити про порушення клітинного циклу та наростання анеуплоїдії, що підтверджується даними щодо зміни ДНК-статусу пухлинних клітин.

На сьогодні залишаються остаточно не з'ясованими молекулярні механізми дії ЛФ на ріст та проліферацію злоякіснотрансформованих клітин. Значною кількістю досліджень на клітин-

них лініях різного генезу було показано, що введення екзогенного бичачого ЛФ може призводити до зупинки клітинного циклу у фазах G0/G1, а також блокувати клітинний цикл у G1 та S фазах за рахунок синтезу протеїнів-інгібіторів клітинного циклу, p21 та p27, через мітоген активуючий протеїнкіназний шлях (MAP), а у деяких випадках активує синтез онкосупресора p53 [22–24]. Відомостей щодо змін ДНК-статусу у пухлинних клітинах в системі *in vivo* обмаль.

Власними дослідженнями у системі *in vivo* на моделі карциносаркоми Уокер-256 методом проточної цитофлуориметрії показано, що введення екзогенного ЛФ у дозах 1 мг/кг та 10 мг/кг призводило до змін ДНК-статусу пухлинних клітин. Встановлена тенденція до зниження кількості клітин у G2+M фазі та на 12 % кількості клітин у S фазі клітинного циклу, більш виражена при застосуванні цього протеїну у дозі 10 мг/кг (табл. 2).

Зазначені зміни у пухлинних клітинах досліджених тварин під впливом екзогенного ЛФ представлені також на рис. 5.

Таким чином, результати досліджень показали, що екзогенний ЛФ спричиняє дію на ДНК-статус пухлинних клітин піддослідних тварин, про що свідчить перерозподіл пухлинних клітин за фазами клітинного циклу.

Таблиця 1. Морфометричні параметри клітин карциносаркоми Уокер-256

Параметр	Доза лактоферину		
	контроль	1 мг/кг	10 мг/кг
Площа клітини, мкм ²	$50,08 \pm 15,07$	$45,18 \pm 15,47$	$52,44 \pm 19,44$
Площа ядра, мкм ²	$12,57 \pm 3,18$	$11,28 \pm 4,30$	$19,35 \pm 3,01$ *
Периметр клітини, мкм	$24,66 \pm 3,77$	$23,3 \pm 4,09$	$25,02 \pm 4,71$
Периметр ядра, мкм	$12,15 \pm 2,56$	$11,59 \pm 2,27$	$17,22 \pm 3,40$ *

Примітка. *p < 0,05 – достовірні зміни відносно значень контролю та між дослідними групами.

Таблиця 2. Зміни ДНК-статусу клітин карциносаркоми Уокер-256 під впливом екзогенного ЛФ

Доза лактоферину	G1, %	G2 + M, %	S, %
Контроль	$53,17 \pm 2,30$	$11,42 \pm 1,60$	$35,41 \pm 2,20$
1 мг/кг	$67,33 \pm 1,90$ *	$9,02 \pm 1,90$	$23,64 \pm 2,00$ *
10 мг/кг	$69,26 \pm 2,20$ *	$8,31 \pm 1,30$ *	$23,43 \pm 1,90$ *

Примітка. *p < 0,05 – достовірні зміни відносно значень контролю.

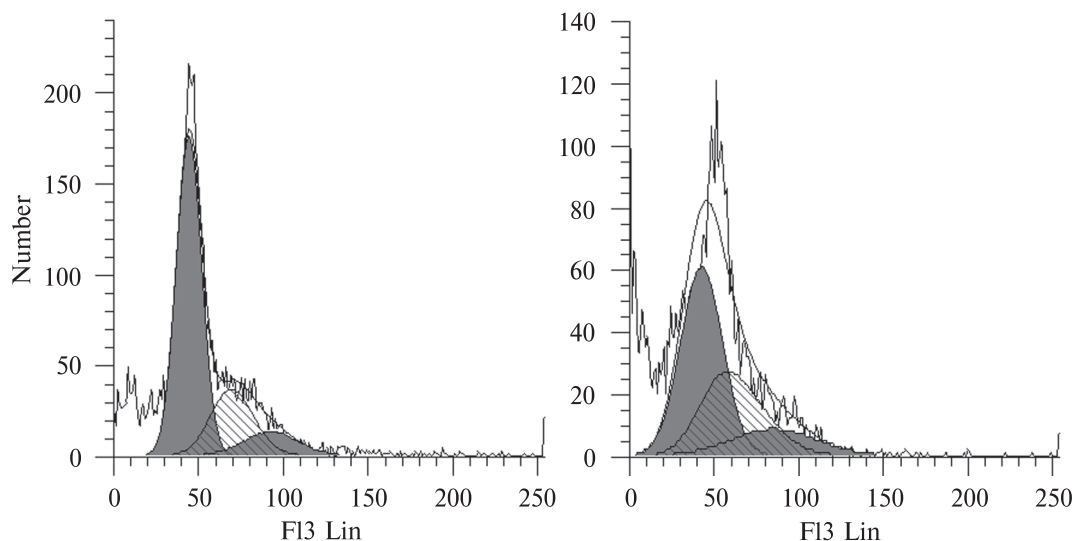


Рис. 5. Розподіл клітин за фазами клітинного циклу (проточна цитофлуориметрія)

Подальше морфологічне дослідження впливу ЛФ на архітектуру карциносаркоми Уокер-256 засвідчило, що характерними є зміни з боку судин. Збільшилась їх загальна кількість. В основному вони були значно делятовані і виповнені кров'ю (рис. 6).

Стінки судин були потоншені, і це призвело до обширних крововиливів та імбібіції оточуючих тканин еритроцитарною масою (рис. 7).

Зазначені зміни у судинах є свідченням впливу ЛФ на ендотелій кровоносних судин, що узгоджується із даними літератури [25]. Описані зміни цитоархітекtonіки в осередках карциносаркоми Уокер-256 тварин, що зазнали впливу ЛФ у дозах 1 мг/кг та 10 мг/кг, повністю асоціюються із результатами досліджень щодо протипухлинної дії цього чинника, яка проявляється гальмуванням росту пухлин при тих же дозах ЛФ. Таким чином, під впливом ЛФ, введеного тваринам з карциносаркомою Уокер-256 внутрішньоочеревинно у дозах 1 мг/кг та 10 мг/кг, відбуваються односпрямовані зміни архітекtonіки цих пухлин, які узгоджуються із даними морфометричних досліджень. Зокрема, це – сегрегація пухлинних клітин, незначне їх збільшення, гіперхроматоз та збільшення ядер, явища некробіозу та некрозу, наслідком чого є зменшення загальної кількості пухлинних клітин, делятація кровоносних судин з потоншенням їх стінок із крововиливами. Отже, встановлено цитотоксичну дію ЛФ на

