

О.О. Лихова
Н.О. Безденежних
Н.В. Видасов
Т.П. Козак
В.Г. Лупан
В.Ф. Чехун

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

Ключові слова: рак
передміхурової залози, глюкоза,
інсулін, гормон-чутливий,
гормон-резистентний.

ОСОБЛИВОСТІ МЕТАБОЛІЗМУ ГЛЮКОЗИ ГОРМОН-ЧУТЛИВИМИ І РЕЗИСТЕНТНИМИ КЛІТИНАМИ РАКУ ПЕРЕДМІХУРОВОЇ ЗАЛОЗИ ЛЮДИНИ *IN VITRO*

Рак передміхурової залози (РПЗ) серед пацієнтів із цукровим діабетом відмічають рідше. Однак, у поєднанні із цукровим діабетом перебіг РПЗ є більш агресивним і частіше супроводжується метастазуванням в регіонарні лімфатичні вузли. **Мета:** дослідження впливу інсуліну на проліферацію та метаболізм глюкози клітинами РПЗ. **Об'єкт і методи дослідження:** дослідження проводили *in vitro* на клітинах РПЗ людини ліній LNCaP (гормон-чутливі), Du-145 і PC-3 (резистентні). У роботі використовували методи культури клітин, біохімічні, молекулярно-біологічні, імунологічні та статистичні методи. **Результати:** інсулін в усіх досліджених концентраціях підвищував метаболізм глюкози клітинами LNCaP на 20%. Разом з тим у клітинах Du-145 лише високі концентрації інсуліну суттєво підвищували кількість метаболізованої глюкози. Інсулін в усіх досліджених концентраціях підвищував проліферативну активність клітин LNCaP на 20–30%, але в клітинах Du-145 і PC-3 високі концентрації гормону призводили до пригнічення проліферації клітин. Обробка клітин РПЗ інсуліном зумовлювала дозозалежне пригнічення експресії CD44 в усіх трьох типах клітин. **Висновки:** порівняльний аналіз отриманих результатів свідчить, що підвищення ступеня злоякісності клітин РПЗ асоційоване зі зниженням їх чутливості до метаболічного і мітогенного ефектів інсуліну. CD44 може бути важливою та селективною молекулярною мішенню для терапії при РПЗ.

Рак передміхурової залози (РПЗ) та цукровий діабет (ЦД) — одні з найбільш поширених захворювань, що вражають чоловіків старшого віку. Дослідження показали, що пацієнти із ЦД більш схильні до онкологічних захворювань. Але саме серед них РПЗ відмічають рідше, ніж у чоловіків, що не хворіють на ЦД. Разом з тим перебіг РПЗ у поєднанні з ЦД є більш агресивним і частіше супроводжується метастазуванням у регіонарні лімфатичні вузли. Сьогодні відомо, що особливості такого перебігу онкологічного захворювання пов'язані з різними порушеннями біосинтезу гормонів, зокрема інсуліну, або надмірною експресією рецепторів до них у клітинах РПЗ, що супроводжується пригніченням апоптозу та підвищенням проліферації пухлинних клітин.

Вважають, що при ЦД відбувається накопичення продуктів вуглеводного обміну (приміром метилглюкозалью), яким властива антипроліферативна дія, а також змінюється метаболізм стероїдних гормонів (збільшується співвідношення естрогени/андрогени), чим, можливо, визначається зниження ризику РПЗ при тривалому ЦД [1]. Також було показано, що у чоловіків із ЦД виявляють вищий ступінь злоякісності таких пухлин у разі більш низьких рівнів простатичного специфічного антигену (ПСА),

ніж у пацієнтів з нормальним рівнем глікемії [2]. Дослідження останніх років показали, що ЦД тісно пов'язаний з підвищеним ризиком розвитку РПЗ. Однак недостатньо вивченими залишаються механізми підвищення злоякісності клітин РПЗ різного фенотипу в умовах порушення роботи цієї важливої метаболічної системи організму. З огляду на це, актуальним є дослідження і подальший порівняльний аналіз зміни метаболічних, проліферативних і фенотипових властивостей гормон-чутливих і резистентних клітин РПЗ за умови впливу на них різних концентрацій інсуліну.

Мета: дослідити вплив інсуліну на проліферацію та метаболізм глюкози клітинами РПЗ.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Клітинні лінії. Клітини РПЗ людини з різною чутливістю до гормональної терапії та ступенем злоякісності: LNCaP — гормон-чутливі, низький ступінь туморогенності; Du-145 — гормон-резистентні, середній ступінь туморогенності; PC-3 — гормон-резистентні, високий ступінь туморогенності [3]. Клітини були отримані з Банку клітинних ліній з тканин людини та тварин Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького Національної академії наук України.

