

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ПАТОЛОГІЇ, ОНКОЛОГІЇ
І РАДІОБІОЛОГІЇ ім. Р.Є. КАВЕЦЬКОГО



**НАУКОВО-ПРАКТИЧНА КОНФЕРЕНЦІЯ
МОЛОДИХ ВЧЕНИХ «ФУНДАМЕНТАЛЬНА МЕДИЦИНА:
ІНТЕГРАЛЬНІ ПІДХОДИ ДО ТЕРАПІЇ ХВОРИХ
З ОНКОПАТОЛОГІЄЮ»**

**4–5 лютого 2019 р.
Київ**



СУЧАСНІ ВЕКТОРИ ФУНДАМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ В КОНТЕКСТІ ПРОБЛЕМ КЛІНІЧНОЇ ОНКОЛОГІЇ**В.Ф. Чехун***Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, Київ, Україна*

Дослідження та виклики ХХІ століття в галузі клінічної онкології впливають на зміну парадигми в структурі фундаментальних досліджень. Стратегія «швидкого поступу широким фронтом» до горизонту, за яким знаходиться успішне подолання раку, змінюється на тактику «захоплення» молекулярно-біологічних вершин, що дозволяє виявляти маркери і підбирати засоби до ключових мішеней у гетерогенній популяції пухлинних клітин з ознаками величезної міжіндивідуальної мінливості злоякісного процесу. Так, зокрема, Нобелівською премією 2018 року в галузі медицини відзначено відкриття протипухлинної терапії, здійснюваної шляхом прицільного сповільнення негативної імунної регуляції. Застосування таргетних препаратів — антагоністів рецептора PD-1 або його ліганда PD-L1, спрямованих на інгібування контрольних ланок у мережі Т-клітинного протипухлинного імунітету, здійснило революцію в клінічній онкології.

Водночас як механізми, так і наслідки репрограмування імунокomпетентних клітин не до кінця з'ясовані. Зокрема, в роботі В. Routy та співавторів, опублікованій в журналі «Science» (2018), показана достовірна кореляція між мікробіотою кишечника та клінічною ефективністю анти-PD-1 терапії. Зазначений результат зобов'язує звернути особливу увагу на раніше опубліковану статтю S. Bullman та співавторів (Science, 2017) щодо персистенції певної бактеріальної мікрофлори в тканині пухлин та метастазів колоректального раку (яка може бути важливою складовою пухлинного процесу і формування факторів пухлинного мікрооточення) та щодо перспектив використання при лікуванні раку антибактеріальних препаратів. Сучасні можливості аналізу складових злоякісної трансформації та пухлинного мікрооточення дозволяють розробити принципово нову методологічну та терапевтичну платформу для інноваційної та трансляційної біомедицини.

Уже сьогодні фундаментальні знання, які активно імплементуються через мережу відкритого доступу до інноваційних технологій «Omics», дозволяють розглядати пухлинну хворобу як системний процес, що характеризується динамічною турбулентністю у взаємодії пухлини та організму. Еволюційні основи адаптації цих процесів базуються на активній проліферації гетерогенності пулу злоякісних клітин. Виявлення природи та ідентифікація факторів гетерогенності є стержнем сучасної патобіологічної науки та ключовою проблемою клінічної онкології.

Таким чином, концентрація науково-методичного та клінічного ресурсу навколо з'ясування механізмів молекулярно-генетичного і епігенетичного розбалансування; факторів контролю епітеліально-мезенхімального переходу; процесів пластичності та репрограмування; порушення та регуляції метаболічних процесів; визначення ролі мікробіоти пухлинного вогнища та більш виражена ідентифікація ролі імунної системи в злоякісному процесі забезпечать вагомий поступ у вирішенні нагальних потреб клінічної онкології.

РОЗШИФРУВАННЯ ІНТЕГРАЛЬНИХ МЕХАНІЗМІВ РЕГУЛЯЦІЇ МЕТАБОЛІЗМУ Є ФУНДАМЕНТОМ ДЛЯ РОЗРОБКИ ІНТЕГРАЛЬНИХ ШЛЯХІВ ТЕРАПІЇ ОНКОЛОГІЧНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ**О.Г. Мінченко, Д.О. Цимбал***Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ, Україна*

Пізнання молекулярно-генетичних основ регуляції метаболізму і підтримання гомеостазу є надзвичайно важливим не лише для розуміння механізмів життєдіяльності організмів, їх динамічної адаптації до різноманітних впливів, а й для пізнання шляхів розвитку патологічних станів, спільного і відмінного у функціонуванні геному за різних патологій, а найголовніше — розшифрування молекулярних основ порушення інтегральних механізмів регуляції життєвих процесів. Добре відомо, що найголовнішим інтегральним регулятором практично всіх процесів життєдіяльності організмів є біологічний годинник, який являє собою досить складну і високоточну систему контролю метаболічних і фізіологічних процесів на рівні організму, а також і на рівні ізольованих клітин. Причому порушення функції біологічного годинника за патологічних станів, у тому числі й у клітинах злоякісних пухлин, є надзвичайно важливим для розуміння інтегральних механізмів регуляції життєдіяльності клітин, в основі яких лежить функціональне репрограмування геному. І особливо це вагомо для розуміння циклічного характеру перебігу різних біологічних процесів не лише на рівні організму, а й на рівні окремих клітин.

Важливим компонентом інтегральних механізмів регуляції практично всіх процесів життєдіяльності і підтримання гомеостазу є стрес ендоплазматичного ретикулума, а тому йому належить ключова роль у розвитку не лише метаболічних, а також і онкологічних захворювань досить складними шляхами, включаючи репрограмування геному на виживання або смерть клітин. І в цих процесах задіяні всі компоненти клітини — від плазматичної мембрани та ендоплазматичного ретикулума до ядра, мітохондрій та інших структур. Більше того, саме стрес ендоплазматичного ретикулума забезпечує резистентність пухлинних клітин до хімічних сполук, що використовуються як терапевтичні агенти.

У зв'язку з цим дослідження молекулярно-генетичних основ злоякісної трансформації клітин мають ґрунтуватися на глибоких знаннях про функціональну роль окремих компонентів геному в інтегральних механізмах регуляції процесів життєдіяльності і підтримання гомеостазу, причому не лише генів, що кодують структурні та регуляторні протеїни, а й некодуючі транскрипти, кількість яких як у нормальних, так і пухлинних клітинах в десятки разів більша за кількість кодуючих транскриптів. Функціональне значення некодуючих макроРНК і мікроРНК інтенсивно досліджується, оскільки саме ці РНК, як і низка інших некодуючих РНК, є надзвичайно важливими регуляторами різноманітних процесів, у тому числі й злоякісного росту.

Таким чином, розробки інтегральних шляхів терапії онкологічних захворювань мають ґрунтуватися на фундаментальних знаннях інтегральних механізмів регуляції метаболізму та підтримання гомеостазу.

REPROGRAMMING OF NORMAL AND CANCEROUS CELLS FOR CANCER THERAPY

E.V. Kashuba

*R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology, NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine
Department of Microbiology, Tumor and Cell Biology (MTC), Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden*

In the talk, a summary on the basic knowledge on stem cells and their use in medicine was presented. What is the stem cell, actually? It can be defined as an unspecialized cell that is capable of dividing and renewing itself for long periods, i.e. infinitely. Stem cells can give rise to specialized cells. The pioneers in the stem cell research were Ernest McCulloch and James Till, who first isolated hematopoietic stem cells from bone marrow of mice and demonstrated the formation of colonies in the recipient spleen (recipients were irradiated mice) in 1962.

There are totipotent (a morula stage in the embryonic development) and pluripotent (the blastocyst in embryonic development) stem cells. From the pluripotent stem cells the specialized cells could be derived, representing all three layers, i.e. ectoderm, endoderm and mesoderm. Also, there are adult or multipotent stem cells that can give rise to several lineages, i.e. hematopoietic stem cells, skin and gut epithelial cells.

Pluripotent stem cells are/could be a source for the «exchange» cells or tissues to treat many diseases, such as Parkinson's and Alzheimer's diseases, spinal cord injury, burns, stroke, heart disease, diabetes, osteoarthritis and rheumatoid arthritis. The summary on clinical trials, concerning stem cell therapies could be found at a website <http://www.clinicaltrials.gov/>. Few examples, such as ALLO-CORD (HPC Cord Blood), LAVIV (Azficel-T), Fibrocell Technologies, MACI (Autologous Cultured Chondrocytes on a Porcine Collagen Membrane), CLEVECORD (HPC Cord Blood), GINTUIT (Allogeneic Cultured Keratinocytes and Fibroblasts in Bovine Collagen), etc were mentioned.

An exiting chapter in the stem cell research started in 2006, when Shinya Yamanaka and co-workers presented induced pluripotent stem cells (iPSCs), produced from mouse fibroblasts by overexpression of four factors, namely c-Myc, Oct4, Sox2 and Klf4. Later on, reprogramming of differentiation was performed in human adult fibroblasts. This is associated with changes in DNA methylation, chromatin structure and in gene expression pattern. The iPSCs started the new era of regeneration medicine. Despite a great progress, for example, in creation of insulin-produced cells from iPSC sim mouse models, there is a risk for developing of tumors, especially, teratomas and others.

Also, «cancer stem cell» (CSC) was discussed as a cell within a tumor that possesses the capacity to self-renew and to form heterogeneous lineages of cancer cells forming tumor (LGR5, CD133).

The solid tumor differentiation therapy was exemplified by treatment of sarcomas and liposarcomas by retinoids, histone deacetylase inhibitors (HDACI) and PPAR γ agonists. Search for N-MYC inhibitors for neuroblastoma treatment was also discussed.

Briefly, own work on the mitochondrial ribosomal protein S18–2 (MRPS18–2) was mentioned as well.