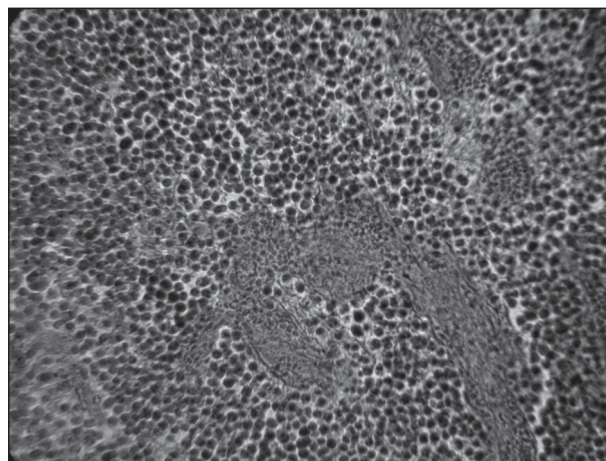


Рис. 6. Карциносаркома Уокер-256 після впливу ЛФ. У різних ділянках пухлини визначається велика кількість розширених кровоносних судин, виповнених кров'ю. Забарвл. гематоксилін та еозин. 36. ×100

пухлинні клітини та реактивні зміни з боку кровоносних судин. Дані цитоморфологічного дослідження є об'єктивним підтвердженням правомочності ствердження, що ЛФ здатний пригнічувати ріст задіяних в експерименті пухлин майже на 44 %.

Для з'ясування механізмів, що лежать в основі змін у судинах карциносаркоми Уокер-256 під впливом екзогенного ЛФ, зазначених при морфологічному вивченні, проведено серію досліджень щодо визначення основних метабо-

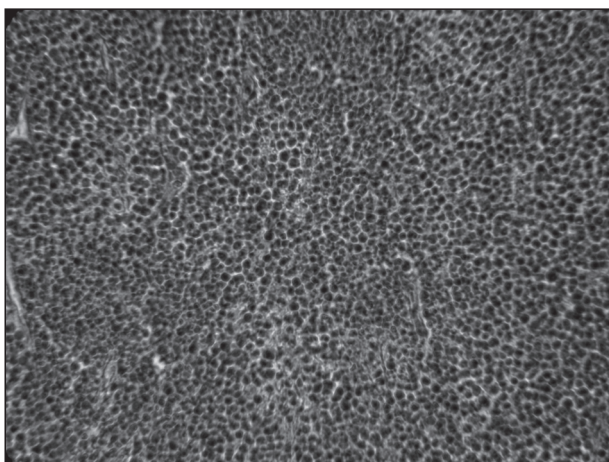


Рис. 7. Карциносаркома Уокер-256 після впливу ЛФ. Розриви тонкостінних капілярів призводять до масивних крововиливів. Забарвл. гематоксилін та еозин. 36. $\times 100$

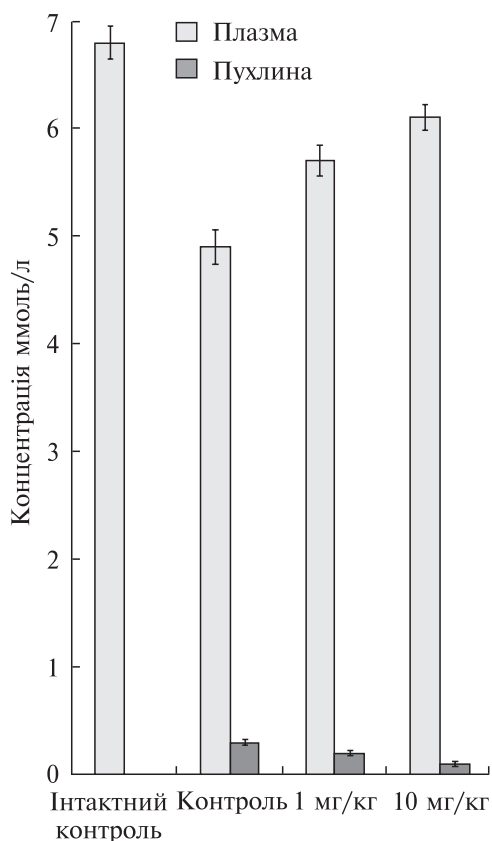


Рис. 8. Зміни вмісту глюкози у плазмі крові та пухлинній тканині тварин із карциносаркомою Уокер-256 під впливом лактоферину

лічних перебудов, які можна вважати причинно-наслідковими факторами таких порушень. У доступних нам джерелах інформації не досліджено вплив екзогенного ЛФ на ключові обмінні процеси, які можуть бути обумовлені гіпоксією, а саме – зміни метаболізму глюкози, і асоціюються із виникненням неоплазій та їх прогресією. Накопичення кінцевих продуктів метаболічного перетворення глюкози при канцерогенезі, зокрема – лактату, призводить до зсуву pH у бік закиснення, тим самим ініціюючи процеси інвазії та метастазування ракових клітин [9, 26]. Попередніми власними дослідженнями було показано, що завдяки лужним властивостям ЛФ ($pH = 8,7$) цей протеїн здатен змінювати активність деяких ферментів проантиоксидантного балансу: мієлопероксидази та церулоплазміну [27–29].

Проте, не існує відомостей щодо можливого впливу ЛФ на процеси аеробного окислення глюкози у пухлинному осередку та в організмі в цілому. У той же час показано, що зміна кислотно-лужного балансу у пухлинному осередку та набуття ним ознак вираженого «гліколітичного фенотипу» призводить до перепрограмування метаболізму глюкози та загального закиснення організму, що у свою чергу викликає порушення такої важливої його ланки в органах та тканинах, як ангіогенез [30, 31]. Використаний нами підхід для аналізу результатів дії ЛФ на архітектуру карциносаркоми Уокер-256 є цілком виправданим, оскільки відомо, що таргетування метаболізму глюкози на рівні пухлини призводить до пригнічення неоангіогенезу. Тим більше, що нещодавніми дослідженнями показано важливість визначення вмісту ключових метаболітів енергетичного обміну, оскільки вони є інформативними щодо пухлинної прогресії та ангіогенезу [31].

Саме тому, на наш погляд, було доцільно проаналізувати вплив різних доз ЛФ на показники енергетичного обміну – вмісту глюкози та лактату у ПТ та ПК тварин із карциносаркомою Уокер-256. Згідно отриманих даних, вміст глюкози у ПК тварин пухлиноносіїв був у 1,4 рази нижче, ніж у інтактних тварин, що узгоджується із концепцією щодо високої енергетичної потреби пухлини у цьому основному метаболіті вуглеводного обміну. Досить цікавим виявився той факт, що введення ЛФ