Клітини РПЗ культивували у пластиковому посуді (SPL, Korea) у поживному середовищі DMEM (Biowest, France) з 10% фетальної сироватки теляти (ФСТ) (Biowest, France) та 40 мкг/мл гентаміцину (Sigma, USA). Інкубували клітини у зволоженій атмосфері з 5% CO₂ при 37 °С. Зміну середовища і пересів клітин проводили за стандартною методикою [4]. Клітини знімали із субстрату розчином EDTA (Sigma, USA), визначали концентрацію і життєздатність клітин у суспензії за допомогою камери Горьєва (Воless, Україна) і трипанового синього (Bio-Rad, USA).

Визначення життєздатності клітин колориметричним методом. Клітини РПЗ висаджували на лунки 96-лункового планшета (SPL, Korea) в концентрації 1 • 10⁴ клітин/лунку у поживному середовищі DMEM з 10% ФСТ та 40 мкг/мл гентаміцину та інкубували протягом 24 год у зволоженій атмосфері з 5% CO₂ за 37 °С.

Наступної доби в усіх лунках планшета поживне середовище відбирали, промивали клітини фізіологічним розчином і вносили по 200 мкл поживного середовища DMEM High glucose (4500 мг/Л глюкози) або DMEM Low glucose (1000 мг/Л глюкози) з 0,5% ФСТ, а у відповідні лунки планшета додавали різні концентрації рекомбінантного інсуліну людини (Lilly, France) (2 мкг/мл, 0,25 мкг/мл, 0,02 мкг/мл). У якості контролю для аналізу проліферативної активності клітин за умов дії гормону використовували клітини, що культивували в такому ж поживному середовищі без додавання інсуліну. Клітини інкубували протягом 48 год за 37 °С під впливом 5% CO₂.

Після завершення інкубації середовище відбирали, зберігали за -20 °С для подальшого аналізу кількості метаболізованої глюкози та продукції лактату і додавали в кожну лунку 50 мкл розчину кристалічного фіолетового (5 мг/мл барвника в 70% метиловому спирті). Через 10 хв барвник тричі змивали проточною водою [5, 6]. Результати фіксували за допомогою мультилункового спектрофотометра за довжини хвилі збудження 540 нм. Кількість живих клітин обраховували за формулою:

$$IR = (1 - A_{540}(\text{experiment}) / A_{540}(\text{control})) \cdot 100\% [7].$$

Визначення кількості метаболізованої глюкози і продукції лактату злякисними клітинами in vitro. Кількість глюкози і лактату в поживному середовищі визначали колориметричним ензиматичним методом з оксидазою глюкози, використовуючи діагностичні набори для визначення концентрації глюкози й лактату (CORMAY, Польща) згідно з інструкцією виробника. Для оцінки результатів використовували автоматичний біохімічний аналізатор (Chemwell, США). Отримані результати вивчали, враховуючи кількість клітин в контрольній та експериментальних групах.

Визначення рівня експресії рецептора інсуліну в досліджуваних клітинах in vitro. У лунки 12-лункового планшета висаджували клітини РПЗ людини в кон-

центрації 0,5 • 10⁶ клітин/лунку в поживному середовищі DMEM з 10% ФСТ та 40 мкг/мл гентаміцину та інкубували протягом 24 год у зволоженій атмосфері з 5% CO₂ за 37 °С. В експерименті вимірювали зв'язування міченого FITC інсуліну з рецепторами інсуліну на клітинах РПЗ методом проточної цитометрії. Клітини РПЗ знімали з субстрату розчином етилендіамінтетраоцтової кислоти і центрифугували за 1000 об/хв протягом 5 хв. Клітини двічі промивали фосфатно-сольовим буфером (Biowest, France). 0,5 • 10⁶ клітин вносили в мікропробірки типу Eppendorf, додавали до клітинної суспензії розчин FITC-інсуліну (Sigma, USA) до кінцевої його концентрації 3 мкг/мл. Клітини поміщали на платформу міні-шейкера (Biosan, Латвія) за 200 об/хв та інкубували за 27 °С протягом 1,5 год в темряві. Після закінчення інкубації клітини двічі промивали охолодженням фосфатно-сольовим буфером і фіксували 1% розчином параформальдегіду (Sigma, USA) протягом 20 хв. Кількість мічених FITC-інсуліном клітин в експерименті визначали за допомогою проточного цитофлуориметра FACScan (Becton Dickinson, USA) з використанням відповідного програмного забезпечення.

