

О.В. Кашуба

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

«ФУНДАМЕНТАЛЬНІ ЗАСАДИ БІОТЕРАПІЇ ЗЛОЯКІСНИХ НОВОУТВОРЕНЬ» (МІЖНАРОДНИЙ СИМПОЗІУМ)

Міжнародний науковий симпозиум «Фундаментальні засади біотерапії злоякісних новоутворень» відбувся 21–22 травня у Києві (Україна). Захід профінансовано з проекту VACTRAIN (TWINNING з використання протипухлинних вакцин на базі ДНК, № 692293) у рамках Програми Європейського Союзу з наукових досліджень та технологічного розвитку «Horizon 2020»; його проведення організовано співробітниками Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології (ІЕПОР) ім. Р.Є. Кавецького Національної академії наук України (НАНУ).

Основними темами симпозиуму були біотерапія захворювань на рак, а також вивчення нових мішеней для терапії; проблеми метастазування злоякісних новоутворень, роль мікрооточення у розвитку патологічного процесу; молекулярні механізми трансформації клітини; розробка нових методологій і проведення клінічних випробувань. Запрошені лектори, а також молоді вчені представили на симпозиумі результати своїх наукових досліджень. На конференції прозвучали лекції та обговорено стендові доповіді дослідників з України, Польщі, Латвії, Індії та Швеції.

Директор ІЕПОР ім. Р.Є. Кавецького НАНУ академік НАНУ В.Ф. Чехун дав змістовний огляд досліджень та міжнародної діяльності Інституту. Він окремо зазначив, що грант VACTRAIN допомагає дослідникам, особливо молодому поколінню, професійно рости. В.Ф. Чехун привітав усіх присутніх з ювілейним роком, коли святкується 100-річчя заснування Академії наук України. Слід відзначити, що місце проведення конференції — великий конференц-зал НАНУ — був очевидним вибором для цієї події.

Тепер зупинимось детальніше на усних і стендових доповідях, представлених на конференції. Г. Селіванова (Швеція) запропонувала нову концепцію, присвячену білку p53 — захиснику геному. Доповідач зазначила, що протеїн p53 — дволиккий Янус: «p53 — цілитель» та «p53 — убивця». Надзвичайно цікаво було дізнатися про успішні клінічні випробування нового лікарського препарату, заснованого на активації білка p53. Також оратор навести класифікацію дії різних препаратів, які активують p53 або блокують взаємодію p53 з білком MDM2, який є Е3 лігазою убівітину та контролює рівень протеїну p53 в клітині. Так, препарати, запропоновані для активації білка p53, в основному беруть участь в епігенетичних змінах, імунному контролі, метаболізмі,

а також у багатьох сигнальних шляхах клітини. Важливо знайти баланс між рівнем активації p53 та вищевказаними процесами у клітині, тому що гомозиготна делеція гена p53 призводить до виникнення пухлин у 100% вивчених експериментальних тварин, а тварини, яким ввели додатковий, третій алель гена p53 (супер p53), старіють передчасно.

В.О. Шляховенко (Україна) продовжив тему лікарських препаратів, обговоривши у своїй доповіді ензимотерапію раку, а саме використання рибонуклеаз (РНКаз) у лікуванні хворих зі злоякісними новоутвореннями. РНКаз каталізують розпад РНК на короткі фрагменти. Цитотоксичні ефекти РНКаз включають розщеплення РНК, що призводить до інгібування синтезу білка та індукції апоптозу, а у деяких випадках РНКаз стають джерелом мікроРНК. Тому привабливою ідеєю є використання таких ферментів, які вибірково атакують певні типи РНК у пухлинних клітинах (ПК), для більш селективної, нетоксичної терапії злоякісних новоутворень.

У стендових доповідях В. Борщовецької, Р. Ніколаєва, Х. Малишевої, О. Кеци, Ю. Лозовської (Україна) представлено дані щодо широкого спектра протипухлинних препаратів — від ДНК-метилтрансферази до лактоферину, що показує перспективу цього наукового напрямку. Вплив лактоферину на ріст пухлин в експериментальних тварин продемонстровано у доповіді Д. Сторчай (Україна). Так, навіть низькі концентрації лактоферину інгібують проліферацію клітин карциносаркоми Уокера.