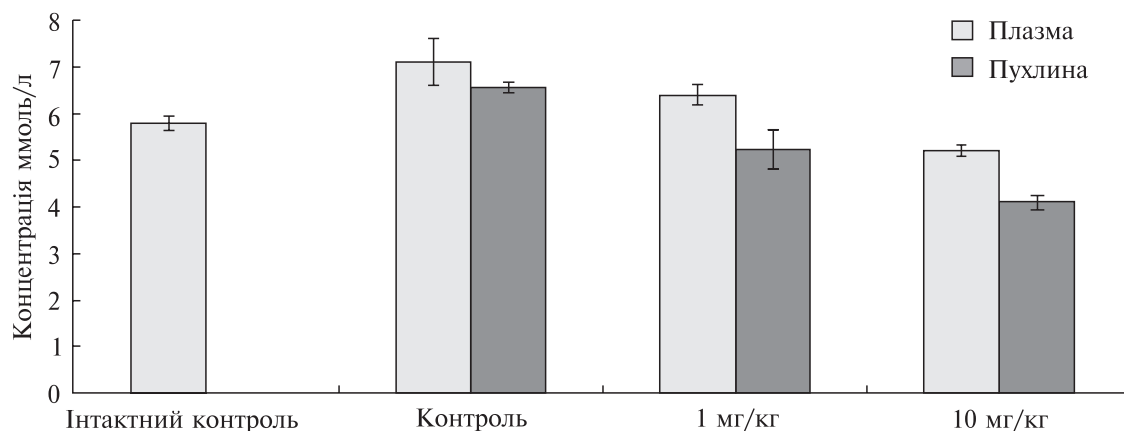


Рис. 9. Зміни вмісту лактату у плазмі крові та пухлинній тканині тварин із карциносаркомою Уокер-256 під впливом лактоферину

тваринам з карциносаркомою Уокер-256 у дозі 1 мг/кг та у 10 мг/кг призводило до зростання вмісту глюкози у плазмі крові тварин у 1,2 та 1,3 рази, відповідно (рис. 8). Поряд із цим, внаслідок впливу обраних доз ЛФ у ПТ цих тварин виявляли зниження вмісту глюкози у 1,5 та 3 рази, відповідно.

У ПК вміст лактату у інтактних тварин був у 1,2 рази нижчим, ніж у тварин із карциносаркомою Уокер-256 (рис. 9). Нами встановлено, що введення екзогенного ЛФ піддослідним тваринам у дозах 1 та 10 мг/кг призводило до зниження вмісту цього метаболіту глюкози у 1,2 та 1,4 рази, відповідно. Аналогічний характер змін лактату виявляли у клітинах карциносаркоми, а саме — його зниження із максимальним ефектом при дії ЛФ у дозі 10 мг/кг (1,5 рази).

Отримані результати власних досліджень доводять, що ЛФ у обраних дозах чинить модифікуючий ефект на метаболічний профіль карциносаркоми та організму у цілому. Найбільш виражений ефект на вміст глюкози та лактату у ПТ та ПК тварин чинить ЛФ у дозі 10 мг/кг. Зміни показників енергетичного обміну внаслідок дії ЛФ є свідченням зниження гіпоглікемічного тиску пухлини, що знаходить своє відображення у особливостях її васкуляризації, зазначених нами при морфологічному дослідженні. Власні дані асоціюються із повідомленнями в літературі щодо здатності ЛФ блокувати активність транскрипційного фактору — HIF1- α в епітеліальних клітинах та клітинах ендотелію судин. Це підтверджено в ек-

периментах на моделях РМЗ та РПЗ мишей, в яких показано, що механізм такої дії полягає у пригніченні у пухлинному осередку неогенезу [32, 33].

Іншим механізмом, який може бути задіяний у змінах процесу васкуляризації судин, є порушення гомеостазу есенційних елементів. Раніше власними дослідженнями доведено, що ЛФ завдяки своїм хелатуючим властивостям здатен змінювати есенційний гомеостаз в організмі пухлиноносія та через цей механізм впливати на функціонування системи про/антиоксидантного балансу [27]. Тому, нами було акцентовано увагу на характері перерозподілу тих мікроелементів, які можуть ініціювати розвиток нових судин та впливати на їх проникність безпосередньо у пухлинному осередку, оскільки ступінь васкуляризації неоплазм є важливим прогностичним фактором прогресування злоякісного процесу.

Нещодавніми дослідженнями встановлено, що перерозподіл концентрацій цинку, кальцію та заліза при різних видах патології супроводжується змінами процесів проліферації, секреції, транспорту іонів і трансдукції сигнальних шляхів [34, 35]. Поряд із цим показано, що суттєві зміни їх вмісту у різних тканинах виникають при певних патофізіологічних синдромах, таких як інфаркт міокарду, печінкова та ниркова недостатність і неопластичні процеси [36–38]. На сьогодні доведено важливу роль цинку у регуляції активності ендотеліальних клітин судин через цинк-чутливий рецеп-

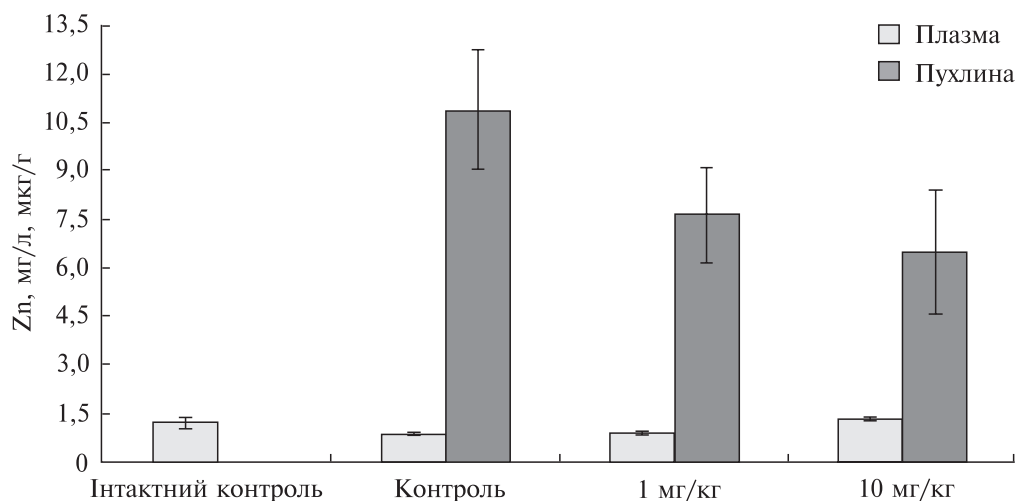


Рис. 10. Зміни вмісту цинку у плазмі крові та пухлинній тканині тварин із карциносаркомою Уокер-256 під впливом лактоферину

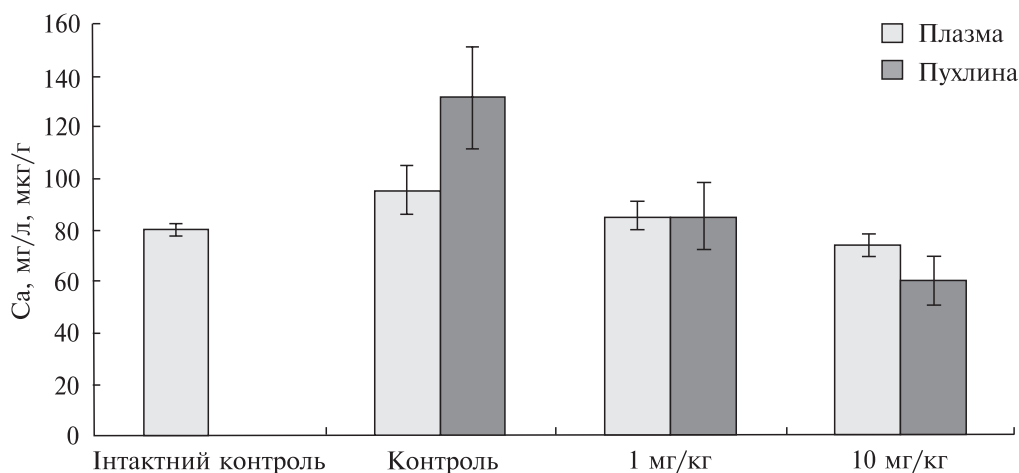


Рис. 11. Зміни вмісту кальцію у плазмі крові та пухлинній тканині тварин із карциносаркомою Уокер-256 під впливом лактоферину