ADAPTOR/SCAFFOLD PROTEINS AS REGULATORY FACTORS OF EPITHELIAL-TO-MESENCHYMAL TRANSITION

L.B. Drobot

Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

Reprogramming of carcinoma cells in the course of reversible epithelial-to-mesenchymal — mesenchymal-to-

amoeboid transitions (EMT-MAT), currently referred as epithelial-mesenchymal plasticity (EMP), is associated with acquisition of a more aggressive tumor phenotype tightly interrelated with conversion of noninvasive tumor cells into stem-like states, increase of therapy resistance and metastatic potential. Signaling strategies that orchestrate EMP involve context-dependent dynamic changes in extracellular milieu, consequent modulation of receptor-mediated signaling networks providing a fine control of epigenetic events, gene and miRNA expression patterns, translation and post-translational modifications, cell morphology and behavior. Adaptor/scaffold proteins of multi-modular structure (commonly without enzymatic activity) function as molecular hubs in protein interaction networks. Their capacity to organize large, temporary protein complexes by linking proteins together in a regulated and selective fashion makes them of outstanding importance in the establishment and maintenance of specificity and efficiency of all known signal transduction pathways. Given the important role of adaptor proteins in propagating cellular signals, it is quite likely that their dysfunction may be involved in the control of EMP. The experimental data was demonstrated that allow considering adaptor/scaffold protein Ruk/CIN85 as a concentration-dependent reprogramming factor exploiting EMP to regulate tumor phenotype.

IMMUNOLOGY OF MALIGNANT NEOPLASMS: CONTEMPORARY VIEWS, THEORETICAL AND APPLIED ASPECTS

N. Khranovska¹, O. Skachkova¹, O. Gorbach¹, M. Inomistova¹, V. OreP

¹*Research Laboratory of Experimental Oncology, National Cancer Institute, Kyiv, Ukraine*

²*Research Laboratory of Medical Physics and Bioengineering, National Cancer Institute, Kyiv, Ukraine*

Studies in the field of molecular tumor immunology and the possibilities of the immunological response modulation have made significant progress. According to modern ideas, a series of sequential events, called «cancer-immunity cycle» should occur for the development of an antitumor immune response leading to the destruction of tumor cells. At the same time, the place of immunotherapy in the treatment of malignant neoplasms is not defined definitively. One of the hypotheses that explain this fact is the notion of the significant role of the immune system in the course of malignant diseases and its possible insolvency in certain stages of the tumor progression. The breakthrough in the cancer immunotherapy, which took place in recent years, is associated with an understanding of the mechanisms of interaction between the tumor and the immune system, features of T-cell regulation. As a result, a large number of studies have appeared that have outlined ways to change or restore the immune response to a tumor. Currently, such approaches to tumor immunotherapy are being used or under development: antitumor vaccines, including based on dendritic cells (DCs), monoclonal antibody, cytokines, checkpoint inhibitors, activated lymphocytes, genetically modified T-lymphocytes (CAR-T).

In Ukraine, R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology, NAS of Ukraine and National Cancer Institute of Ukraine are engaged in the development of tumor vaccines. Novel DCs technologies which are characterized by several cycles of innovation have been elaborated: 1. DCs activation and maturation with IFN- α plus toll-like receptor agonist; 2. DCs loaded with mechanically modified microparticles of tumor cells; 3. DCs loaded

by PLGA nanoparticles containing antigenic tumor material; 4. DCs loaded with lysate of tumor cells obtained under the influence of cytotoxic lectins of *B. subtilis*; and 5. DCs loaded with magnetic nanocomplex. High therapeutic effectiveness of these technologies has been demonstrated in pre-clinical and clinical settings. In experimental studies found that DCs based vaccine therapy is an effective method for metastasis burden decreasing and primary tumor growth inhibition DC-vaccine therapy contributes significantly to improving the results of non-small cell lung cancer, ovarian and renal cancer patients treatment.

Thus, cancer immunotherapy — treatments that harness and enhance the powers of the immune system to fight cancer, represents the most promising new cancer treatment approach.

МЕТАБОЛІЧНИЙ СИНДРОМ І РАК: РОЛЬ ДИСФУНКЦІОНАЛЬНОЇ ЖИРОВОЇ ТКАНИНИ

І.І. Ганусевич, А.П. Бурлака

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

Ожиріння, особливо вісцеральне (або центральне), яке супроводжується порушенням ліпідного балансу, вважається одним з основних факторів ризику розвитку серцево-судинних захворювань, зокрема гіпертонії та цукрового діабету 2-го типу, для якого характерні гіперглікемія та резистентність до інсуліну. Сукупність наведених ознак являє собою так званий метаболічний синдром. Сучасні епідеміологічні дослідження свідчать, що метаболічний синдром та, зокрема, ожиріння є важливими факторами розвитку та перебігу деяких видів раку. Деякі типи пухлин (шлунка, молочної залози, прямої кишки, нирки, яєчника) та їх метастази анатомічно близькі з жировою тканиною, тож адипоцити є одним з основних компонентів мікрооточення цих пухлин та можуть впливати на пухлинну прогресію. На сьогодні жирова тканина вважається не лише ізолюючою та енергозберігаючою тканиною, але й органом, здатним регулювати системний енергетичний і метаболічний гомеостаз. Гіпертрофована і дисфункціональна жирова тканина при ожирінні характеризується високим рівнем ліполізу та вільних жирних кислот, які окиснюються і спричиняють токсичний вплив, хронічним запаленням та накопиченням макрофагів і нейтрофілів, гіпоксією та активацією гіпоксія-індукованого фактора (HIF), високими рівнями активних форм кисню та деструкції позаклітинного матриксу. При взаємодії жирової тканини з пухлинними клітинами адипоцити перепрограмуються в пухлиноасоційовані адипоцити (ПАА). ПАА є головним джерелом енергії для клітин пухлини та секрети адипокінів, які стимулюють пухлинну прогресію. Метаболічні взаємодії між ПАА і пухлинними клітинами являють собою «метаболічний симбіоз», тобто пухлини, які розвиваються в оточенні жирової тканини, є залежними від мітохондріального β-окиснення жирних кислот, необхідного для продукції АТФ. Таким чином, складні взаємодії між пухлиною та жировою тканиною сприяють прогресуванню онкологічного захворювання. Тож дослідження механізмів симбіозу пухлинних клітин і адипоцитів та розуміння біології ПАА в мікрооточенні пухлини створять підґрунтя для нових підходів у сучасній онкології, а саме нададуть можливість визначити метаболічні мішені і новий клас сполук для лікування раку,

а зміни в способі життя з метою підтримання оптимальної маси тіла дозволять розглядати як стратегію профілактики раку та підвищення виживаності.

TECHNOLOGY FOR GENERATION OF TRANSGENIC ANIMAL MODELS FOR FUNCTIONAL INVESTIGATION OF THE ERBB2 RECEPTOR

T.L. Syvyk¹, A.E. Syvyk²

*¹Bila Tserkva National Agrarian University, Bila Tserkva,
Ukraine*

²Blinn College 902, Brenham, USA

Laboratory animals with natural or artificial mutations close to the relevant human disorders are used for the purpose of conducting preclinical drug studies. Today, mice are most widely used species as model animals for such studies. The transgenic technology, based on the modification of the fertilized egg or early embryo, is well-developed for these animals. However, for the preclinical studies, rats are more adequate models for they are physiologically much closer to humans. For the first time, via the modification of male reproductive stem cells, we created a clonal model of rats with inducible expression of a dominant negative form of transmembrane ERBB2 protein in the spermatogenic cells. Considering that this protein is responsible not only for a rapid increase in the population of spermatocytes but also for at least one-third of the of the breast cancer, we have conducted a series of experiments.

Aim: generation of a clonal transgenic model of rats with inducible expression of a dominant negative form of the ERBB2 receptor for the investigation of the functional role of this protein at the cellular and molecular levels.

Materials and methods. The transgenic rat was created by direct modification of male germ stem cells derived from previously generated genetically modified donors that simultaneously express inducible Cre recombinase and a green fluorescent protein. These stem cells were further modified by a Sleeping Beauty transposon-based vector containing a truncated form of the ERBB2 protein. Modified clonally selected spermatogonia were transplanted into testes of chemically sterilized young male recipients. Spectomagonal cells isolated from the tissues of the offspring of the newly generated model animal line EGFP/Cre/DN-ERBB2 have been used for comparative studies of cell growth dynamics, as well for molecular study of the activity of specific proteins involved in ERBB2 induced signaling pathways.

Results. We have successfully generated clonal lines of spermatogonial stem cells of rats and animals that express the inducible Dominant-Negative form of the protein ERBB2. The clonal origin of the model allowed for an unbiased morphological and molecular comparison of cells with a natural and interrupted function of the ERBB2 receptor, as well as assessing the dynamics of cellular development *in vitro* and *in vivo*.

Conclusion. The obtained animals proved the possibility of clonally targeted creation of model rats by an alternative spermatogonia mediated method. The Western blot analysis of induced and non-induced cells revealed significant differences in the number and phosphorylation of important proteins involved in signaling pathways mediated by the ERBB2 protein. The obtained models can be used for further research in order to identify new potential target molecules for effective anti-cancer drugs against malignancies that involve the ERBB2 receptor.

ОНКОЦИТОМА НИРКИ: ЕПІДЕМІОЛОГІЧНА ТА МАКРОСКОПІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА

В.В. Барановська¹, Л.М. Захарцева¹, А.М. Романенко²

¹Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця

²ДУ «Інститут урології НАМН України», Київ, Україна

Онкоцитома — доброякісна пухлина, що становить 5% усіх тубулярних новоутворень нирки, видалених хірургічно. Згідно з даними ВООЗ, у структурі захворюваності переважають чоловіки (вдвічі частіше), а піком виявлення онкоцитоми вважається 7-ма декада життя. Як при інструментальній візуалізації, так і при макроскопічному дослідженні значну роль у діагностиці відіграє центральний рубець та типовий охряний колір. Гістологічно пухлина складається з типових округлих еозинофільних клітин із центрально розташованим ядром.