Одним із важливих етапів розвитку злоякісних солідних пухлин є метастазування. Для того щоб метастазувати, тобто покинути первинну солідну пухлину, злоякісна клітина змінює свою морфологію. Л. Дробот (Україна) розповіла про пластичність ракових клітин, особливо про амебоїдну стадію епітеліально-мезенхімального переходу (ЕМП), який допомагає клітинам пухлин мігрувати та метастазувати. На відміну від нормального типу ЕМП, що спостерігається під час міграції стовбурових клітин нервового гребеня і під час заживлення ран, злоякісні клітини використовують ЕМП для метастазування. Важливу роль білка Ruk/CIN85 у контролі ЕМП показано на модельній системі, а саме клітинній лінії 4T1, отриманій з агресивної пухлини молочної залози.

Продовжуючи тему ЕМП, О. Кашуба (Україна) обговорила роль мітохондріального рибосомного білка S18–2 (MRPS18–2, S18–2) у цьому проце-

сі при захворюванні на рак передміхурової залози. Так, експресія білка S18–2 підвищується при прогресуванні захворювання, як було показано за допомогою клінічних зразків. Рівень індукції ЕМП корелює з рівнем експресії S18–2 у клітинних лініях, отриманих зі злоякісних пухлин передміхурової залози. Більше того, клітини показали підвищену міграційну активність за умови оверекспресії протеїну S18–2. Цей феномен зумовлено підвищеною експресією поверхневого білка CXCR4. Тобто білок S18–2 викликає ЕМП з використанням клітинного сигнального шляху TWIST2/E-кадгерин. Слід відзначити, що обидва протеїни — Ruk/CIN85 і MRPS18–2 — є новими перспективними мішенями для протипухлинної терапії.

О. Ліхова (Україна) представила дані з альтернативного підходу до вивчення ЕМП на прикладі ліній ПК, створених зі зразків операційного матеріалу. Показано, що ПК, які пройшли ЕМП, проліферують із вищою швидкістю, ніж клітини, які не змінилися морфологічно. Проте залишається питання, чи можна проводити пряму кореляцію між морфологією ПК та швидкістю проліферації.

Для вивчення ЕМП і метастазування ПК також запропоновано модельні системи *in vivo* (мишачі) з використанням клітинних ліній, що експресують певні білки вірусу імунодефіциту людини. Також порівнювали кількість метастаз при протипухлинній вакцинації експериментальних тварин. Так, у доповідях Д. Мезале та І. Фрідріхсоне (Латвія) висвітлено, що застосування вакцин на основі ДНК зменшує кількість метастазів при перещепленні *in vivo* клітин пухлинної лінії 4T1 (хіміорезистентна аденокарцинома молочної залози миші), що вказує на важливість подальшої розробки протипухлинних вакцин.

Протипухлинним вакцинам приділено велику увагу на конференції як перспективному напрямку антипухлинної терапії. О. Караман (Україна) представила дані щодо корекції пухлиноасоційованої анемії при використанні протипухлинних вакцин у модельних системах (миші). Так, введення експериментальних вакцин на основі клітинного антигену карциноми легені Льюїс із низькою ангіогенною активністю подовжує виживання мишей із трансплантованою карциномою. Використання такої вакцини зумовлює більш збалансований вміст цитокінів у сироватці крові тварин (зокрема підвищення концентрації TNF- α та контроль за рівнем IL-1), що сприяє збереженню функціональної активності клітинних протипухлинних ефектів, забезпечує антиметастатичну дію.

На конференції також обговорювалися нові підходи до створення протипухлинних вакцин, а саме: використання ліпосом для доставки вакцин (О. Дворщенко, Україна), лектину, отриманого з альбуменової залози та слизу *Helix pomatia*, як ад'юванта (В. Великий, Україна), ксеногенних ембріональних протеїнів (Т. Симчич, Україна), а також конкурентне інгібування (В. Петришак, Україна).

Н. Храновська (Україна) представила дані стосовно персоналізованих дендритних вакцин, які протягом останніх 10 років використовувалися для лікування хворих на недрібноклітинний рак легені у Національному інституті раку. О. Скачкова (Україна) обговорила створення нановакцин на основі дендритних клітин хворого, навантажених наночастками оксиду заліза (Fe₃O₄). Як правило, міграційна активність дендритних клітин знижена, як показано в експериментальних тварин на моделі саркоми S37. З метою підвищення міграційної активності дендритні клітини трансфіковано наночастками оксиду заліза, після чого на лімфатичні вузли експериментальних тварин діяло магнітне поле. Такі попередні результати є обнадійливими для створення нановакцин.