Імуноцитохімічний аналіз. Вплив інсуліну на експресію молекули адгезії CD44 в клітинах РПЗ визначали методом імуноцитохімічного аналізу. Досліджувані клітини висаджували на покривні скельця в стерильних умовах у поживному середовищі DMEM з 10% ФСТ в 5% CO₂ за 37 °С протягом 24 год, а після цього додавали рекомбінантний інсулін до кінцевих концентрацій 2,0 і 0,02 мкг/мл. Клітини інкубували ще 48 год. Потім скельця з клітинами поміщали у фіксуючий розчин (метанол + ацетон: 1:1) на 2 год за -20 °С, після чого інкубували 20 хв з 1% розчином бичачого сироваткового альбуміну. Потім на 1 год наносили моноклональний антитіла проти CD44 (Thermo Scientific, USA). Застосовували систему візуалізації Ultra Vision LP Value Detection system, яка містить детекційні антитіла, кон'юговані з пероксидазою, активність якої виявляли за допомогою субстрату діамінобензидину (Thermo Scientific, USA). Після проведення імуноцитохімічної реакції препарати промивали проточною водою та забарвлювали розчином гематоксилін-еозину (Thermo Scientific, USA) протягом 15–30 сек, після чого препарати розмішували в Faramount Aqueous Mounting Medium [8]. Підраховували кількість клітин з експресією (коричневе забарвлення клітин) за допомогою світлового мікроскопу та оцінювали за допомогою класичного методу H-Score: S = 1xA + 2xB + 3xC, де S — показник «H-Score», значення якого знаходяться в межах від 0 (білок не експресується) до 300 (сильна експресія у 100% клітин); A — відносна кількість (%) слабо «забарвлених» клітин, B — відсоток помірно «забарвлених» клітин, C — відсоток сильно «забарвлених» клітин [9]. Обчислювали результати за допомогою світлового мікроскопа Axiostar plus (Carl Zeiss, Germany), облад-

наного цифровою камерою (Canon Power Shot G5, UK) при збільшенні $\times 400$ і $\times 1000$.

Статистичний аналіз. Статистичну обробку одержаних результатів проводили за допомогою математичної програми медико-біологічної статистики STATISTICA 6.0. з використанням t-критерію Ст'юдента; достовірними вважали відмінності з вірогідністю не менше 95% ($p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Інсулін володіє цілим спектром біологічних ефектів і впливає на значну кількість процесів у клітинах органів-мішеней, але найважливішу роль він відіграє в процесах вуглеводного обміну: основна біологічна функція інсуліну — регуляція рівня глюкози. Цей ефект гормону реалізується як на мембранному рівні, так і шляхом посилення внутрішньоклітинної утилізації глюкози.

Відомо, що клітини злоякісних пухлин характеризуються високим рівнем метаболізму глюкози, зумовленого їх посиленою потребою в АТФ. Для подолання дефіциту аденозинтрифосфату, який утворюється в результаті гліколізу, у пухлинних клітинах посилюється активність гліколітичних ферментів (гексокінази, фосфофруктокінази і піруватдегідрогенази), що супроводжується збільшенням споживання глюкози і забезпечує підвищення проліферації, інвазії і міграції злоякісних клітин [10].

Зміни клітинного метаболізму, зокрема метаболізму вуглеводів, у пухлинних клітинах вважають характерною ознакою злоякісної трансформації. Однак сьогодні вже зрозуміло, що біологічні особливості метаболічного перепрограмування розрізняються не тільки для різних видів онкопатології, але також і для різних клітин одного типу раку [11].

Отже, на першому етапі досліджень ми визначали кількість метаболізованої клітинами РПЗ людини різного ступеня злоякісності глюкози після їх культивування з використанням різних концентрацій інсуліну. Показано, що гормон-чутливі клітини лінії LNCaP за наявності високих концентрацій інсуліну (2,0 і 0,25 мкг/мл) метаболізують глюкозу в середньому на 20% інтенсивніше, ніж інтактні клітини. Такі зміни були статистично достовірними в порівнянні з контролем клітин. Разом з тим обробка клітин LNCaP інсуліном у фізіологічній концентрації (0,02 мкг/мл) не впливала на інтенсивність поглинання глюкози пухлинними клітинами (рис. 1а).