тор ZnR /GPR39. Було показано, що цей рецептор задіяний у механізмах активації чи інгібування ангиогенезу, формуванні судинного тону (простагландини, синтаза оксиду азоту-3) та процесах запалення в ендотеліальних клітинах (оксигеназа-1, селектин L, IL-10) [39]. Так, на прикладі культури ендотелію людини HCAEC було виявлено, що додавання цинку у культуральне середовище призводило до зміни профілю експресії генів, що задіяні у активації судинної функції: підвищення рівня експресії vascular endothelial growth factor A (VEGFA) – глікозилюваного мітогену, який діє на ріст ендотеліаль-

них клітин та сприяє їх міграції та водночас інгібує апоптоз. Крім того, виявлено, що збільшення концентрації цього мікроелементу також впливає на експресію platelet-derived growth factor-receptor (PDGFRA), що індукує синтез тромбоцитів та водночас слугує мітогенним фактором для клітин мезенхімального походження. Поряд із цим, встановлено, що цинк приймає участь у регуляції судинного тону через ініціацію експресії генів PTGIS та NOS3, які регулюють просвіт та еластичність судин [40].

Власними експериментальними дослідженнями на моделі карциносаркоми Уокер-256

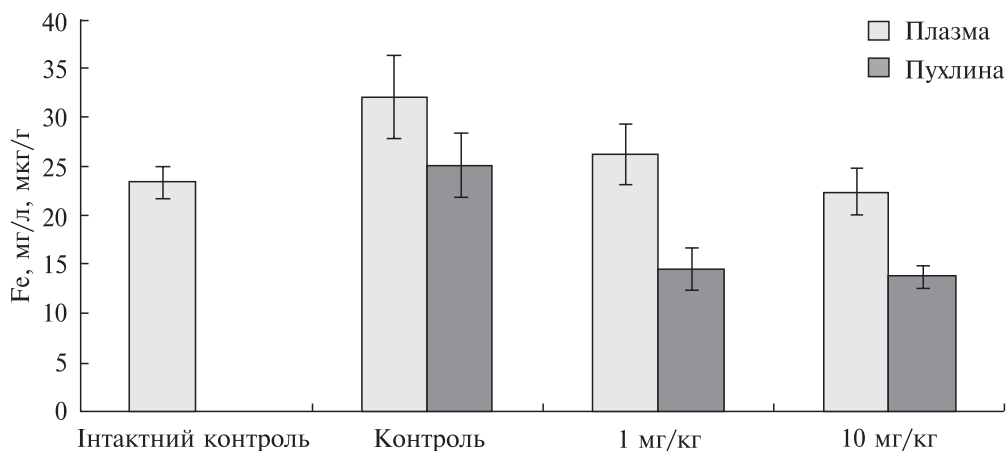


Рис. 12. Зміни вмісту заліза у плазмі крові та пухлинній тканині тварин із карциносаркомою Уокер-256 під впливом лактоферину

показано, що при введенні ЛФ у дозах 1 та 10 мг/кг відбувається зниження вмісту цинку у ПТ на фоні збільшення у ПК цих тварин (рис. 10).

Слід зазначити, що максимальне зниження цього есенційного елементу у ПТ (1,6 рази) відбувалось при дії ЛФ у дозі 10 мг/кг, у той час як у ПК – вміст його зростає у 1,7 рази, наближаючись до значень інтактних тварин ($p < 0,05$). Ці дані дають підстави вважати, що різноспрямована природна корекція вмісту цинку у ПТ та ПК тварин внаслідок дії ЛФ може бути одним із факторів, що призводить до блокування процесу пухлинного ангиогенезу через рецептор ZnR /GPR39, при цьому не впливаючи на цей механізм при формуванні кровоносних судин в організмі у цілому (рис. 10).

Поряд із цим відомо, що більшість ангиогенних пептидних факторів (VEGF, bFGF та інші) продукуються ендотеліальними клітинами через кальцій-залежний механізм. Даний процес потребує підвищення концентрації цього мікроелемента у цитозолях клітин шляхом надходження із оточуючих тканин [41].

Власними дослідженнями встановлено, що під впливом екзогенного ЛФ у дозі 1 та 10 мг/кг у ПТ піддослідних тварин відбувається зниження вмісту кальцію порівняно із контролем у 1,6 та 2,2 рази, відповідно (рис. 11). У ПК ці зміни менш виражені (у 1,1 та 1,2 рази, відповідно).

Крім того, в літературі розглядається ще один можливий механізм впливу на ангиогенез пухлини через молекулу ліпокалін-2 (LCN2),

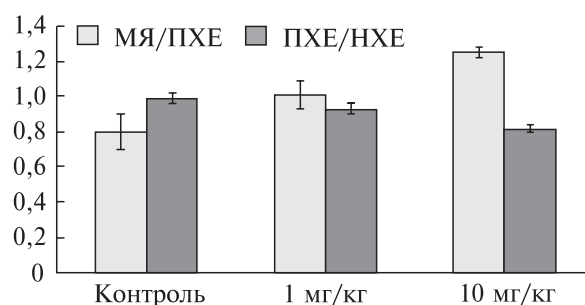


Рис. 13. Зміни кількості МЯ (%) та співвідношення ПХЕ/НХЕ у КМ тварин з карциносаркомою Уокер-256 під впливом різних концентрацій екзогенного ЛФ

яка є посередником індукції проангіогенного фактору VEGF. Активація цієї молекули відбувається за рахунок збільшення внутрішньоклітинного вмісту заліза, а при його зменшенні спостерігається протилежний ефект, що може позначитись на змінах кількості судин та їх проникності [42, 43].

Результати власних досліджень свідчать, що ЛФ у дозах 1 та 10 мг/кг призводить до зниження вмісту заліза у ПТ у майже однакових межах (1,8 та 2 рази), порівняно із контролем. У ПК тварин також відбувається зменшення цього показника у 1,3 та 1,4 рази по відношенню до контролю. При дозі 10 мг/кг зниження вмісту заліза наближено до значень у інтактних тварин (рис. 12).