Цікавою була стендова доповідь Т. Козак (Україна), яка представила дані щодо використання вірусу хвороби Ньюкасла (ВХН, Newcastle disease virus) на основі його цитотоксичності для злоякісно трансформованих клітин. Так, показано, що ВХН має більшу цитотоксичність до клітин недрібноклітинного раку легені людини, ніж до нормальних клітин нирки. Важливість збереження поверхневих антигенів на клітинах при їх криозберіганні обговорено у роботі А. Гольцева (Україна).

Дискутуючи про протипухлинні вакцини та імунну відповідь, неможливо оминати увагою роль мікрооточення у розвитку та лікуванні новоутворень. Розвиток або інгібування росту солідних пухлин, як правило, залежать від мікрооточення, в якому відбувається взаємодія між ПК, а також клітинами строми, фібробластами, клітинами крові, жировими клітинами тощо. Під час прогресування пухлини баланс руйнується. Одним із важливих факторів росту пухлини є ангіогенез, завдяки якому збільшується надходження кисню та поживних речовин до ПК, що пришвидшує їх проліферацію. Мікрооточення також контролює міграцію ПК та метастазування. А. Тихомиров (Україна) представив дані про роль плазміногену у контролі ангіогенезу. Коротка форма плазміногену (Lys-PG) здатна знизити проангіогенний потенціал тромбоцитів за рахунок інгібування секретії фактора росту ендотелію судин (VEGF) і підвищення утворення ангіостатинів. Л. Капустяненко (Україна) озвученими даними підтримала висновок про обмеження проангіогенного потенціалу тромбоцитів короткою формою плазміногену.

Важливим гравцем у мікрооточенні пухлини є клітини, похідні зі стовбурових мезенхімальних клітин. Особливості впливу мультипотентних мезенхімальних стовбурових клітин (МПМСК) на розвиток новоутворень молочної залози вивчено Т. Гергелюк (Україна). Так, показано, що похідні МПМСК проявляли цитостатичний ефект, а також гальмували міграцію ПК. Л. Кладницька (Україна) виявила, що МПМСК, виділені з кісткового мозку (КМ) та жирової тканини (ЖТ), відрізняються за експресією низки білків. При використанні алогенних

МПСК КМ та ЖТ виявлено позитивну кореляцію між кількістю лімфоїдних клітин у тимусі та його масою в експериментальних тварин. Проте більш активними в цьому плані були похідні МПСК КМ.

ЖТ відіграє важливу роль у розвитку пухлинного процесу (рак шлунка, молочної залози, товстого кишечника та яєчника). Модифікований окисно-відновний стан пухлини є фактором, який пошкоджує мітохондрії адипоцитів та перепрограмує їх у пухлиноасоційовані адипоцити (ПАА), які характеризуються проонкогенними властивостями. І. Ганусевич (Україна) повідомила, що дисфункціональна ЖТ при раку шлунка бере участь у формуванні його агресивного фенотипу; кількість ПАА пов'язана з ростом пухлини та метастазуванням. Л. Бубновська (Україна) підняла тему впливу ожиріння на характеристики вищевказаних захворювань, особливо аденокарциноми шлунка. Також приділено увагу інфільтрованим у пухлину лімфоцитам та гіпоксії. Встановлено, що при захворюванні на рак шлунка підвищені значення індексу маси тіла корелювали з більшою кількістю ПАА, а також зі зменшенням кількості інфільтрованих у пухлину лімфоцитів (Т-клітини CD8⁺ та CD45RO⁺), проте не з рівнем гіпоксії.