Аналіз кількості метаболізованої глюкози гормон-резистентними клітинами РПЗ людини лінії Du-145 показав, що лише найвища із досліджених концентрацій інсуліну (2,0 мкг/мл) статистично достовірно збільшувала кількість поглинутої глюкози клітинами Du-145 на 34% в порівнянні з контролем. У той же час культивування клітин Du-145 за наявності фізіологічної концентрації інсуліну (0,02 мкг/мл) призводило до статистично достовірного зменшення кількості поглинутої глюкози на 23% порівняно з контролем (рис. 1б).

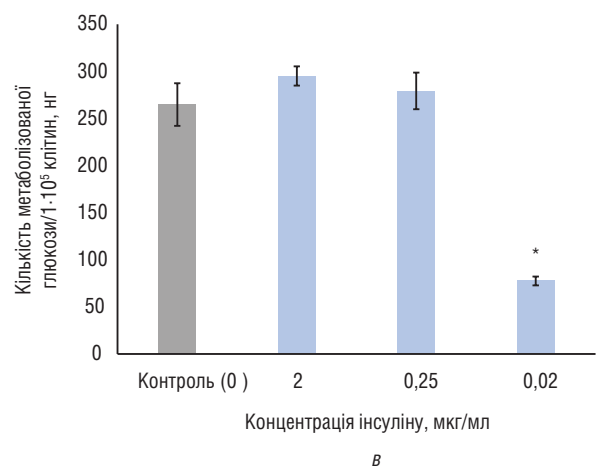
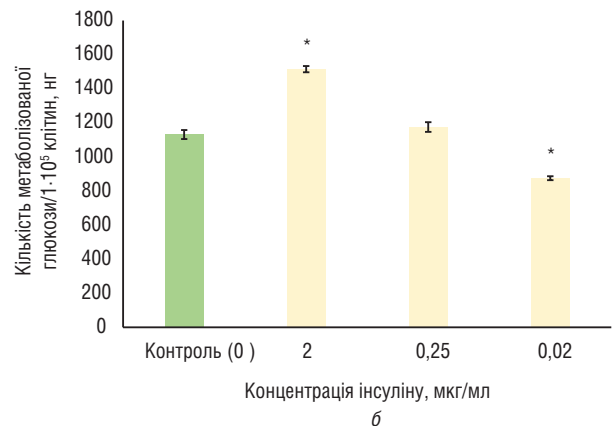
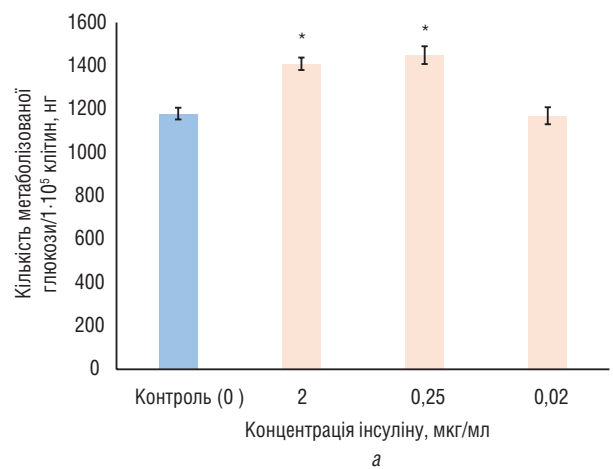


Рис. 1. Порівняльний аналіз кількості метаболізованої глюкози клітинами РПЗ людини з різною чутливістю до гормональної терапії: а — клітини LNCaP, б — клітини Du-145, в — клітини PC-3

Оцінка кількості метаболізованої глюкози в культуральному середовищі з клітин PC-3 показала, що їх обробка інсуліном у високих концентраціях (2,0 і 0,25 мкг/мл) не супроводжувалася статистично достовірними змінами метаболізуючої активності клітин. Однак за умов культивування PC-3 за наявності 0,02 мкг/мл інсуліну, так само як і в клітинах Du-145, спостерігали статистично достовір-