Мета: визначити вікове та статеве переважання онкоцитоми нирки (ОН) протягом 5 років спостереження, виявити варіації розміру пухлини та її макроскопічні особливості.

Об'єкт і методи. Ми дослідили історії хвороб пацієнтів з клінічно виявленим новоутворенням, які перебували в Інституті урології в період 2012–2016 рр., з характерною для ОН макроскопічною характеристикою. Для верифікації діагнозу використовувався архівний матеріал — парафінові блоки та зрізи, пофарбовані гематоксиліном та еозином, імуногістохімічне дослідження (маркери Vimentin, CK7, CD117).

Результати. Серед досліджених пацієнтів (53 особи) гістологічно було верифіковано ОН у 73,1% (38 випадків з 53), серед них 39,5% (15 пацієнтів) — жінки, 60,5% (23 пацієнти) — чоловіки. Середній вік пацієнтів з ОН становив 60,1 року (мінімальний — 37 років, максимальний — 84 роки): жінок — 61,3 року, чоловіків — 59,2 року. Середній розмір пухлини при макроскопічному дослідженні післяопераційного матеріалу сягав 46,8×42,5 мм (максимальний діаметр — 90 мм, мінімальний — 18 мм). У 36,8% (14 випадків) виникали крововиливи в паренхіму пухлини, у 21,1% (8 випадків) — центральний зірчастий рубець. Типові для ОН відтінки було описано у 76,3% випадків. У 100% випадків ОН відмічалися типові для них гістологічні зміни.

Висновок. Серед досліджуваних пацієнтів ОН трапляється частіше у чоловіків (вікове співвідношення чоловіків і жінок — 1:1,53 відповідно), діагностується після 60 років у 55,3% випадків. Середній розмір ОН становить 46,8×42,5 мм. Типову для ОН знахідку — центральний рубець — було виявлено у 21,1% випадків.

НОВІ ПІДХОДИ ДО ХІРУРГІЧНОГО ЛІКУВАННЯ РАКУ ПРАВОЇ ПОЛОВИНИ ОБОДОВОЇ КИШКИ

О.А. Біленко, І.Л. Маланченко

Одеський національний медичний університет,
Одеса, Україна

За останні кілька десятиліть в Україні спостерігається безперервне зростання захворюваності на рак правої половини ободової кишки (РППОК). На частку РППОК припадає більше третини випадків. Хоча радикальні резекції ободової кишки, особливо її правих відділів, вва-

жаються технічно простими, результати хірургічного лікування залишаються гіршими, ніж при раку лівої половини. Одним із факторів, здатних вплинути на результати лікування даної категорії хворих, є впровадження методики D3-лімфодисекції разом з СМЕ (повна мезоколонектомія) і CVL (центральне лігування судин), які були описані W. Hohenberger. Цей принцип був застосований аналогічно виконанню мезоректумектомії при раку прямої кишки R.J. Heald, що дозволило істотно знизити частоту місцевих рецидивів.

Мета: провести попередній аналіз результатів D2- і D3- лімфодисекцій при лікуванні хворих на РППОК.

Об'єкт і методи. На базі ООД за період з 2016 по 2018 р. було прооперовано в радикальному обсязі 157 пацієнтів, з них у 11 виконана радикальна правобічна геміколектомія з D3-лімфодисекцією і тотальною мезоколонектомією, у решти — традиційна правобічна геміколектомія. При виконанні розширеного обсягу оперативного втручання керувалися такими принципами: тотальна мезоколонектомія з дотриманням футлярно-фасціальної будови в межах ембріологічних шарів, D3-лімфодисекція, що передбачає видалення параколичних, метаколичних і апікальних лімфовузлів, «висока» перев'язка судин, зміна парадигми ходу мобілізації від латерально-медіального при традиційному підході до медіально-латерального, дотримання принципу «no touch».

Результати. Хірургічні втручання з D3-лімфодисекцією супроводжувалися незначним збільшенням часу операції (до 30 хв). Одним зі специфічних ускладнень даної операції була пролонгація лімфореї. Летальність у досліджуваній групі не відзначалася. Отримані результати дозволяють оцінити правосторонню геміколектомію з тотальною мезоколонектомією і D3-лімфодисекцією як втручання, яке дає можливість видалити більшу кількість регіонарних лімфовузлів, що, ймовірно, дозволить знизити частоту місцевих рецидивів і підвищити загальну виживаність хворих.

Висновок. Виконання розширеної D3-лімфодисекції не супроводжується підвищенням рівня післяопераційних ускладнень і летальності у даної категорії хворих. Для обґрунтованого доказу передбачуваного поліпшення віддалених результатів потрібно продовжити дослідження. Актуальною залишається можливість впровадження цього оперативного методу в якості стандарту для широкого використання у даної групи хворих із виконанням всіх вимог онкологічної радикальності без підвищення частоти ускладнень.

ЗВ'ЯЗОК ЕКСПРЕСІЇ ОНКОСУПРЕСОРНИХ мікроРНК-320a ТА -200b З ЧУТЛИВІСТЮ ДО НЕОАД'ЮВАНТНОЇ ПОЛІХІМІОТЕРАПІЇ У ХВОРИХ НА РАК МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ

Т.В. Борікун

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

Вдосконалення підходів до лікування хворих на рак молочної залози (РМЗ) залишається однією з актуальних проблем онкології у зв'язку з високим рівнем за-

хворюваності та зростанням кількості пацієнток із резистентними до хіміотерапії формами пухлин, що зумовлює необхідність подальших досліджень біологічних аспектів даної онкологічної патології. Проблема моніторингу РМЗ полягає у відсутності надійних маркерів для прогнозування перебігу захворювання та чутливості до медикаментозного лікування. Особлива увага приділяється вивченню мікроРНК, оскільки вони є основними регуляторами генів, що задіяні у канцерогенезі. Відомо, що різні мікроРНК можуть або стимулювати, або інгібувати функцію генів, впливаючи таким чином на розвиток пухлини, чутливість або стійкість до хіміотерапії, формувати її молекулярний профіль та слугувати маркерами перебігу пухлинного процесу. Водночас зв'язок показників експресії мікроРНК з чутливістю до неoad'ювантної поліхіміотерапії (НПХТ) все ще остаточно не з'ясований.

Мета: визначити зв'язок експресії онкосупресорних мікроРНК-320a та -200b у пухлинних клітинах та сироватці крові з чутливістю до НПХТ у хворих на РМЗ.

Об'єкт і методи. У дослідження залучено 145 хворих на РМЗ II–III стадій. Середній вік хворих становив $57,5 \pm 8,3$ року. Ефективність НПХТ за схемою АС (доксорубіцин + циклофосфамід) оцінювали через кожні 2 цикли за даними мамографії згідно з критеріями RECIST. Експресію мікроРНК-320a та -200b у пухлинних клітинах та сироватці крові визначали за допомогою полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією в реальному часі. В якості контролю використовували 14 зразків крові умовно здорових донорів. Дослідження проводили у 3 повторах, порівняльний аналіз здійснювали за допомогою t-тесту, кореляційний аналіз — із застосуванням коефіцієнта кореляції Пірсона.

Результати. Пухлини хворих на РМЗ (46,4%), у яких була повна (11,2%) або часткова (35,2%) регресія за критеріями RECIST, відносили до чутливих. Пухлини, які відповідали стабілізації (40,0%) або прогресуванню (13,6%) за тими ж критеріями, відносили до резистентних. Встановлено, що у хворих із чутливими пухлинами до лікування середні рівні циркулюючих мікроРНК-320a та -200b були високими і становили $1,1 \pm 0,7$ та $0,8 \pm 0,5$ ум. од., а пухлинних — $3,1 \pm 0,7$ та $2,8 \pm 0,5$ ум. од. відповідно. На противагу цьому у хворих із резистентними до НПХТ за схемою АС новоутвореннями показники експресії мікроРНК-200b та -320a були низькими і становили в сироватці крові $0,5 \pm 0,4$ та $0,5 \pm 0,4$ ум. од.; у пухлинній тканині — $1,9 \pm 0,7$ та $1,3 \pm 0,6$ ум. од. відповідно.

Висновки. Визначено зв'язок експресії онкосупресорних мікроРНК-320a та -200b з відповіддю на НПХТ в режимі АС свідчить про перспективність їх використання в якості додаткових предиктивних маркерів РМЗ.

АСОЦІАЦІЯ АМПЛІФІКАЦІЙ ТА ОВЕРЕКСПРЕСІЇ *ERBB2* ТА *CCNE1* З ПОКАЗНИКАМИ АГРЕСИВНОСТІ ПУХЛИННОГО ПРОЦЕСУ В ЕНДОМЕТРІЇ

*О.В. Бресва, О.О. Горлакова, Н.П. Юрченко,
Л.Г. Бучинська*

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

Визначення молекулярних підтипів раку ендометрія (РЕ) з агресивним перебігом захворювання є предме-

том активних досліджень останніх років. За даними The Cancer Genome Atlas, характерною особливістю таких карцином є варіація кількості копій генів *ERBB2* та *CCNE1*, що зумовлює необхідність проведення досліджень з метою визначення можливості застосування цих маркерів для ідентифікації категорії хворих на РЕ із несприятливим прогнозом.

Мета: дослідити копійність онкогенів *ERBB2* і *CCNE1* та проаналізувати особливості експресії відповідних білків в ендометріодних карциномах ендометрія залежно від показників прогресії пухлинного процесу.

Об'єкт і методи. Дослідження проведено на зразках операційного матеріалу та крові 52 хворих на РЕ I–II стадії за FIGO (середній вік $61,1 \pm 2,4$ року). Аналіз копійності генів *ERBB2* та *CCNE1* проводили за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції. Експресію відповідних білків визначали імуногістохімічним методом.