Детальне вивчення молекулярних механізмів, які лежать в основі процесів, що зумовлюють прогресування та метастазування, може сприяти ідентифікації нових мішеней для протипухлинної терапії, ранньої або уточненої діагностики, оцінки прогнозу перебігу захворювання, а також для відкриття нових шляхів боротьби із цим страшним ворогом. І. Гордієнко (Україна) доповіла про поверхневий рецептор CD180, який показує синергію із CD150 у регулюванні хронічного лімфолейкозу (ХЛЛ). CD150 та CD180 у разі їх коактивації можуть блокувати сигнальні шляхи, направлені на виживання клітини, що може сприяти менш агресивному перебігу ХЛЛ. А. Матвеева (Україна) показала, що канонічний шлях TGFβ/SMAD не є активним у клітинах ХЛЛ через низьку експресію гена *SMAD4* або відсутність його транскрипту. Стан фосфорилування SMAD2/3 буде детально з'ясовано в майбутньому. Сигнальний шлях JAK/STAT5, індукований IL-2, також переважно інактивований у клітинах ХЛЛ. Інактивація шляху JAK/STAT5 може бути пояснена високим рівнем розчинного IL2RA, як повідомлялося раніше. Іншою можливістю може бути гальмування фосфорилування STAT2, що призводить до неможливості утворення активних транскрипційно-білкових гетеродимерів. Ще один фактор транскрипції, а саме PU.1, експресується на значно нижчому рівні у клітинах ХЛЛ, ніж у нормальних В-клітинах периферичної крові, як визначила В. Гурін (Україна). Більше того, рівень експресії PU.1 позитивно корелює з експресією CD150 у клітинах ХЛЛ. Цікаві дані щодо модуляції транскрипції цитокінів при дії інгібіторів PARP-1 на клітини гострого моноцитарного лейкозу навела Ю. П'єтзак (Польща). Інгібітори

PARP-1, які уже використовуються при терапії захворювань на рак, можуть зупинити процес імунотолерантності при гострому моноцитарному лейкозі.

Експресія генів у солідних пухлинах може регулюватися внаслідок не тільки активації сигнальних молекул, а й чинників мікрооточення. О. Гнатюк (Україна) розповіла про вплив гіпоксії на експресію генів, індукованих сигнальним ферментом IRE1 у клітинних лініях, отриманих із пухлин молочної залози і гліоми. Т. Скатерна (Україна) навела дані, які свідчать, що адаптерний білок Ruk/CIN85 є концентраційно-регульованим компонентом сигнальних шляхів клітини, які відповідають за контроль експресії металопротеїназ, а отже, і вироблення ангіостатинів та модуляцію інвазії. Д. Гур'янов (Україна) відмітив важливість взаємодії короткочасної домени PH білка BCR під час транслокації у ПК.

Як відмічено вище, знання молекулярних механізмів трансформації клітини дозволяє підібрати мішені для використання у діагностиці та прогнозуванні перебігу захворювання. Велика кількість доповідей була присвячена цьому важливому питанню. Так, Г. Геращенко (Україна), вивчаючи патерн експресії генів у зразках новоутворень передміхурової залози залежно від наявності злитого гена *TMPRSS2:ERG*, запропонувала набір із 9 генів (*AR, ESRI, KRT18, MMP9, PRLR, SRD5A2, PCA3, HOTAIR* та *SCHLAP1*), експресія яких змінена найбільше у злоякісних пухлинах передміхурової залози порівняно з умовно нормальною тканиною і аденомами, для можливої діагностики. О. Кириченкова (Україна) показала, що метод вивчення втрати гетерозиготності корисно застосовувати для прогнозування ефективності імунотерапії і результатів лікування хворих на рак яєчника, тому що такий аналіз з використанням маркерів D6S2678 (клас I) і D6S2925 (клас III) дозволяє визначити соматичні перегрупування регіону HLA.

Важливо розробляти нові методики для діагностики, особливо такі, які дозволяють використовувати біологічні рідини, тобто кров, сечу тощо. О. Манковська (Україна) доповіла, що для вивчення метилювання промоторних ділянок генів-супресорів росту злоякісних пухлин ДНК виділено із сечі і крові хворих на рак сечового міхура. Виявлено, що промоторні ділянки гена *NKX3.1* метильовано у 100% випадків, а гена *RASSF1A* — у 35 із 36 випадків. У разі раку передміхурової залози відносна експресія генів *AurA, AurB, AurC, BRAF, EGF* та *YWHAZ* була підвищена порівняно зі здоровими особами, і такі зміни виявляли як у сечі, так і в плазмі крові. Ця робота показує перспективу використання запропонованої методики для ранньої діагностики. А. Робашкевич (Польща) запропонувала використовувати визначення експресії гена *PARP1*, що контролює структуру хроматину, для оцінки активації певних ділянок хромосом, а також активації енхансерів і промоторів онкогенів та генів-супресорів росту пухлини.