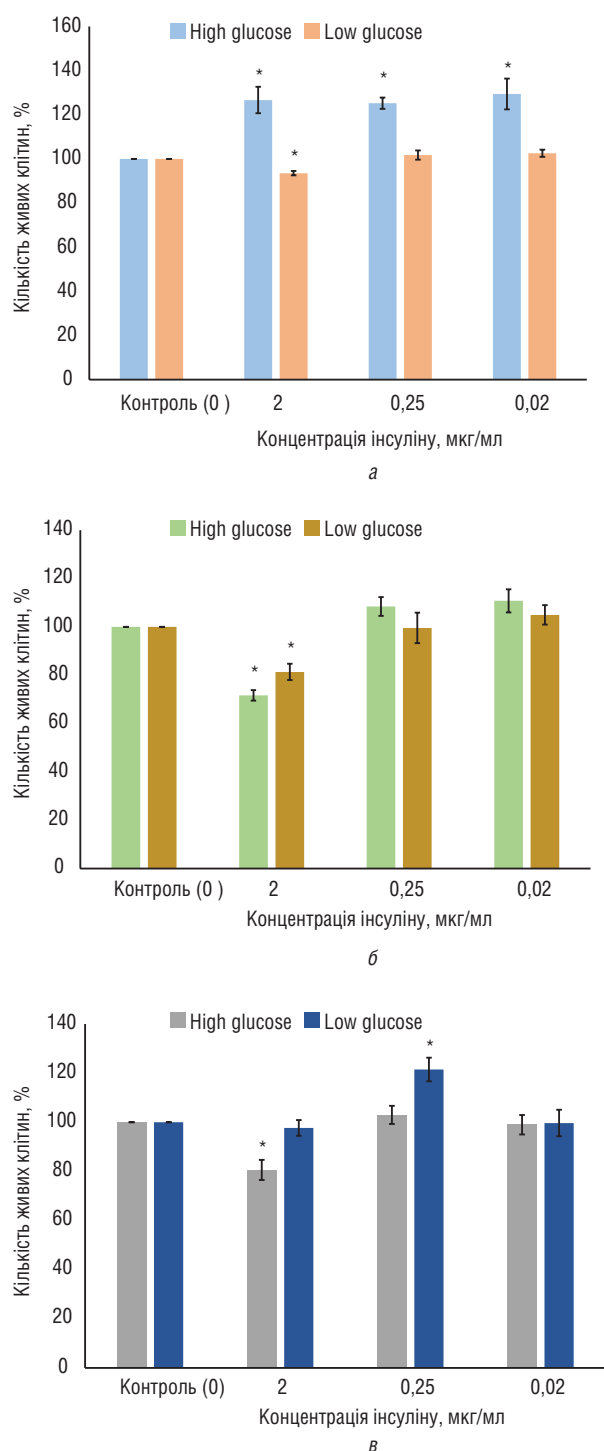


Рис. 2. Порівняльний аналіз проліферативної активності клітин РПЗ людини з різною чутливістю до гормональної терапії після їх культивування за різних концентрацій інсуліну: *а* — клітини LNCaP, *б* — клітини Du-145, *в* — клітини PC-3

не зменшення кількості глюкози поглинутої клітинами на 69%, в порівнянні з контролем (рис. 1в).

Порівняльний аналіз отриманих результатів свідчить, що підвищення ступеня злоякісності клітин РПЗ асоційоване зі зниженням їх чутливості до метаболічного ефекту інсуліну. Однак у гормон-резистентних клітинах ліній Du-145 та PC-3 за фізіоло-

гічних концентрацій гормону спостерігали пригнічення метаболічної активності злоякісних клітин.

Оцінка абсолютних значень кількості метаболізованої глюкози клітинами РПЗ показала, що LNCaP і Du-145 поглинають однакову кількість глюкози: 1,2 і 1,1 мкг відповідно. Найбільш злоякісні клітини РПЗ лінії PC-3 поглинали в 4 рази менше глюкози.

Інсулін є головним анаболічним гормоном та стимулює ріст і проліферацію клітин, підвищуючи синтез РНК і ДНК. Гормон сприяє синтезу білків, посилює транспорт амінокислот у клітині, активує синтез нуклеїнових кислот, процеси рибосомального синтезу поліпептидів. Паралельно з посиленням анаболічних процесів інсулін гальмує катаболічні реакції розпаду білкових молекул [12]. Крім того, він посилює дію деяких факторів росту: епідермального, тромбоцитарного, фактора росту фібробластів, соматомедину [13].

Тому на наступному етапі наших досліджень було проведено порівняльний аналіз мітогенної активності інсуліну щодо гормон-чутливих і гормон-резистентних клітин РПЗ людини.

За даними літератури відомо, що зниження рівня глюкози в крові пацієнтів зі злоякісними новоутвореннями нирки і легені на пізній стадії захворювання корелює з підвищенням виживаності хворих. За результатами досліджень у системі *in vitro* було показано, що висока концентрація глюкози в поживному середовищі забезпечує підвищення проліферації пухлинних клітин, у той час як її нестача призводить до активації програми апоптозу [14]. Враховуючи вплив кількості глюкози на біологію злоякісної клітини, проліферацію клітин РПЗ, оброблених інсуліном, оцінювали за умов їх культивування у поживному середовищі з високим (4,5 г/л) і низьким (1 г/л) вмістом глюкози.