Результати. Встановлено, що у 18,8% досліджених зразків РЕ була ампліфікація *ERBB2*. Визначено, що кількість таких пухлин у групі хворих із низькодиференційованими карциномами ендометрія була достовірно вищою порівняно з аналогічним показником серед пацієнток, пухлини яких характеризувалися помірним ступенем диференціювання (35,7 та 5,5% відповідно, $p < 0,05$). Наявність оверекспресії білка ErbB2 (кількість позитивно забарвлених клітин $> 10,0\%$) визначено у 14,6% карцином ендометрія. Показано, що відсоток випадків з оверекспресією ErbB2 був вищим у групі пацієнток з інвазією пухлини у міометрій $> \frac{1}{2}$, ніж у групі жінок, пухлинна інвазія у яких не перевищувала $< \frac{1}{2}$ міометрія (25,0 і 4,1% відповідно, $p < 0,05$). Аналіз копійності гена *CCNE1* показав наявність його ампліфікації у 14,3% пухлин ендометрія. Встановлено, що кількість таких пухлин серед G3-карцином (21,4%) у три рази перевищувала їх кількість поміж G2-карцином (7,1%). Оверекспресія білка цикліну E1 відмічалася у 65,6% випадків РЕ. Визначено більший відсоток випадків з оверекспресією серед глибокоінвазуючих пухлин, ніж серед пухлин, що інвазували $< \frac{1}{2}$ міометрія (86,7 та 46,6% відповідно, $p < 0,05$).

Висновок. Ампліфікація *ERBB2* поряд з оверекспресією білків ErbB2 і цикліну E1 асоціюються з такими показниками прогресії пухлинного процесу в ендометрії, як низький ступінь диференціювання та високий інвазивний потенціал, що свідчить про потенційну можливість включення цих маркерів у панель для визначення молекулярного підтипу РЕ з агресивним перебігом захворювання.

с-МУС ЯК МАРКЕР АГРЕСИВНОСТІ РАКУ ЕНДОМЕТРІЯ

О.В. Бресва, Н.І. Кухарук, Л.Г. Бучинська

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

Рак ендометрія (РЕ) характеризується значною гетерогенністю як за морфологічною будовою, так і за клінічним перебігом, що суттєво ускладнює діагностику і створює труднощі при виборі тактики лікування пацієнток. На сьогодні одним із потенційних маркерів, які можуть бути використані для визначення агресивних форм РЕ, вважається онкоген *c-МУС*, проте це питання залишається дискусійним з огляду на суперечливість даних, отриманих різними дослідницькими групами.

Мета: провести аналіз копійності онкогену *c-MYC* та експресії відповідного білка в ендометриодних карциномах ендометрія з урахуванням клініко-патологічних характеристик хворих.

Об'єкт і методи. У роботі використано зразки операційного матеріалу та крові 68 хворих на PE I–II стадії за FIGO (середній вік $60,3 \pm 2,7$ року). Копійність гена *c-MYC* визначали за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з використанням гена *HBB* як референтної контролю. Обчислення результатів ПЛР проводили за формулою $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Експресію *c-MYC* на рівні білка оцінювали імуногістохімічним методом.

Результати. При аналізі копійності *c-MYC* встановлено, що у 25,0% карцином ендометрія відмічалася ампліфікація цього гена. Імуногістохімічне дослідження експресії відповідного білка показало наявність його оверекспресії у 23,5% досліджених зразків PE. Визначено, що кількість пухлин з ампліфікацією *c-MYC* була вдвічі більшою у групі хворих на PE з пухлинами низького ступеня диференціювання (36,4%), ніж у групі пацієнток з помірно диференційованими карциномами (17,6%). Крім того, серед останніх виявлено достовірно меншу кількість випадків з оверекспресією білка *c-Myc*, ніж серед хворих з карциномами низького ступеня диференціювання (13,2 та 36,6% відповідно, $p < 0,05$). Показано, що у групі пацієнток, пухлини яких інвазували $> \frac{1}{2}$ міометрія, спостерігається у два рази вищий відсоток осіб з ампліфікацією цього маркера (33,3%), ніж серед жінок з інвазією $< \frac{1}{2}$ міометрія (15,4%). До того ж у групі хворих з пухлинами з інвазією $< \frac{1}{2}$ міометрія спостерігався дещо нижчий відсоток випадків із оверекспресією відповідного білка (18,5% порівняно з 26,8% у групі хворих з інвазією пухлини $> \frac{1}{2}$ міометрія).

Висновок. Підвищення рівня копійності онкогена *c-MYC* та його білкового продукту асоціюється з вираженою злоякісністю карцином ендометрія, що може свідчити про доцільність використання цього маркера для визначення агресивних форм PE.

ОСОБЛИВОСТІ МЕТАБОЛІЗМУ В ЖИРОВІЙ ТКАНИНІ У ХВОРИХ НА ТРИЧІ НЕГАТИВНИЙ РАК МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ

А.П. Бурлака¹, А.В. Вовк¹, І.І. Ганусевич¹, І.М. Мотузок²,
О.І. Сидорчук²

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

²Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця,
Київ, Україна

У жировій тканині (ЖТ) молочної залози (або мамарній ЖТ — МЖТ), крім ліпогенезу, секретії про- та протизапальних цитокінів, відбувається метаболізм естрогенів, які можуть істотно впливати на біогенез мітохондрій та викликатися генерування супероксидних радикалів (СР) у тканинах-мішенях. Тому дослідження активності цитохромів P-450, які забезпечують метаболізм та детоксикацію естрогенів, стану електронтранспортного ланцюга мітохондрій та їх редокс-метаболізму в МЖТ є актуальним з огляду на те, що рак молочної залози (РМЗ) є гормонозалежним захворюванням.

Мета: дослідити рівні вмісту NO, експресії адипонектину, сумарної активності желатинази та активності цитохрому P-450 в МЖТ хворих на тричі негативний (ТН) РМЗ з надмірною масою тіла.

Об'єкт і методи: зразки МЖТ, взятої на відстані 1 та 5 см від пухлини, 26 хворих на ТН РМЗ I–III стадії

з ожирінням (I стадія — 5, II — 14, III — 7). Середній вік пацієнток — $51,2 \pm 14,9$ року. У 96% випадків пухлини молочної залози за гістологічним типом були визначені як інфільтруючі аденокарциноми помірного ($n = 11$) та низького ($n = 15$) ступеня диференціювання. Використано методи: антропометричний (індекс маси тіла — ІМТ); електронного парамагнітного резонансу, технологія спінових уловлювачів, імуногістохімічний, зимографія в поліакриламідному гелі, статистичні.

Результати. Виявлено, що в МЖТ, прилеглий до G3-пухлин, рівень NO був достовірно нижчим порівняно з таким при G2-пухлинах ($0,39 \pm 0,03$ проти $0,62 \pm 0,05$ нмоль/г тканини). На відстані 5 см від пухлини різниці між вмістом NO в помірно та низькодиференційованих пухлинах не виявлено ($0,67 \pm 0,06$ та $0,59 \pm 0,07$ нмоль/г тканини відповідно). При визначенні залежності досліджуваних показників та відстані ЖТ від пухлини виявлено наступне: у прилеглий ЖТ (1 см) рівні адипонектину та NO знижувалися (на 36,0 і 44% відповідно), активність цитохрому P-450 та сумарна активність матриксних металопротеїназ підвищувалися (на 200 та 73% відповідно) порівняно з ЖТ на відстані 5 см (значення досліджуваних показників в якій були прийняті за 100%). У хворих з об'ємом ЖТ $> 21\%$ (медіана — 21%) рівень адипонектину був знижений на 42%, NO — на 29%, а активність цитохрому P-450 та сумарна активність желатинази зростала на 87 та 58% відповідно (значення показників при об'ємі ЖТ $< 21\%$ приймалися за 100%).

Висновок. У МЖТ виявлено порушення біодоступності NO, зміну секретії прозапальних цитокінів, метаболізму естрогенів та посилення протеолізу міжклітинного матриксу. Встановлено підвищення сумарної активності цитохрому P-450 у прилеглий до пухлини МЖТ на 200% порівняно з МЖТ на відстані 5 см. Рівні NO та адипонектину, активність желатинази та цитохрому P-450 в ЖТ хворих на ТН РМЗ з ожирінням залежать від таких локальних характеристик МЖТ, як її об'єм та відстань від пухлини. Встановлені закономірності доводять, що ожиріння впливає на перебіг ТН РМЗ, досліджувані маркери можуть бути розглянуті як додаткові прогностичні з метою індивідуалізації лікування цих хворих.

ВПЛИВ ІНСУЛІНУ НА МЕТАБОЛІЗМ ГЛЮКОЗИ ТА ПРОЛІФЕРАТИВНУ АКТИВНІСТЬ КЛІТИН РАКУ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ ЛЮДИНИ З ФЕНОТИПОМ МЕДИКАМЕНТОЗНОЇ РЕЗИСТЕНТНОСТІ ДО ДОКСОРУБІЦИНУ АБО ЦИСПЛАТИНУ

Н.В. Видасов^{1,2}, О.О. Лихова¹, Н.О. Безденіських¹,
Т.П. Козак¹, В.Ф. Чехун¹

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

²Факультет біотехнології та екологічного контролю
Національного університету харчових технологій,
Київ, Україна

Резистентність пухлинних клітин (ПК) до хіміотерапії є важливою проблемою в онкології. Найголовніша властивість ПК — нестабільність геному. Саме ця їхня характеристика забезпечує гетерогенність популяції ПК і, як наслідок, появу в пухлині резистентних до медикаментозної терапії субкλώνів злоякісних клітин. Особливості метаболізму ПК — суттєвий фактор їх чутливості до дії цитостатиків, а метаболічний синдром і пов'язані з ним інсулінорезистентність і гіперінсулінемія асоціюються

з підвищенням ризиком виникнення та/або гіршим прогнозом перебігу злоякісних новоутворень різного гістогенезу. Саме тому актуальним питанням сьогодні лишається дослідження змін факторів метаболічного синдрому, зокрема чутливості до інсуліну та інсуліноподібного фактора росту, в ПК з фенотипом медикаментозної резистентності до хіміопрепаратів для встановлення можливих причин набуття ними медикаментозної резистентності та її подолання.