Отже, дослідження морфологічних змін у пухлинному осередку тварин із карциносаркомою Уокер-256, зокрема з боку судинного

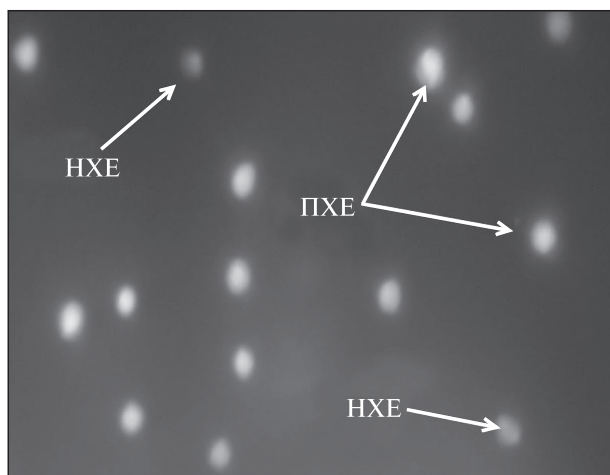


Рис. 14. Еритроцити КМ групи тварин з карциносаркомою Уокер-256 після введення ЛФ у концентрації 10 мг/кг. Забарвлення акридиновим помаранчевим. 36. $\times 400$

русла, та показників енергетичного обміну у сукупності із особливостями перерозподілу досліджених есенційних елементів на рівні пухлини та організму, дозволили висунути думку про модифікуючий ефект ЛФ на ті механізми, які можливо обумовлюють пригнічення гліколітичного навантаження у ПТ. Певно, це і призводить до порушень функціонування ендотелію кровеносних судин у ПТ.

Враховуючи встановлену нами пригнічуючу дію екзогенного ЛФ на ріст карциносаркоми Уокер-256 та зміни цитоархітекtonіки цих пухлин, ми вирішили дослідити ступінь безпечності цього залізов'язуючого протеїну на еритроїдні клітини кісткового мозку (КМ), оскільки КМ є індикатором порушень при дії чинників різної природи. Класичним методом оцінки безпечності будь-якої речовини є визначення її генотоксичного впливу *in vivo* за Hiroshi. Метод базується на дослідженні змін співвідношення поліхроматофільних (ПХЕ) та нормохроматофільних еритроцитів (НХЕ) у КМ тварин. Зсув співвідношення ПХЕ/НХЕ у КМ є показником цитотоксичної дії, а збільшення кількості мікроядер клітин (МЯ) — генотоксичної [44, 45].

У літературі до цього часу практично не зустрічаються дослідження щодо можливих механізмів токсичного впливу ЛФ у системі *in vivo*. Власними дослідженнями на моделі карцино-

саркоми Уокер-256 показано, що ЛФ у дозах 1 та 10 мг/кг не призводив до суттєвих змін кількості МЯ та співвідношення ПХЕ/НХЕ (рис. 13).

Тестування гено- та цитотоксичного впливу екзогенного ЛФ у досліджених дозах не виявило достовірних змін в морфології клітин еритроїдного ряду КМ. Лише простежувалась незначна тенденція до зсуву співвідношення ПХЕ/НХЕ після введення екзогенного ЛФ у дозі 10 мг/кг (рис. 14).

У деяких експериментальних роботах у системах *in vitro* доведено, що одним із можливих механізмів генотоксичного впливу ЛФ на ДНК можуть бути двониткові розриви цієї молекули внаслідок збільшення фосфорилювання гістону H2A.X. Однак, нами було показано, що обрані концентрації ЛФ не викликають порушення стабільності геному клітин еритроїдного ряду КМ тварин із карциносаркомою Уокер-256. Крім того, на відміну від інших чинників, ЛФ має протекторні властивості від пошкоджуючої дії АФК. Отже, у даному випадку цей залізов'язуючий протеїн може виконувати антиоксидантний захист організму від руйнуючого впливу вільнорадикальних сполук. Незначний зсув співвідношення ПХЕ/НХЕ у бік незрілих еритроцитів підтверджує той факт, що ЛФ у незначній мірі може інгібувати еритропоєз. Проте, після введення максимальних концентрацій ЛФ співвідношення ПХЕ/НХЕ залишались у межах контрольних значень.

Незважаючи на деякі зміни архітекtonіки, показників метаболізму глюкози та гомеостазу есенційних елементів у ПТ та ПК тварин з карциносаркомою Уокер-256 під впливом екзогенного ЛФ у обраних дозах, цей чинник виявився не токсичним при тестуванні на клітинах КМ, що дає підстави стверджувати про безпечність його застосування і дозволяє зробити припущення про можливість використання в якості природного модифікатора пухлинного процесу.

Висновки. На моделі карциносаркоми Уокер-256 показано, що дія ЛФ, введеного внутрішньоочеревинно, у дозах 1 та 10 мг/кг маси, гальмує ріст пухлин на 43,6 і 44,5 % ($p < 0,05$), відповідно, порівняно із пухлинами тварин контрольної групи. Встановлено, що під впливом різних доз ЛФ відбуваються односпрямовані зміни архітекtonіки досліджених

пухлин, а саме: сегрегація пухлинних клітин, пікнотичні зміни, гіперхроматоз ядер, явища некробіозу та некрозу, наслідком чого є зменшення загальної кількості пухлинних клітин, спостерігаються делятація кровоносних судин з потоншенням їх стінок та крововиливи. Отримані дані є об'єктивним підтвердженням пригнічуючої дії цього чинника. Показано, що дія ЛФ, особливо у дозі 10 мг/кг, викликає зміни «біоенергетичного фенотипу» пухлин, а саме – зниження вмісту глюкози та лактату, які можуть свідчити про гальмування реакцій анаеробного гліколізу, що також позначається на відповідних показниках плазми крові. Встановлено, що у тварин з карциносаркомою Уокер-256 екзогенний ЛФ у обраних дозах здатен впливати на гомеостаз есенційних елементів: знижувати вміст кальцію, заліза у пухлинній тканині та плазмі крові і водночас різноспрямовано діяти на вміст цинку у цих тканинах. З'ясовано існування різних механізмів, які можуть обумовлювати зміни цитоархітектоніки карциносаркоми Уокер-256, зокрема у судинному руслі, на підставі їх зіставлення із особливостями метаболічного профілю пухлинних клітин. Показано відсутність генотоксичних змін щодо клітин кісткового мозку тварин з карциносаркомою Уокер-256 при застосуванні екзогенного ЛФ у обраних дозах, що доводить його безпечність і дозволяє зробити припущення про можливість застосування у якості модифікуючого фактора у клінічній практиці.

Дотримання етичних стандартів. Дослідження проведено на безпорідних щурах (самках) віварію ІЕПОР ім. Р.Є. Кавецького НАН України (м. Київ) із масою тіла 150–200 г. Тварин утримували у стандартних умовах. 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, 2008).

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Фінансування. 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) та відомчої тематики «Роль лактоферину в ініціації та перебігу найбільш розповсюджених гормонозалежних злоякісних новоутворень» (2.2.5.401, 2016–2018, 0115U005381).