Було показано, що за умов культивування клітин LNCaP у поживному середовищі з високим вмістом глюкози інсулін у всіх досліджених концентраціях призводив до статистично достовірного збільшення кількості живих клітин на 20–30% у порівнянні з контролем. Разом з тим культивування LNCaP за наявності таких же концентрацій інсуліну, але в поживному середовищі з низькою концентрацією глюкози суттєво не впливало на проліферативну активність клітин РПЗ (рис. 2а).

Аналіз проліферативної активності гормон-резистентних клітин Du-145 після їх обробки інсуліном показав, що найвища із досліджених концентрацій гормону (2 мкг/мл) спричиняла статистично достовірне пригнічення проліферації клітин на 20–28% в поживному середовищі з високим вмістом глюкози і на 12–18% в середовищі з низькою концентрацією глюкози в порівнянні з контролем. Інсулін у нижчих концентраціях (0,25 і 0,02 мкг/мл) суттєво не впливав на проліферацію досліджуваних клітин незалежно від типу поживного середовища (рис. 2б).

Культивування клітин PC-3 за наявності 2 мкг/мл інсуліну і в поживному середовищі з високим вмістом глюкози призводило до пригнічення проліферації гормон-резистентних клітин у середньому на 20% порівняно з контролем. Інсулін у нижчих концентраціях за таких умов культивування клітин PC-3 суттєво не впливав на їх проліферацію (рис. 2в).

Обробка клітин PC-3 у поживному середовищі з низьким вмістом глюкози і за 0,25 мкг/мл інсуліну супроводжувалася статистично значущим збільшенням кількості живих клітин на 20–30% у порівнянні з контролем. Слід зазначити, що інсулін у найвищій із досліджених концентрацій (2 мкг/мл) не впливав на життєздатність і проліферацію клітин PC-3 за таких умов культивування (рис. 2в).

Отже, у середовищі з високим вмістом глюкози інсулін в усіх досліджених концентраціях підвищував проліферативну активність клітин LNCaP, але в клітинах Du-145 найвища концентрація гормону призводила до пригнічення проліферації клітин. На відміну від клітин LNCaP та Du-145, проліферативна активність гормон-резистентних клітин PC-3 значною мірою залежала від вмісту глюкози в поживному середовищі.

З метою пошуку механізмів, які можуть пояснити описані вище ефекти інсуліну, нами було досліджено експресію рецептора інсуліну (PI) на клітинах РПЗ після їх обробки різними концентраціями гормону. Оскільки, PI — трансмембранний білок, який активується інсуліном, інсуліноподібними факторами росту I та II, належить до великого класу тирозинкіназних рецепторів і відіграє ключову роль у регуляції гомеостазу глюкози і клітинного циклу.

Аналіз рівня експресії PI в популяціях досліджуваних клітин РПЗ людини показав, що в гормон-чутливих клітинах лінії LNCaP інтенсивність сигналу FITC є статистично достовірно нижчою, ніж у гормон-нечутливих клітинах ліній Du-145 і PC-3. Причому найвищий рівень експресії PI спостерігали в клітинах PC-3, що характеризуються високим ступенем злоякісності (табл. 1).

Таблиця 1
Порівняльний аналіз рівня експресії PI в популяціях гормон-чутливих та резистентних клітин РПЗ людини після їх культивування під впливом різних концентрацій інсуліну

Назва клітинної лінії	Рівень свідчення FITC на клітинах, у.о.		
	Контроль (0 мкг/мл)	+ 2,0 мкг/мл	+ 0,02 мкг/мл
LNCaP	12,6 ± 0,6	10,7 ± 4,2	11,4 ± 1,8
Du-145	61,7 ± 1,3	66,9 ± 11,0	68,9 ± 7,3
PC-3	136,0 ± 1,4	169,5 ± 12,7	158,0 ± 8,8

Після культивування клітин РПЗ за наявності різних концентрацій інсуліну протягом 16 год не було виявлено статистично достовірної різниці між рівнем експресії PI в контрольній і оброблених інсуліном групах клітин LNCaP та Du-145. Однак на рівні тенденції відмічали дозозалежне підвищення експресії PI в клітинах PC-3 після їх культивування під впливом інсуліну (див. табл. 1).