Мета: дослідити *in vitro* у порівняльному аспекті особливості метаболізму глюкози та проліферативну активність клітин раку молочної залози (РМЗ) людини вихідної лінії MCF-7/S та клітин з фенотипом медикаментозної резистентності до доксорубіцину або цисплатину за умов їх культивування в присутності інсуліну.

Об'єкт і методи. Використовували клітини аденокарциноми молочної залози людини вихідної лінії MCF-7/S та клітини з фенотипом медикаментозної резистентності до доксорубіцину (лінія MCF-7/Dox) або цисплатину (лінія MCF-7/DDP). Для досліджень застосовували біохімічні методи та методи культури клітин.

Результати. На відміну від нормальних клітин, культивування клітин РМЗ в присутності високих концентрацій інсуліну призводило до суттєвого пригнічення їх проліферації. Клітини з фенотипом медикаментозної резистентності до доксорубіцину та цисплатину виявилися менш чутливими до антипроліферативної дії високих концентрацій інсуліну в порівнянні з вихідною лінією. Культивування клітин ліній MCF-7/Dox та MCF-7/DDP в присутності 800–160 нг/мл інсуліну зумовлювало статистично достовірне пригнічення проліферації ПК на 30 та 35% відповідно, а клітин лінії MCF-7/S — на 55% у порівнянні з контролем. Порівняльний аналіз поглинання глюкози клітинами РМЗ ліній MCF-7/S та резистентних до доксорубіцину або цисплатину виявив, що клітини MCF-7/S в присутності 800 нг/мл інсуліну інтенсивніше метаболізують глюкозу (у середньому на 38%), а при 160 нг/мл інсуліну — в середньому на 25,7%. Культивування клітин РМЗ в присутності нижчих концентрацій інсуліну не впливало на інтенсивність поглинання глюкози дослідними клітинами.

Висновок. Клітини з фенотипом медикаментозної резистентності до доксорубіцину та цисплатину виявилися менш чутливими до антипроліферативної дії високих концентрацій інсуліну в порівнянні з вихідною лінією MCF-7/S. Порівняльний аналіз поглинання глюкози клітинами MCF-7/S та клітинами MCF-7/Dox або MCF-7/DDP виявив, що клітини MCF-7/S в присутності високих концентрацій інсуліну інтенсивніше метаболізують глюкозу. Отримані дані можуть стати підґрунтям для пошуку нових шляхів подолання медикаментозної резистентності ПК.

ВИЗНАЧЕННЯ РІВНЯ ЕКСПРЕСІЇ мікроРНК miR-30c-5p У ПЛАЗМІ КРОВІ ЯК ДІАГНОСТИЧНОГО БІОМАРКЕРА СВІТЛОКЛІТИННОГО РАКУ НИРКИ

Т.В. Войціцький¹, М.С. Дашенко¹, К.В. Онищенко¹,
В.М. Григоренко², Л.В. Перета², І.Я. Скрипкіна¹

¹Інститут молекулярної біології і генетики НАН України

²ДУ «Інститут урології НАМН України», Київ, Україна

Рак нирки становить близько 3% всіх випадків злоякісних онкотрансформацій серед людей. Клітинний рак нирки виявляють у 90–95% від усіх зареєстрованих випадків, у 20–40% пацієнтів навіть після хірургічної резекції розвиваються метастази, що робить дане захворюван-

ня серйозною проблемою. Оскільки на ранніх етапах цей тип раку легко піддається лікуванню, важливо розробити методи його ранньої діагностики. Сучасні дослідження акцентують увагу на застосуванні різних асоційованих з раком мікроРНК як індикаторів патології. Зокрема, miR-30c-5p здатна знижувати експресію гена *GRP78*, продукт якого спричиняє ріст та стійкість до апоптозу пухлинних клітин, а отже, зниження її концентрації в клітинах та біологічних рідинах може свідчити про розвиток раку. Рівень концентрації мікроРНК не може використовуватися як єдиний маркер злоякісної патології, але у порівнянні з іншими тестами може бути корисним для неінвазивної діагностики пацієнтів із підозрою на захворювання.

Мета: визначити рівень концентрації miR-30c-5p у клітинах світлоклітинного раку нирки (скРН), умовно здорових прилеглих тканинах та крові, взятої до операції, хворих на скРН.

Об'єкт і методи. Хірургічні зразки пухлин, тканин нирки, прилеглих до пухлин, та плазми крові, взятої до операції, 32 хворих на скРН, які лікувалися в Інституті урології НАМН України. Проаналізовано клініко-патологічні дані: вік і стать пацієнтів, гістологічний тип пухлини, клінічну стадію раку. Виділення тотальної РНК із пухлинних тканин та плазми крові проводилося з використанням TRI Reagent («Sigma», США). Зворотну транскрипцію проводили з використанням набору High-Specificity miRNA 1st-Strand cDNA Synthesis Kit (Agilent Technologies, США). Для визначення концентрації miR-30c-5p у тканинах та в плазмі крові використовували кількісну полімеразну ланцюгову реакцію у реальному часі.

Результати. Експресія miR-30c-5p була знижена в клітинах пухлин у 4,8–5,3 раза порівняно з умовно здоровими прилеглими тканинами ($p < 0,0001$, $AUC = 0,8799$), навіть у хворих на перших стадіях захворювання. У плазмі крові рівень miR-30c-5p був в середньому у 10,02 раза нижчий за рівень цієї мікроРНК у пухлинах тих самих пацієнтів і у 6,4 раза нижчий за рівень у плазмі здорових донорів. Статистичний аналіз отриманих результатів виявив чітку тенденцію до зниження рівня міРНК із розвитком пухлин, в тому числі у пацієнтів із пізніми стадіями хвороби (Т3–4, Fuhrman 3–4). Аналіз ROC-кривої, побудованої для значень miR-30c-5p у плазмі крові хворих проти здорових донорів, показав високі значення площі під нею ($AUC = 0,9688$), що вказує на великий діагностичний потенціал цього маркера.

Висновок. Дані результати свідчать про потенційну можливість використання miR-30c-5p в якості маркера для ранньої діагностики скРН.

Публікація містить результати досліджень, проведених при грантовій підтримці за конкурсним проектом 115U002951 Національної академії наук України.

ПУХЛИНОАСОЦІЙОВАНІ АДИПОЦИТИ ТА МЕТАСТАЗУВАННЯ РАКУ ШЛУНКА

А.М. Галєєва¹, А.Р. Скороход², І.І. Ганусевич¹

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

²Національний університет харчових технологій,
Київ, Україна

Відомо, що низка пухлин (рак шлунка (РШ), молочної залози, товстої кишки, яєчника) розвиваються в місцях анатомічного накопичення жирової тканини. Під впливом пухлини адипоцити перепрограмовуються в пухлиноасоційовані адипоцити (ПАА), які характеризуються пропухлинними властивостями. ПАА є важливим джерелом ади-

покінів та енергії для пухлини, тож вивчення механізмів клітинного та метаболічного симбіозу адипоцитів і пухлинних клітин відкриває нові терапевтичні та діагностичні можливості. Зокрема, прогнозування перебігу мікрометастазів з урахуванням кількості ПАА дозволить індивідуалізувати протипухлинну терапію онкологічних хворих із надмірною масою тіла.

Мета: виявити взаємозв'язки між кількістю ПАА та індексом маси тіла (ІМТ), клініко-патологічними характеристиками, активністю желатиназ (матриксних металопротеїназ-2 та -9) в прилеглий до пухлини жировій тканині (ППЖТ) та кількістю дисемінованих пухлинних клітин (ДПК) у кістковому мозку (КМ) хворих на РШ.

Об'єкт і методи. Імуногісто- та імуноцитохімічні, зимографії в поліакриламідному гелі, загальноклінічні, статистичні (t-критерій Стьюдента, кореляційний аналіз за Спірманом, аналіз виживаності за Капланом — Мейером). У дослідження залучено 236 хворих на РШ (162 чоловіки, 74 жінки), які розподілилися за стадіями таким чином: 68 — I, 54 — II, 63 — III та 51 — IV стадії захворювання.

Результати. У пацієнтів із віддаленими метастазами середнє значення ІМТ на 2,5 кг/м² нижче, ніж у пацієнтів без віддалених метастазів ($p < 0,05$). Хворі на РШ з ожирінням живуть достовірно довше, ніж хворі з нормальною масою тіла. Вік впливає на виживаність хворих лише за наявності ожиріння: пацієнти похилого віку живуть менше, ніж хворі середнього віку. Виявлено достовірну кореляцію між кількістю ПАА в пухлині та ІМТ хворих на РШ ($\rho = 0,41$; $p = 0,032$). Вміст ПАА зростає із збільшенням розмірів пухлини: у хворих категорії pT4 він у 1,3 раза вищий, ніж у хворих категорії pT1 ($p < 0,05$). Як при регіонарному, так і при віддаленому метастазуванні в пухлинах виявлено достовірно більше ПАА, ніж при відсутності метастазів ($p < 0,05$). Велика кількість ПАА у пухлині асоційована, з одного боку, з високою активністю желатиназ у ППЖТ, а з іншого — з віддаленим метастазуванням РШ ($p < 0,05$). Для хворих категорії M1 характерні на 64% вищі показники сумарної активності желатиназ в ППЖТ і на 30% більша кількість ПАА в пухлині, ніж для хворих категорії M0. У пухлинах хворих без віддалених метастазів (категорії M0) кількість ПАА за наявності ДПК у КМ достовірно більша, ніж за їх відсутності.