CHANGE OF MORPHOSTRUCTURAL CHARACTERISTICS AND METABOLIC PROFILE OF WALKER-256 CARCINOSARCOMA UNDER THE IMPACT OF EXOGENOUS LACTOFERRIN

L.A. Naleskina, N.Yu. Lukianova,
Yu.V. Lozovska, I.M. Todor, I.M. Andrusishyna,
L.M. Kunska, V.F. Chekhun

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

SE Yu.I. Kundiev Institute of Labour Medicine,
NAMS, Kyiv 01033, Ukraine

E-mail: chekhun@onconet.kiev.ua, nataluk10@gmail.com,
Naleskina@ukr.net, lozovskaya.2012@ukr.net,
luba110@ukr.net, andrusyshyna.in@gmail.com

Numerous current investigations in the field of experimental oncology have demonstrated that the results of fundamental studies, conducted on current methodological level, may serve as a considerable foundation for their application in the clinical practice. To determine the inhibiting effect of exogenous lactoferrin (LF) in the doses of 1 and 10 mg/kg of the bodyweight of animals in the system in vivo, using Walker-256 carcinosarcoma, the safety of its application, the specificities of changes in cytoarchitectonics of the tumour tissue, the disturbance in the indices of energy exchange and essential homeostasis on the level of the tumour and organism, as well as associative connections and mechanisms, conditioning the abovementioned transformations. Outbred rats with grafted Walker-256 carcinosarcoma, which were abdominally administered exogenous LF nine times in the doses of 1 and 10 mg/kg of the bodyweight of animals, and the animals, which served as a control, were used. The morphological method of estimating the changes in cytoarchitectonics of tumours under the impact of LF was applied. The safety of applying exogenous LF was determined using the cytogenetic method of Hayashi. The content of essential elements was determined using the method of atomic-emission spectroscopy, the content of energy exchange indices was defined using the atomic biochemistry and immunoenzymatic analyzer. It was determined that exogenous LF in the investigated doses leads to inhibiting the growth of Walker-256

carcinosarcoma, which is manifested in unidirectional changes in its architectonics: the segregation of tumour cells, pycnosis, hyperchromatosis of nuclei, necrobiosis phenomena, necrosis and, as a result of the decrease in the total number of tumour cells, – dilatation of vessels, thinning of walls, hemorrhages. There are changes in the bioenergetic phenotype of tumour cells: the decrease in the content of glucose and lactate. The impact of LF leads to the impairment of the homeostasis of essential elements, including calcium, iron, zinc in the tumour tissue and blood plasma. The mechanisms, which may condition the abovementioned effect of LF, were determined based on the conducted studies of impairments in tumour cytoarchitectonics, including the vessels, under the effect of exogenous LF.

ИЗМЕНЕНИЕ МОРФОСТРУКТУРНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК И МЕТАБОЛИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ КАРЦИНОСАРКОМЫ УОКЕР-256 ПОД ВЛИЯНИЕМ ЭКЗОГЕННОГО ЛАКТОФЕРРИНА

Л.А. Налескина, Н.Ю. Лукьянова,
Ю.В. Лозовская, И.Н. Тодор, И.Н. Андрусихина,
Л. Н. Кунская, В.Ф. Чехун

Сегодня многочисленными исследованиями экспериментальной онкологии доказано, что результаты фундаментальных разработок, проведенных на современном методическом уровне, могут служить весомым основанием для использования в клинической практике. Изучить в системе *in vivo* на модели карциносаркомы Уокер-256 тормозящий эффект экзогенного лактоферрина (ЛФ) в дозах 1 и 10 мг/кг массы животных, безопасность его применения, особенности изменений цитоархитектоники опухолевой ткани, нарушение показателей энергетического обмена и эссенциального гомеостаза на уровне опухоли и организма, а также ассоциативные связи и механизмы, обуславливающие указанные перестройки. Использованы беспородные крысы с перевитой карциносаркомой Уокер-256, которым внутрибрюшинно 9 раз вводили экзогенный ЛФ в дозах 1 и 10 мг/кг массы животных, и животные, которые служили контролем. Применен морфологический метод исследования для оценки изменений цитоархитектоники опухолей под влиянием ЛФ. Для определения безопасности применения экзогенного ЛФ использован цитогенетический метод Hayashi. Содержание эссенциальных элементов изучено с помощью метода атомно-эмиссионной спектроскопии, определение содержания показателей энергетического обмена осуществляли с помощью атомно-биохимического и иммуноферментного анализатора. Установлено, что экзогенный ЛФ в исследованных дозах приводит к торможению

роста карциносаркомы Уокер-256, проявлением чего являются однонаправленные изменения архитектоники: сегрегация опухолевых клеток, пикноз, гиперхроматоз ядер, явления некробиоза, некроз, и как следствие – уменьшение общего количества опухолевых клеток; со стороны сосудов – делятация, истончение стенок, кровоизлияния. Происходят изменения биоэнергетического фенотипа опухолевых клеток: снижение содержания глюкозы и лактата. Под влиянием ЛФ нарушается гомеостаз эссенциальных элементов, в частности кальция, железа, цинка в опухолевой ткани и плазме крови. На основании сопоставления обнаруженных нарушений цитоархитектоники опухолей под влиянием экзогенного ЛФ, в частности в сосудистом русле, и изменений их метаболического профиля установлены механизмы, которые могут обуславливать указанное действие ЛФ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chamarau-Tran, T.N., Mathelin, C., Aprahamian, M., Joshi, G.P., Tomasetto, C., Diemunsch, P., and Akladios, C., Antitumor effects of lidocaine on human breast Cancer cells: an *in vitro* and *in vivo* experimental trial, *Anticancer Res.*, 2018, vol. 38, no. 1, pp. 95–105. doi: 10.21873/anticancer.12196.
2. Monti, D., Sotgia, F., Whitaker-Menezes, D., Tuluc, M., Birbe, R., Berger, A., Lazar, M., Cotzia, P., Draganova-Tacheva, R., Lin, Z., Domingo-Vidal, M., Newberg, A., Lisanti, M.P., and Martinez-Outschoorn, U., Pilot study demonstrating metabolic and antiproliferative effects of *in vivo* antioxidant supplementation with N-Acetylcysteine in Breast Cancer, *In Seminars in oncology*, 2017, vol. 44, no. 3, pp. 226–32. doi: 10.1053/j.seminoncol.2017.10.001.
3. Recalcati, S., Minotti, G., and Cairo, G., Iron regulatory proteins: from molecular mechanisms to drug development, *Antioxid Redox Signal*, 2010, vol. 13, no. 10, pp. 1593–616. doi: 10.1089/ars.2009.2983.
4. Khoo, T.C., Tubbesing, K., Pham, C., Desta, H., Sharikova, A., Barroso, M., and Khmaladze, A., Raman hyperspectral imaging of transferrin-bound iron in cancer cells. In Label-free Biomedical Imaging and Sensing (LBIS), *Inter. Soc. Opt. Photon.*, 2019, vol. 10890, doi: 10.1117/12.2511397.
5. Cutrin, J.C., Alberti, D., Bernacchioni, C., Ciambellotti, S., Turano, P., Luchinat, C., Crich, S.G., and Aime, S., Cancer cell death induced by ferritins and the peculiar role of their labile iron pool, *Oncotarget*, 2018, vol. 9, no. 46, pp. 27974. doi: 10.18632/oncotarget.25416.
6. Fernández-Menéndez, S., Fernández-Sánchez, M.L., González-Iglesias, H., Fernández-Colomer, B., López-Sastre, J., and Sanz-Medel, A., Iron bioavailability from supplemented formula milk: effect of lactoferrin