Дослідження, проведені *in vitro* на моделях шестиліній пухлинних клітин з різними рівнями експресії сімейства PI, показали, що реакція досліджених клітин на інсулін пов'язана не тільки з рівнями експресії рецептора і не спостерігається кореляції між гормон-стимульованою проліферацією та рівнем злоякісності пухлинних клітин [15]. Отримані нами результати свідчать, що показник експресії PI не корелює з проліферативною або метаболічною активністю клітин РПЗ після їх обробки різними концентраціями інсуліну. Однак, слід відмітити, що в клітинах з найбільш злоякісним фенотипом і найменшими показниками спожитої глюкози PC-3 відмічали вищий рівень експресії PI. Такі дані дозволяють припустити, що структура і функціональна активність PI саме на клітинах PC-3 порушені найбільше, і для забезпечення метаболічних потреб клітини необхідна вища його експресія.

Також у клітинах РПЗ методом імуноцитохімічного аналізу визначали рівень експресії молекули адгезії і маркера стовбурових клітин CD44 після їх обробки різними концентраціями інсуліну. CD44 — це білок клітинної поверхні, який бере участь у багатьох біологічних процесах, включаючи адгезію та проліферацію клітин. У злоякісних клітинах високий рівень експресії CD44 асоціюється з підвищенням проліферативної активності клітин, їх міграції та інвазії. Окрім того, CD44 бере участь у регуляції гліколітичного метаболічного шляху в клітинах колоRECTального раку і раку легені людини. Автори визначили також, що CD44 взаємодіє з PKM2, гліколітичною ізоформою піруваткінази, і таким чином може модулювати метаболізм клітин РПЗ [16].

Аналіз експресії CD44 в досліджених клітинах РПЗ людини показав, що LNCaP, Du145 і PC-3 на високому рівні експресують досліджуваний маркер. Високий рівень експресії цього білка в інтактних клітинах РПЗ (контроль) свідчить про низький ступінь їх диференціювання. Цікаво, що обробка клітин інсуліном призводила до дозозалежного пригнічення експресії CD44 в трьох типах клітин (табл. 2).

За даними літератури відомо, що зниження експресії CD44 в клітинах РПЗ може супроводжуватися пригніченням їх проліферації та підвищенням чутливості до цитостатиків, зокрема карбоплатину [17].

Таблиця 2
Експресія CD44 в клітинах РПЗ людини після їх культивування під впливом різних концентрацій інсуліну

Клітинна лінія	Експериментальні групи			
	Контроль (0 мкг/мл)	+ 2,0 мкг/мл	+0,25 мкг/мл	+0,02 мкг/мл
LNCaP	235,4 ± 14,0	101,4 ± 7,7*	138,7 ± 8,5*	152,5 ± 9,8*
Du-145	177,3 ± 12,6	89,2 ± 6,7*	92,0 ± 5,5*	100,0 ± 7,5*
PC-3	242,7 ± 18,0	68,3 ± 4,7*	97,5 ± 6,2*	141,0 ± 9,5*

Примітка: * — різницю у порівнянні з контролем встановлено ($p < 0,05$).

Отримані результати дозволяють припустити, що незалежно від чутливості клітин РПЗ до гормональної терапії або їх ступеня злоякісності інсулін

спричиняє диференціювання цих клітин і може підвищувати їх чутливість до дії протипухлинних препаратів.

ВИСНОВКИ

1. Порівняльний аналіз отриманих результатів свідчить, що підвищення ступеня злоякісності клітин РПЗ асоційоване зі зниженням їх чутливості до метаболічного ефекту інсуліну. Однак у гормон-резистентних клітинах ліній Du-145 та PC-3 за фізіологічних концентрацій гормону спостерігали пригнічення метаболічної активності злоякісних клітин.

2. Рівень експресії рецептора інсуліну не корелює з проліферативною або метаболічною активністю клітин РПЗ після їх обробки різними концентраціями гормону.