Висновок. Дисфункціональна жирова тканина є модифікатором мікрооточення пухлини і фактором формування її агресивного фенотипу. Показник кількості ПАА асоційований зі збільшенням розмірів пухлини, її регіонарним і віддаленим метастазуванням, наявністю ДПК у КМ та в перспективі може бути використаний для прогнозування утворення мікрометастазів та перебігу РШ у хворих з надмірною масою тіла.

АНАЛІЗ КЛІТИННИХ ПОПУЛЯЦІЙ З ХАРАКТЕРИСТИКАМИ СТОВБУРОВИХ ПУХЛИННИХ КЛІТИН В СФЕРОЇДАХ ЛІНІЇ MCF-7

Т. Гергелюк^{1,2}, О. Перепелиціна², Л. Остапченко¹, М. Сидоренко²

¹Навчально-науковий центр «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Т. Шевченка

²Відділення біотехнічних проблем діагностики Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Київ, Україна

Стовбурові пухлинні клітини (СПК) відіграють ключову роль у самовідновленні пухлини після терапії. Метод

збагачення багатоклітинних пухлинних сфероїдів (БПС) СПК може дати можливість використовувати ці культури в якості тест-системи для ідентифікації лікарських засобів проти СПК.

Мета: виявити присутність клітинних популяцій із характеристиками СПК та їхню чутливість до протипухлинних препаратів (цисплатину, метотрексату і доксорубіцину) на моделі збагачених багатоклітинних пухлинних сфероїдів (зБПС).

Об'єкт і методи. Клітини MCF-7 культивували за стандартних умов. БПС формувалися в неадгезивних умовах з додаванням 2% карбоксиметилцелюлози на шейкері (PSU-10i, Biosan, Латвія). зБПС культивували в безсироваткових умовах з додаванням 20 нг/мл факторів росту FGF та EGF («Sigma», США), 5 мкг/мл інсуліну («Фармак», Україна), 1 мкг/мл гідрокортизону («Фармак», Україна). Протипухлинні препарати додавали до клітин у наступних концентраціях: цисплатин — 0,01–0,1–1 мкг/мл; метотрексат — 0,1–1–10 мкг/мл; доксорубіцин — 0,1–1–10 мкг/мл. Виживаність клітин визначали за допомогою МТТ-тесту. Експресію рецепторів аналізували з використанням первинних моноклональних антитіл CD44, CD24, CD133, bmi-1 («Sigma», США). Розміри БПС визначали за допомогою програми Stem2000 («Zeiss», Німеччина).

Результати. Відпрацьовано методику культивування зБПС. Показано наявність у зБПС популяції СПК з маркерами CD24, CD44, CD133, bmi-1 (рак молочної залози). Виявлено підвищену експресію цих маркерів у зБПС в порівнянні з адгезивною культурою клітин та БПС, культивованих за стандартних умов. Як БПС, так і зБПС найбільш чутливі до дії цисплатину (1 мкг/мл) і доксорубіцину (10 мкг/мл). Об'єм БПС при додаванні цисплатину (1 мкг/мл) був на 5,5% менший від контрольних сфероїдів, а об'єм зБПС майже не відрізнявся від контролю після 48 год інкубування. Кількість живих клітин у БПС зменшувалася на 25%, в зБПС — на 20%. Під дією метотрексату (10 мкг/мл) середній розмір БПС був меншим, ніж в контрольних сфероїдах, на 15,5%, а в зБПС — на 8%. Цитотоксичний вплив доксорубіцину проявлявся в БПС вже за концентрації 1 мкг/мл, а в зБПС — 10 мкг/мл.

Висновок. Культура зБПС збагачена клітинами з характеристиками СПК. Клітини цієї культури є менш чутливими до дії протипухлинних препаратів у порівнянні з адгезивною та сфероїдною культурою клітин MCF-7.

ЗМІНИ ЦИТОАРХІТЕКТОНІКИ, МОРФОМЕТРИЧНИХ ХАРАКТЕРИСТИК ТА ПЛОЇДНОСТІ КЛІТИН КАРЦИНОСАРКОМИ УОКЕР-256 ПІД ВПЛИВОМ ЕКЗОГЕННОГО ЛАКТОФЕРИНУ

Д.М. Горбик

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

У численних дослідженнях *in vitro* та *in vivo* показано, що лактоферин (ЛФ) здатен інгібувати канцерогенез молочної залози, стравоходу, легень та печінки. Нами в попередніх дослідженнях продемонстровано, що екзогенний ЛФ здатен пригнічувати ріст карциносаркоми Уокер-256 та не володіє гено- та цитотоксичністю щодо нормальних клітин організму.

Мета: дослідити вплив екзогенного ЛФ на морфологічну будову, морфометричні параметри та клітинний цикл клітин карциносаркоми Уокер-256.

Об'єкт і методи. Дослідження проведено на щурах-самках із карциносаркомою Уокер-256. На 4-ту добу після перещеплення пухлини тваринам щоденно вводили екзогенний ЛФ у дозах 1 та 10 мг/кг маси тварини. На 12-ту добу тварин виводили з експерименту. Зміни ДНК-статусу досліджували за допомогою проточної цитометрії (Beckman Coulter Epics XL). Дослідження цитоморфологічних особливостей карциносаркоми Уокер-256 та вивчення морфометричних параметрів клітин та їх ядер проведено на гістологічних препаратах з використанням мікроскопа Primo Star (Carl Zeiss) з програмним забезпеченням AxioVision Rel. 4.7. Порівняння достовірності відмінностей середніх величин проводили з використанням t-критерію Стьюдента. Достовірними вважали розбіжності при $p < 0,05$.

Результати. Встановлено, що під впливом різних концентрацій ЛФ, введеного тваринам з карциносаркомою Уокер-256, відбуваються односпрямовані зміни архітекτονіки цих пухлин, а саме: сегрегація пухлинних клітин, пікнотичні зміни, гіперхроматоз ядер, явища некробіозу та некрозу. Спостерігаються також зміни у судинному компоненті: дилатація, виповнення судин кров'ю, потоншення їх стінок, розриви із великими крововиливами.

Виявлені морфологічні зміни узгоджуються із показниками ДНК-статусу пухлинних клітин. Так, під впливом ЛФ у тканині карциносаркоми Уокер-256 відмічається зменшення кількості клітин у G2+M (при введенні 1 мг/кг — на рівні тенденції, 10 мг/кг — статистично суттєве) та достовірне (на 12%) зменшення кількості клітин у S-фазі клітинного циклу при застосуванні обох доз ЛФ. Це супроводжується зростанням кількості анеупloidних клітин, а також збільшенням площі їх ядер. Максимальні значення площі ядер пухлинних клітин реєстрували в групі тварин, яким вводили ЛФ в дозі 10 мкг/кг ($19,35 \pm 3,01$ мкм² проти $12,57 \pm 3,18$ мкм², $p > 0,05$).

Висновки. Встановлено, що під впливом курсового введення досліджених доз екзогенного ЛФ розвиваються некротичні та некробіотичні зміни у карциносаркомі Уокер-256 та зміни морфометричних параметрів пухлинних клітин, які можна розцінити як прояви гено- та цитотоксичності.

КІЛЬКІСНІ ТА ЯКІСНІ ЗАКОНОМІРНОСТІ ФОРМУВАННЯ АБЕРАЦІЙ ХРОМОСОМ ПРИ ОПРОМІНЕННІ КУЛЬТУРИ ЛІМФОЦИТІВ КРОВІ УМОВНО ЗДОРОВИХ ДОНОРІВ У РІЗНІ ПЕРІОДИ КЛІТИННОГО ЦИКЛУ

О.О. Грінченко¹, Е.А. Дьоміна¹, Л.А. Іллячок²

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

²Національний інститут раку, Київ, Україна

Однією з основних мішеней за дії іонізуючої радіації є генетичний апарат клітини. Інтенсивність та локалізація його ушкодження належать до якісних та кількісних показників опромінення організму людини. При цьому актуальною залишається проблема ураження нормальних клітин, що потрапляють у зону терапевтичного опромінення. Це може зумовити розвиток віддалених променевих ускладнень, у тому числі вторинного раку. Найбільш інформативним підходом до вивчення цієї проблеми є

використання в якості об'єкта лімфоцитів периферичної крові (ЛПК) з огляду на їх унікальні властивості, принаймні високу радіочутливість.

Мета: визначити частоту та спектр радіаційно-індукованих аберацій хромосом при тестуванню опроміненні ЛПК умовно здорових донорів у G₀- та G₂-періоди клітинного циклу.

Об'єкт і методи: культура ЛПК 7 умовно здорових донорів віком 25–40 років. Опромінення культури клітин здійснювали на рентгенівській установці в Національному інституті раку за наступних умов: потужність дози 0,89 Гр/хв, діапазон доз 0,3; 0,5; 1,0 та 2,0 Гр на 0-й годині інкубації ЛПК (G₀-період клітинного циклу) та на 46-й годині (G₂-період клітинного циклу). Культивування ЛПК проводили за стандартним протоколом (IAEA, 2011) напівмікрометодом із деякими модифікаціями.

Результати. Дозова крива для загальної частоти аберацій хромосом характеризується наявністю плато в діапазоні малих доз (0,3–0,5 Гр), яке з підвищенням променевого навантаження (1,0–2,0 Гр) переходить у лінійну ділянку як при опроміненні культури ЛПК в G₀-, так і в G₂-період клітинного циклу. При побудові дозових кривих із залученням моделей лінійної та лінійно-квадратичної регресії для загальної частоти аберацій хромосом при опроміненні культури ЛПК в G₀-період клітинного циклу показано перевагу лінійної компоненти, що підтверджується значенням α-коефіцієнтів лінійного ($Y = (3,5 \pm 0,45) + (7,4 \pm 0,23) \cdot D$) та лінійно-квадратичного ($Y = (1,6 \pm 0,2) + (15,2 \pm 1,2) \cdot D - (3,7 \pm 0,71) \cdot D^2$) регресійних рівнянь. При опроміненні культури ЛПК у G₂-період клітинного циклу також переважає лінійна модель регресії ($Y = (5,2 \pm 1,13) + (6,8 \pm 0,4) \cdot D$), а коефіцієнт β лінійно-квадратичної моделі має від'ємне значення ($Y = (4,5 \pm 1,14) + (15,7 \pm 1,61) \cdot D - (4,2 \pm 1,37) \cdot D^2$). Аналіз спектра аберацій хромосом показав, що в G₀-період істотне значення у формуванні генетичної нестабільності мають аберації хромосомного типу, а в G₂-період — хроматидного типу, частота яких становить більше 90% від загальної частоти перебудов, що відповідає основним положенням класичної радіаційної цитогенетики.