- addition, *Eur. J. Nutr.*, 2017, vol. 56, no. 8, pp. 2611–20. doi: 10.1007/s00394-016-1325-7.
7. Orlandi, R., De Bortoli, M., Ciniselli, C.M., and Vaghi, E.D., Hcpidin and ferritin blood level as noninvasive tools for predicting breast cancer, *Ann. Oncol.*, 2014, vol. 25, no. 2, pp. 352–7. doi: 10.1093/annonc/mdt490.
 8. Legrand, D., Maurier, J., A critical review of the roles of host lactoferrin in immunity, *Biometals*, 2010, vol. 23, no. 3, 365–76. doi: 10.1007/s10534-010-9297-1.
 9. Kang, Nam Mi, Cho, Ssang-Goo, Dayem, Ahmed Abdal, Lee, Joohyun, Bae, Seong Phil, Hahn, Won-Ho, and Lee, Jeong-Sang, The effects of human milk proteins on the proliferation of normal, cancer and cancer stem like cells, *Analyt. Sci. Technol.*, 2018, vol. 31, no. 6, pp. 232–9. doi: 10.5806/AST.2018.31.6.232.
 10. Chekhun, V.F., Zalutskii, I.V., Naleskina, L.A., Lukianova, N.Y., Yalovenko, T.M., Borikun, T.V., Sobchenko, S.O., Semak, I.V., and Lukashevich, V.S., Modifying effects of lactoferrin in vitro on molecular phenotype of human breast cancer cells with varying degrees of malignancy and sensitivity of cytostatics, *Experim. Oncol.*, 2015, vol. 37, no. 3, pp. 181–6. URI: <http://dspace.nbuv.gov.ua/handle/123456789/145485>.
 11. Chekhun, V.F., Lukianova, N.Yu., Polishchuk, L.Z., Nalieskina, L.A., Zadvornyi, T.V., Storchai, D.M., Todor, I.N., Sobchenko, S.O., Demash, D.V., Yalovenko, T.M., Borikun, T.V., Lozovska, Yu.V., Vitruk, Yu.V., Chepurnaty, M.V., Pikul, M.V., Stakhovsky, O.E., Voilenko, O.A., and Stakhovsky E.O., The role of lactoferrin expression in initiation and progression of most common hormone-dependent cancers, *Horiz. Cancer Res.*, 2017, vol. 66, Chapter 3, pp. 51–85. <https://novapublishers.com/shop/horizons-in-cancer-research-volume-66/>.
 12. Koblyakov, A.V., Antoshina, E.E., Gorkova, T.G., and Goldman, I.L., The inhibitory effect of human lactoferrin (neolactoferrin) on the growth of an inoculated tumor of the cervix of mice, *Vopr. Onkol.*, 2012, vol. 58, no. 5, pp. 668–73. (in Russian). <https://elibrary.ru/item.asp?id=17989425>
 13. Zhang, Yunlei, Cristovao, F. Lima, Ligia, and Rodrigues, R., In vitro evaluation of bovine lactoferrin potential as an anticancer agent, *Inter. Dairy J.*, 2015, vol. 40, no. 2015, pp. 6–15. doi: 10.1016/j.idairyj.2014.08.016.
 14. Iglesias-Figueroa, B.F., Siqueiros-Cendyn T.S., Gutierrez D.A, Aguilera, R.J., Espinoza-Sánchez, E.A., Arévalo-Gallegos, S., Varela-Ramirez, A., Rascyn-Cruz, Q. Recombinant human lactoferrin induces apoptosis, disruption of F-actin structure and cell cycle arrest with selective cytotoxicity on human triple negative breast cancer cells, *Apoptosis*, 2019, pp. 1–16. doi: 10.1007/s10495-019-01539-7.
 15. Terpinskaya, T.I., Pavlovets, L.V., The effect of human lactoferrin obtained from the milk of transgenic goats on the growth of transplantable tumors in mice, *Healthcare. Minsk (Belarus)*, 2013, vol. 2, pp. 33–7. (in Russian). <http://elib.bsu.by/itstream/123456789/17272/1/133.pdf>.
 16. Zalutsky, I.V., Lukashevich, V.S., Lukyanova, N.Yu., Kondrashova, S.B., Rudnichenko, Yu.A., Basalay, A.A., and Chekhun, V.F., Effect of exogenous lactoferrin on the development of an experimental model of breast carcinoma, *Rep. Nat. Acad. Sci. Belarus*, 2017, vol. 61, no. 5, pp. 103–8. (in Russian). https://doklady.belnauka.by/jour/article/view/463?locale=ru_RU
 17. Nicoletti, G., Migliorati, M., Pagliacci, C., Grignani, F., and Riccardi, C., A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry, 1991, vol. 139, pp. 271–9. doi: 10.1016/0022-1759(91)90198-o.
 18. Tinwell, H., Ashby, J., Comparison of Acridine orange and Gimsa stains in several mouse bone marrow micronucleus assay-including a triple dose study, *Mutagenesis*, 1989, vol. 6, no. 3, pp. 476–81. doi: 10.1093/mutage/4.6.476.
 19. Dias, V.M., Oliveria, R.M., and Machado-Santelli, G.M., Using Fluorescence for improvement of the quantitative analysis of micronucleus in cell culture, *Mutat. Res.*, 2005, vol. 565, pp. 173–9. doi: 10.1016/j.mrgentox.2004.10.003.
 20. Andrusishina, I.M., Lampeka, O.G., and Golub, I.O., 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 (in Ukraine).
 21. Vorobyova, O.V., Novichkov, E.V., Quantitative morphometry of endometrial ovarian cancer at risk of metastasis, *Med. News Norh. Cauc.*, 2015, vol. 10, no. 3, pp. 254–8. (in Russian). doi: 10.14300/mnnc.2015.00059.
 22. Gibbons, J.A., Kanwar, J.R., and Kanwar, R.K., Iron-free and iron-saturated bovine lactoferrin inhibit survivin expression and differentially modulate apoptosis in breast cancer, *BMC cancer*, 2015, vol. 15, no. 1, pp. 425. doi: 10.1186/s12885-015-1441-4.
 23. Blais, A., Fan, C., Voisin T., Aattouri, N., Dubarry, M., Blachier, F., and Tomé, D., Effects of lactoferrin on intestinal epithelial cell growth and differentiation: an in vivo and in vitro study, *Biometals*, 2014, vol. 27, no. 5, pp. 857–74. doi: 10.1007/s10534-014-9779-7.
 24. Sharma, R., Chakraborty, D., and Gupta, P., Bovine lactoferrin and its functions in animals-A review,