3. Клітини РПЗ людини (LNCaP, Du145 і PC-3) на високому рівні експресують маркер CD44, обробка клітин інсуліном призводила до дозозалежного пригнічення його експресії. CD44 може бути важливою та селективною молекулярною мішенню для терапії при РПЗ.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Rodriguez C, Patel AV, Mondul AM *et al.* Diabetes and risk of prostate cancer in a prospective cohort of US men. *Am J Epidemiol* 2005; **161**: 147–52.
2. Joentausta RM, Kujala PM, Visakorpi T, *et al.* Tumor features and survival after radical prostatectomy among antidiabetic drug users. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2016; **19** (4): 367–73.
3. Ravenna L, Principessa L, Verdina A, *et al.* Distinct phenotypes of human prostate cancer cells associate with different adaptation to hypoxia and pro-inflammatory gene expression. *PLoS One* 2014; **9** (5): e96250.
4. Freshney RI. Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications. London: Wiley-Blackwell, 2010. 564 p.
5. Vega-Avila E, Pugsley MK. An overview of colorimetric assay methods used to assess survival or proliferation of mammalian cells. *Proc West Pharmacol Soc* 2011; **54**: 10–4.
6. Ozdemir KG, Yilmaz H, Yilmaz S. In vitro evaluation of cytotoxicity of soft lining materials on L929 cells by MTT assay. *Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2009; **90** (1): 82–6.
7. Tubiana M, Malaise E. Comparison of cell proliferation kinetics in human and experimental tumors: response to irradiation. *Cancer Treat Rep* 1976; **60** (12): 1887–95.
8. Gluzman DF, Sklyarenko LM, Nadgornaya VA, Kryachok IA. Diagnostic immunocytochemistry of tumors. Kyiv: Morion, 2003. 156 c. (in Russian)
9. Detre S, Saccani Jotti G, Dowsett M. A «quickscore» method for immunohistochemical semiquantitation: validation for estrogen receptor in breast carcinomas. *Clin Pathol* 1995; **48**: 876–8.
10. Li W, Zhang X, Sang H, *et al.* Effects of hyperglycemia on the progression of tumor diseases. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 2019; **38**: 327.
11. Cutruzzola F, Giardina G, Marani M, *et al.* Glucose metabolism in the progression of prostate cancer. *Front Physiol* 2017; **8**: 97.
12. Newsholme EA, Dimitriadis G. Integration of biochemical and physiologic effects of insulin on glucose metabolism. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2001; **109** (2): S122–34.
13. Wilcox G. Insulin and insulin resistance. *Clin Biochem Rev* 2005; **26** (2): 19–39.
14. Klement RJ, Kämmerer U. Is there a role for carbohydrate restriction in the treatment and prevention of cancer? *Nutrition & Metabolism* 2011; **8**: 75.

15. Orgel E, Mittelman SD. The links between insulin resistance, diabetes, and cancer. *Current Diabetes Report* 2013; **13**: 213–22.

16. Tamada M, Nagano O, Tateyama S, *et al.* Modulation of glucose metabolism by CD44 contributes to antioxidant status and drug resistance in cancer cells. *Cancer Res* 2012; **72**: 1438–48.

17. Li W, Cohen A, Sun Y, *et al.* The role of CD44 in glucose metabolism in prostatic small cell neuroendocrine carcinoma. *Mol Cancer Res* 2016; **14** (4): 344–53.

FEATURES OF GLUCOSE METABOLISM IN HORMON-SENSITIVE AND RESISTANT HUMAN PROSTATE CANCER CELLS IN VITRO

O.O. Lykhova, N.O. Bezdieniezhykh, N.V. Vydasov,
T.P. Kozak, V.G. Lupan, V.F. Chekhun

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

Summary. Prostate cancer (PC) is less common in patients with diabetes. However, in combination with diabetes, PC is more aggressive and accompanied by metastasis to regional lymph nodes. **Aim:** to study the effect of insulin on the proliferation and glucose metabolism in PC cells. **Object and Methods:** the study was performed in vitro on human PC cell lines LNCaP (hormone-sensitive), Du-145, and PC-3 (resistant). The methods of cell culture, biochemical, molecular biological, immunological, and statistical methods were used in the study. **Results:** insulin increased glucose metabolism in LNCaP cells by 20% in all studied concentrations. However, in Du-145 cells, only high concentrations of insulin significantly increased the amount of metabolized glucose. Insulin increased the proliferation of LNCaP cells by 20–30% in all studied concentrations, but in Du-145 and PC-3 cells, high concentrations of the hormone led to inhibition of cell proliferation. Treatment of PC cells with insulin resulted in dose-dependent inhibition of CD44 expression in all three cell types. **Conclusions:** comparative analysis of the obtained results shows that the increase in the degree of PC cells malignancy is associated with a decrease in their sensitivity to the metabolic and mitogenic effects of insulin. CD44 can be an important and selective molecular target for the treatment of PC.

Key Words: prostate cancer, insulin, glucose, hormone-sensitive, hormone-resistant.

Адреса для листування:

Лихова О.О.
03022, Київ, вул. Васильківська, 45
Інститут експериментальної патології,
онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького
НАН України
E-mail: alexxdna@gmail.com

Одержано: 4.10.2021