Висновок. На підставі дослідження характеру залежності «доза — ефект» виходу аберацій хромосом при рентгенівському опроміненні культури ЛПК в діапазоні доз 0,3–2,0 Гр показано перевагу лінійної компоненти, що підтверджується параметрами лінійної та лінійно-квадратичної моделей регресії. Одержані цитогенетичні дані є підґрунтям для подальшого визначення характеру дозових кривих для ЛПК хворих онкологічного.

ПРОГНОСТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ мікроРНК-126, -205 ТА -214 У ХВОРИХ НА РАК ПЕРЕДМІХУРОВОЇ ЗАЛОЗИ

Т.В. Задворний

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

У клінічній онкоурології важливими завданнями є вибір оптимальної тактики лікування, а також моніторинг його перебігу з метою завчасного виявлення рецидивів та генералізації процесу. Відомо, що розвиток новоутворень, в тому числі раку передміхурової залози (РПЗ), супроводжується змінами рівня мікроРНК. Проте значення змін експресії окремих мікроРНК для прогнозу перебігу РПЗ на сьогодні остаточно не з'ясоване і потребує більш детального дослідження.

Мета: дослідити рівень експресії мікроРНК у сироватці крові та пухлинній тканині хворих на РПЗ та оцінити можливість їх використання в якості маркерів прогнозу захворювання.

Об'єкт і методи. У дослідженні використані сироватка крові та пухлинна тканина хворих на РПЗ II–III стадії, які перебували на лікуванні в Національному інституті раку протягом 2015–2017 рр. Середній вік хворих становив $59,8 \pm 4,4$ року. Експресію мікроРНК-126, -205 та -214 у сироватці крові та пухлинній тканині визначали за допомогою полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією в реальному часі. Статистичну обробку отриманих результатів виконували за допомогою програми статистичної обробки даних STATISTICA 6.0. Порівняння достовірності відмінностей середніх величин проводили з використанням t-критерію Стьюдента. Достовірними вважали розбіжності при $p < 0,05$.

Результати. Розвиток новоутворень у передміуровій залозі супроводжується зміною показників експресії мікроРНК-126, -205 та -214 у пухлинних клітинах та на рівні організму. Встановлено існування оберненого кореляційного зв'язку між рівнем циркулюючої мікроРНК-126 та такими клініко-патологічними характеристиками хворих, як стадія пухлинного процесу, наявність метастазів у регіонарних лімфатичних вузлах і рівень простатспецифічного антигену (ПСА) у сироватці крові. Показано наявність прямої залежності між рівнем циркулюючих мікроРНК-205 та -214 і віком хворих на РПЗ, стадією пухлинного процесу та рівнем ПСА в сироватці крові. Продемонстровано існування асоціативних зв'язків між відносним рівнем експресії мікроРНК-126, -205 та -214 у пухлинній тканині хворих та такими клініко-патологічними характеристиками хворих на РПЗ, як вік, стадія пухлинного процесу, наявність метастазів у регіонарних лімфатичних вузлах, сума балів за Глісоном та рівень ПСА.

Висновки. Отримані нами результати свідчать про зв'язок рівнів експресії досліджених мікроРНК у сироватці крові та пухлинній тканині з основними клініко-патологічними характеристиками хворих на РПЗ і вказують на доцільність їх використання як прогностичних маркерів.

КОРРЕЛЯЦІЯ СТЕПЕНІ МОРФОЛОГІЧЕСКОГО ОТВЕТА ОПУХОЛИ С ВИЖИВАЄМОСТЮ ПОСЛЕ КОМПЛЕКСНОГО ЛЕЧЕНИЯ РЕЗЕКТАБЕЛЬНОГО НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО IIIА СТАДИИ

*В.Д. Захарычев, Б.О. Борисюк, Л.В. Бороров,
А.И. Шевченко, К.А. Малярчук*

Национальная медицинская академия последипломного образования им. П.Л. Шупика, Киев, Украина

Вариабельність результатів мультимодального лікування немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ) IIIA стадії обумовлює пошук об'єктивних причин існуючих протиріччів. Обсуджується значення високої ступеня морфологічного відповіді опухолі після неoad'ювантної хіміо- (НХТ) або хіміолучевої терапії (НХЛТ) як предиктора підвищення виживаємості пацієнтів.

Цель: сравнить степень морфологического ответа на НХТ и НХЛТ и определить наличие ее корреляции с выживаемостью больных НМРЛ IIIA стадии.

Объект и методы. Выполнен анализ результатов комплексного лечения 204 пациентов с НМРЛ IIIA стадии. Пациенты распределены на 3 группы: 1-я ($n = 34$) — основная, в которую включены пациенты, получившие НХЛТ; 2-я и 3-я — контрольные (соответственно: 1-я контрольная, $n = 84$, N1; 2-я контрольная, $n = 86$, N2), получившие НХТ. Всем больным было проведено 2–4 курса химиотерапии по схеме цисплатин/карбоплатин + паклитаксел. Лучевая терапия выполнялась в режиме ежедневных сеансов по 2 Гр (5 раз в неделю) в суммарной дозе 29,5–30,5 Гр. Операцию проводили через 3 нед после окончания неoad'ювантной терапии. Все операции были радикальные. Проведен анализ степени морфологического ответа опухоли во всех группах и ее корреляция с выживаемостью пациентов.

Результаты. Продолжительность жизни пациентов в основной группе составила от 7 мес до 11 лет, медиана выживаемости (МВ) — 29 мес. В основной группе полный морфологический ответ опухоли выявлен у 5 (11%) пациентов. В этой группе больных продолжительность жизни составила от 2 до 9 лет со средним значением 45 мес. Кроме того, в основной группе у 5 (11%) пациентов выявлена высокая степень морфологического ответа опухоли (относительная жизнеспособность опухолевой ткани $\geq 12,5\%$). Продолжительность жизни этих пациентов составила от 4,6 до 10,1 года, среднее значение продолжительности жизни — 39 мес. В 1-й контрольной группе продолжительность жизни составила от 8,5 до 120 мес, МВ — 25 мес. Во 2-й контрольной группе продолжительность жизни — от 5 до 49 мес. В обеих контрольных группах полный морфологический ответ получен суммарно у 3% пациентов. При полном и практически полном морфологическом ответе встречались G2 и G3 степени дифференциации опухоли. Иными словами, отмечена тенденция к повышению выживаемости в группе пациентов, получивших НХЛТ, по сравнению с пациентами, у которых применили НХТ. Количество случаев высокой степени морфологического ответа значительно чаще отмечено после НХЛТ, чем после НХТ, среднее значение выживаемости у таких пациентов значительно выше, чем у пациентов без высокой степени морфологического ответа опухоли. Частота послеоперационных осложнений и смертности у больных после НХЛТ не увеличивалась, следовательно, для пациентов с IIIA стадией НМРЛ применение НХЛТ по сравнению с НХТ не повышает рисков лечения.

Вывод. Высокая степень морфологического ответа НМРЛ IIIA стадии после НХТ или НХЛТ (особенно при опухолях со степенью дифференциации G2 и G3) коррелирует с увеличением продолжительности выживаемости пациентов.

ОСОБЛИВОСТІ ПОЛЯРИЗАЦІЇ МАКРОФАГІВ РІЗНИХ ОРГАНІВ І ТКАНИН МИШЕЙ З КАРЦИНОМОЮ ЛЕГЕНІ ЛЬЮІС

*А.В. Іванченко, Т.В. Симчич, Н.І. Федосова,
Н.Л. Черемшєнко, О.М. Караман*

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

На сьогодні тривають дослідження щодо вивчення ролі клітин імунної системи в пухлинному рості. Особливу увагу приділяють таким клітинам вродженого імунітету, як макрофаги (Мф), які залежно від свого мікрооточення здатні активуватися різними шляхами та поляризуватися у Мф 1-го або 2-го типу. Мф 1-го типу

(прозапальні) володіють вираженою мікробіцидною та протипухлинною дією; продукують активовані форми кисню та оксид азоту (NO). Мф 2-го типу (протизапальні) проявляють виражену імуносупресивну та пропухлинну активність; секретують аргіназу-1 при відсутності синтезу NO. Завдяки своїй пластичності Мф 1-го типу можуть поляризуватися в Мф 2-го і навпаки. Відомо, що пухлинне мікрооточення сприяє поляризації Мф в клітині 2-го типу. Сучасні імунотерапевтичні стратегії змінили свою направленість з досліджень щодо блокування пропухлинної активності Мф 2-го типу на пошук можливостей з перепрограмування цих клітин в Мф 1-го типу. Вважають, що таке репрограмування може сприяти інгібуванню росту та/або повному регресу пухлини. Однак майже відсутня інформація про фенотипово-функціональні особливості Мф із різних органів та тканин у динаміці пухлинного росту.

Мета: дослідити поляризацію Мф з різних органів та тканин у мишей C57Bl у динаміці росту карциноми легень Льюїс (КЛЛ).