- Agric. Rev.*, 2015, vol. 36, no. 4, pp. 321–6. doi: 10.18805/ag.v36i4.6669.
25. Tammam, S.N., Azzazy, H.M., and Lamprecht, A., Nuclear and cytoplasmic delivery of lactoferrin in glioma using chitosan nanoparticles: Cellular location dependent-action of lactoferrin, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2018, vol. 129, pp. 74–79. doi: 10.1016/j.ejpb.2018.05.027.
 26. Sokolov, A.V., Zakahrova, E.T., Kostevich, V.A., Samygina, V.R., and Vasilyev, V.B., Lactoferrin, myeloperoxidase, and ceruloplasmin: complementary gearwheels cranking physiological and pathological processes, *BioMetals*, 2014, vol. 27, no. 5, pp. 815–28. (in Russian). doi: 10.1007/s10534-014-9755-2.
 27. Lozovska, Y.V., Andrusishina, I.M., Lukianova, N.Y., Burlaka, A.P., Naleskina, L.A., Todor, I.N., and Chekhun, V.F., The influence of lactoferrin on elemental homeostasis and activity of metal-containing enzymes in rats with Walker-256 carcinosarcoma, *Experimental Oncology*, 2019, vol. 41, no 1, pp. 20–5. doi: 10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-41-no-1.12471.
 28. Ambrosone, C.B., Barlow, W.E., and Reynolds, W., Myeloperoxidase Genotypes and Enhanced Efficacy of Chemotherapy for Early-Stage Breast Cancer in SWOG-889, *J. Clin. Oncol.*, 2009, vol. 27, no. 4973–9. doi: 10.1200/JCO.2009.21.8669.
 29. Rymaszewski, A.L., Tate, E., and Yimbessalu, J.P., The role of neutrophil myeloperoxidase in models of lung tumor development, *Cancers (Basel)*, 2014, vol. 6, no. 2, pp. 1111–27. doi: 10.3390/cancers6021111.
 30. Hanahan, D., Weinberg, R.A., Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell*, 2011, vol. 144, no. 5, pp. 646–74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
 31. Smolková, K., Plecítá-Hlavatá, L., Bellance, N., Bernard, G., Rossignol, R., Ježek, P. Waves of gene regulation suppress and then restore oxidative phosphorylation in cancer cells, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2011, vol. 43, no. 7 pp. 950–68. doi: 10.1016/j.biocel.2010.05.003.
 32. Nguyen, D.N., Jiang, P., Stensballe, A., Bendixen, E., Sangild, P.T., and Chatterton, D.E., Bovine lactoferrin regulates cell survival, apoptosis and inflammation in intestinal epithelial cells and preterm pig intestine, *Proteomics*, 2016, vol. 139, pp. 95–102. doi: 10.1016/j.jprot.2016.03.020.
 33. Weijer, R., Broekgaarden, M., Krekorian, M., Alles, L.K., van Wijk, A.C., Mackaaij, C., Verheij, J. an der Wal, A.C., van Gulik, T.M., Storm, G., and Heger, M., Inhibition of hypoxia inducible factor 1 and topoisomerase with acriflavine sensitizes perihilar cholangiocarcinoma to photodynamic therapy, *Oncotarget*, 2016, vol. 7, no. 3, pp. 3341–56. doi: 10.18632/oncotarget.6490.
 34. Mankaran Singh, Dinesh Kumar, Gurmeet Singh, and Sharma Deepak, Natural Minerals and Cancer, *J. Appl. Pharm. Sci.*, 2012, vol. 4, pp. 158–65. doi: 10.7324/JAPS.2012.2513.
 35. Frederickson, C.J., Koh, J-Y., and Bush, A.I., The neurobiology of zinc in health and disease, *Nat. Rev. Neurosci.*, 2005, vol. 6, 449–62. DOI: 10.1038/nrn1671.
 36. Andreini, C., Bertini, I., A bioinformatics view of zinc enzymes, *J. Inorg. Biochem.*, 2012, vol. 111, pp. 150–6. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2011.11.020.
 37. MacDonald, R.S., The role of zinc in growth and cell proliferation, *J. Nutr.*, 2000, vol. 130, Suppl: 1500S–1508. doi: 10.1093/jn/130.5.1500S.
 38. Bellomo, E., Massarotti, A., Hogstrand, C., and Maret, W., Zinc ions modulate protein tyrosine phosphatase 1B activity, *Metallomics*, 2014, vol. 6, pp. 1229–39. doi: 10.1039/c4mt00086b.
 39. Zhu, D., Su, Y., Zheng, Y., Fu, B., Tang, L., and Qin, Y.X., Zinc regulates vascular endothelial cell activity through zinc-sensing receptor ZnR/GPR39, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 2018, vol. 314, C404–C414. doi: 10.1152/ajpcell.00279.2017
 40. Jun, Ma, Nan, Zhao, Donghui, Zhu, Endothelial Cellular Responses to Biodegradable Metal Zinc. *ACS, Biomater. Sci. Eng.*, 2015, vol. 1, no. 11, pp. 1174–82. doi: 10.1021/acsbiomaterials.5b00319.
 41. Munaron, L., Pla, A.F., Endothelial Calcium Machinery and Angiogenesis: Understanding Physiology to Interfere with Pathology, *Curr. Med. Chem.*, 2009, vol. 16, no. 35, pp. 4691–703. doi: https://doi.org/10.2174/092986709789878210.
 42. Wu, L., Du, Y., Lok, J., Lo, E.H., and Xing, C., Lipocalin-2 enhances angiogenesis in rat brain endothelial cells via reactive oxygen species and iron-dependent mechanisms, *J. Neurochem.*, 2015, vol. 132, no. 6, pp. 622–8. doi: 10.1111/jnc.13023.
 43. Yang, J., McNeish, B., Butterfield, C., and Moses, M.A., Lipocalin 2 is a novel regulator of angiogenesis in human breast cancer, *FASEB J.*, 2013, vol. 27, pp. 45–50. doi: 10.1096/fj.12-211730.
 44. Suzuki, H., Ikeda, N., Kobayashi, K., Terashima, Y., Shimada, Y., Suzuki, T., Hagiwara, T., Hatakeyama, S., Nagaoka, K., Yoshida, J., Saito, Y., Tanaka, J., and Hayashi, M., Evaluation of liver and peripheral blood micronucleus assay with 9 chemicals using young rats a study by the Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT). Japanese Environmental Mutagen Society (JEMS)-Mammalian Mutagenicity Study Group (MMS), *Mutat. Res.*, 2005, vol. 583, pp. 133–45. doi: 10.1016/j.mrgentox.2005.03.012.
 45. Ayla, Celik, Oya, Ogenler, and Comelekoglu, U., The evaluation of micronucleus frequency by acridine orange fluorescent staining in peripheral blood of rats treated with lead acetate, *Mutagenesis*, 2005, vol. 20, no. 6, pp. 411–5. doi: 10.1093/mutage/gel027.

Надійшла в редакцію 11.10.19
Після доопрацювання 18.12.19
Прийнята до друку 18.05.20