Перспективним напрямом для ранньої діагностики є вивчення змін в експресії довгих некодуючих РНК та мікроРНК. Н. Малишок (Україна) показала, що довга некодуюча РНК bc200 та XIST беруть участь у розвитку деяких солідних пухлин шляхом зв'язування специфічних мікроРНК. Встановлено, що сімейство мікроРНК miR15 зв'язується з XIST та bc200 і таким чином впливає на епігенетичне регулювання. Визначення експресії певних мікроРНК дозволяє прогнозувати перебіг захворювання для епітеліальних солідних пухлин, як показано у роботах В. Галицького (Україна), та для гліом — як свідчать праці Ю. Лахановської (Україна). Цікавими були доповіді Т. Борікун та Т. Задворного (Україна), в яких представлено нові маркери для прогнозу перебігу захворювань на рак молочної та передміхурової залози. Т. Борікун запропонувала нову панель мікроРНК, експресію яких вивчали у сироватці крові пацієнтів із раком молочної залози, а саме miR-10b, miR-221 та miR-200b. Т. Задворний показав, що експресія генів, які характерні для стовбурових клітин, а саме *Oct4* і *Sox2*, підвищується у зразках пухлин передміхурової залози (особливо на II стадії прогресування і при >7 за шкалою Глісона).

Важливо відмітити перспективність пошуку нових панелей для ранньої діагностики та прогнозу. Накопичений інформаційний масив щодо експресії, поліморфізму певних генів та мутацій дозволяє проводити аналіз даних *in silico* з метою концентрації найважливіших змін, що супроводжують розвиток і прогресування злоякісних новоутворень. А. Алексеєнко (Швеція) у своїй доповіді про системну біологію обговорив новий веб-ресурс EviNet, створений для аналізу нових, експериментально визначених наборів генів. Основними перевагами цього аналізу є застосовність до будь-яких генів, що знаходяться у відкритих базах даних, а не тільки для генів, які належать до певного класу або певного клітинного сигнального шляху. Важливим є те, що платформа EviNet здатна об'єднувати гени за допо-

могою різних молекулярних механізмів, а не в межах однієї високопродуктивної платформи, а також велике значення має її висока статистична потужність. Також представлено нову версію популярної платформи FunCouP.

Д. Цимбал (Україна) розповіла про аналіз патерну експресії генів із застосуванням системи PANTHER. Встановлено, що пригнічення сигнального ферменту IRE1 у клітинах гліоми U87 призводить до глибоких змін у транскрипції численних груп генів, тобто до перепрограмування геному. Найсильніші зміни характерні для генів, пов'язаних з процесами диференціації клітин, регулювання передачі сигналів і проліферації клітин.

Важливим є не тільки статистична обробка великого масиву даних, а й моделювання взаємодій генів, протеїнів, прогнозу перебігу захворювання. О. Цуварев (Україна) представив дані з модулювання взаємодії білка AIMP1/p43 і TLR2 із використанням біоінформаційних інструментів BioGRID 3.4, PRABI та PrDos.

О. Палійчук (Україна) представила модель прогнозу вірогідності виникнення злоякісних новоутворень жіночих репродуктивних органів, використовуючи аналіз поліморфізму генів у разі спадкового раку молочної залози та яєчника. Модель, яка включала поліморфні варіанти генів *T397ESR1* та *Cyp2D6*4*, дозволяла прогнозувати виникнення новоутворень найкраще ($p < 0,001$).

Отже, під час симпозиуму представлено цікаві, перспективні та спрямовані в майбутнє роботи. Важливо, що сучасні дослідники звертають увагу на етичні аспекти експериментів. Історичний нарис і етичні питання досліджень злоякісних пухлин висвітлено у доповіді Ч. Мітри (Індія). Без сумнівів, лікарям і вченим доведеться пройти ще довгий шлях, проте наразі і в недалекому майбутньому все більше хворих на рак успішно лікуються. Основними проблемами залишаються рання діагностика та профілактика захворювань на рак, розв'язанню яких сприяють роботи в описаних напрямках.