Об'єкт і методи. Дослідження проведено на мишах-самцях лінії C57Bl (віком 2–2,5 міс) розведення віварію Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України з дотриманням міжнародних принципів Гельсінкської декларації. Тварин утримували на стандартній лабораторній дієті з вільним доступом до води та їжі. Сформовано групи: 1-ша — інтактні тварини (інтактний контроль, «ІК»; n = 4); 2-га — миші, яким прищеплено КЛЛ (контроль пухлинного росту, «КПР»; n = 6). Клітини КЛЛ вводили внутрішньом'язово у стегно правої задньої кінцівки по $3 \cdot 10^5$ клітин/мишу. Об'єктом дослідження слугували Мф, які отримували на 7-, 14-, 21- та 28-му добу росту КЛЛ з перитонеальної порожнини (п-Мф), селезінки (с-Мф) і легень (л-Мф). Продукцію NO оцінювали за вмістом нітритів у супернатантах отриманих Мф; активність аргінази визначали за швидкістю утворення сечовини. За відношенням показників продукції NO до активності аргінази (NO/Ар) оцінювали поляризацію Мф в 1-й чи 2-й тип відповідно. Середні значення досліджуваних параметрів визначали за допомогою пакета програм «Statistica» із застосуванням t-критерію Стьюдента. Достовірними вважали відмінності при $p < 0,05$.

Результати. Встановлено, що у групі «ІК» всі Мф характеризувалися високим рівнем продукції NO та низькою аргіназною активністю: співвідношення NO/Ар було найвищим для с-Мф (16,8) та було майже вдвічі меншим для п-Мф і л-Мф (8,97 і 7,7 відповідно). У групі «КПР» с-МФ характеризувалися підвищеною здатністю до продукції NO до 21-ї доби добу росту КЛЛ; на 28-у добу відмічали підвищену у 1,3 раза здатність до продукції аргінази порівняно з показниками «ІК» (NO/Ар = 7,9). Підвищення продукції NO з одночасним підвищенням аргіназної активності п-Мф у групі «КПР» відмічали на 14-ту та 28-му добу росту КЛЛ (NO/Ар в ці терміни становили відповідно 5,4 і 3,2). Протягом всіх термінів спостереження л-Мф групи «КПР» характеризувалися тенденцією до збільшення продукції NO з одночасним зниженням аргіназної активності (NO/Ар становив 14,6; 31,1; 47,6 і 56,1 для 7-, 14-, 21- і 28-ї доби відповідно), що свідчить про прозапальну поляризацію цих клітин у легенях.

Висновок. У інтактних тварин Мф з перитонеальної порожнини, легень та селезінки поляризовані переважно в клітини 1-го типу. У динаміці росту КЛЛ Мф, які отримано з селезінки та перитонеальної порожнини, по-

ляризуються в клітини 2-го типу; причому на 28-му добу спостереження найвищу аргіназну активність проявляли п-Мф. Мф, отримані з легень, мали прозапальні властивості протягом усього терміну спостереження.

АДАПТЕРНИЙ ПРОТЕЇН RUK/CIN85 МОДУЛЮЄ ЕКСПРЕСІЮ КЛЮЧОВИХ МАРКЕРІВ ЕПІТЕЛІЙНО-МЕЗЕНХІМНОГО ПЕРЕХОДУ У КЛІТИНАХ РАКУ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ МИШІ ЛІНІЇ 4Т1

М. Кириченко^{1,2}, І. Горак², Л. Дробот²

¹Навчально-науковий центр «Інститут біології та медицини» Київського національного університету ім. Т. Шевченка

²Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ, Україна

У процесі метастазування пухлинні клітини епітеліального походження втрачають міжклітинні контакти, ознаки базально-апикальної поляристості та набувають витягнутої веретеноподібної форми, зростає їх рухливість та інвазивність. Такі зміни отримали назву епітеліально-мезенхімального переходу (ЕМП), асоційованого з варіаціями в рівні експресії низки генів, функціонуванні сигнальних шляхів та перебудовами цитоскелета.

Мета: проаналізувати роль адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у контролі експресії маркерів ЕМП.

Об'єкт і методи. Як модель використано клітини аденокарциноми молочної залози миші лінії 4Т1 з надекспресією та пригніченою експресією адаптерного протеїну Ruk/CIN85. Рівень експресії генів-маркерів ЕМП оцінювали за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції з використанням *GAPDH* як референтного гена.

Результати. Продемонстровано, що при надекспресії Ruk/CIN85 у клітинах лінії 4Т1 зростають рівні експресії транскрипційних факторів — регуляторів ЕМП, таких як Twist1, Zeb1, Zeb2 і Snai1, тоді як у клітинах із пригніченням Ruk/CIN85 рівні експресії цих генів достовірно знижуються. Аналіз рівня експресії основного епітеліального маркера Е-кадгерину (CDH1) і основного мезенхімального маркера віментину (Vim) показав, що при надекспресії Ruk/CIN85 достовірно зростає експресія віментину і знижується експресія Е-кадгерину. Протилежну направленість змін у рівні експресії цих маркерів спостерігали в клітинах з down-регулюванням Ruk/CIN85.

Висновки. Таким чином, одержані результати дозволяють припустити потенційну роль адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у контролі епітеліально-мезенхімального/мезенхімально-епітеліального переходів залежно від його вмісту у пухлинних клітинах.

ГЕРМІНАЛЬНІ ТА СОМАТИЧНІ МУТАЦІЇ, АСОЦІЙОВАНІ З ПОРУШЕННЯМ ІМУННОЇ ВІДПОВІДІ ПРИ РАКУ ГРУДНОЇ ЗАЛОЗИ

О.П. Кіриченко¹, К.О. Саурідова¹, С.Ю. Чернушин², Н.В. Грищенко², В.І. Кашиба²

¹Навчально-науковий центр «Інститут біології та медицини» Київського національного університету ім. Т. Шевченка

²Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ, Україна

Спадково зумовлена варіація активності генів інтерлейкінів може призводити до зсуву нормальної рівноваги про- та протизапальних процесів, що асоційовано з підвищенням ризику розвитку онкопатології та зниженням ефективності протиракової терапії. З іншого боку, внаслідок

док соматичних реорганізацій генів головного комплексу гістосумісності людини (HLA, human leukocyte antigens) на поверхні ракових клітин та лейкоцитів мікрооточення пухлини будуть відсутні певні антигени, що ускладнює розпізнавання та знешкодження потенційно небезпечних клітин імунною системою організму.

Мета: аналіз алельного поліморфізму, асоційованого зі зниженням експресії генів *IL6* та *IL10*, та соматичних реорганізацій локусу бр21, який містить гени *HLA*, у пухлинних зразках пацієнтів з раком грудної залози (РГЗ).

Об'єкт і методи. Алельний поліморфізм генів *IL6* та *IL10* у лейкоцитарній ДНК пацієнтів з РГЗ та умовно здорових жінок досліджували за допомогою алель-специфічної полімеразної ланцюгової реакції та ПДРФ-аналізу (поліморфізм довжин рестрикційних фрагментів). Дослідження геномних реорганізацій проведено з використанням LOH-аналізу (loss of heterozygosity) STR-маркерів (short tandem repeats) з регіону HLA на парних зразках ДНК (пухлина — нормальна тканина) пацієнтів з РГЗ.

Результати. Встановлено, що частота генотипу -174GG гена *IL6* була достовірно нижчою ($p = 0,042$) у пухлинній тканині пацієнтів з РГЗ (20,6%) порівняно з контролем (39,1%). У 18,8% пухлин грудної залози соматичні геномні порушення детектовано в хромосомній ділянці HLA класу I — маркер D6S2678, в той час як реорганізації в ділянці HLA класу III виявлені в 52,4% пухлин грудної залози.

Висновки. Індивіди, в генотипі яких присутній алель -174C гена *IL6*, мають підвищений ризик розвитку РГЗ, що найбільш імовірно зумовлено пригніченням гострої фази запалення на початкових стадіях онкогенезу. Показано, що не менше 40% випадків РГЗ мають соматичні геномні реорганізації в генах системи HLA, які можуть впливати як на імунну відповідь на злоякісне новоутворення, так і на ефективність імунотерапії раку.

ІЗОЛЮВАННЯ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА ЕКЗОСОМ, ЩО ПРОДУКУЮТЬСЯ ПУХЛИННИМИ КЛІТИНАМИ З РІЗНИМ ВМІСТОМ АДАПТЕРНОГО ПРОТЕЇНУ RUK/CIN85

М. Кір'якулова^{1,2}, *А. Живоложний*^{2,3}, *І. Горак*²,
*А. Самойленко*³, *Л. Дробот*²

¹Навчально-науковий центр «Інститут біології та медицини» Київського національного університету ім. Т. Шевченка

²Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ, Україна

³Університет Оулу, Оулу, Фінляндія

Екзосоми — це везикули розміром 30–100 нм, що мають ендосомне походження, вони можуть містити у своєму складі різні типи РНК, протеїни та ліпіди. Екзосоми є джерелом інформації про велику кількість процесів і порушень на клітинному рівні, їх намагаються використати для виявлення та лікування пухлин, а також як засіб активної спеціалізованої імунотерапії. У попередніх дослідженнях показано, що підвищення експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у пухлинних клітинах різного тканинного походження супроводжується посиленням їх малігнізації. Також відомо, що Ruk/CIN85 стабілізує транскрипційний фактор, що індукується гіпоксією HIF-1 α навіть за умов нормоксії, і може реалізувати свої ефекти за участю цього транскрипційного фактора.

Метою роботи було ізолювати з культурального середовища і охарактеризувати екзосоми, що продукуються пухлинними клітинами з різним рівнем експресії Ruk/CIN85 за умов нормоксії або гіпоксії.

Об'єкт і методи. Субклони клітин аденокарциноми нирки миші лінії Renca зі стабільною надекспресією Ruk/CIN85 отримували методом кальцій-фосфатної трансфекції і подальшої селекції в присутності генетицину-сульфату G418. Екзосоми з культурального середовища досліджували субліній одержували шляхом концентрації і центрифугування в градієнті йодиксанолу, кількість та розмір наночасток аналізували за допомогою приладу Malvern NanoSight. Вміст адаптерного протеїну Ruk/CIN85 та маркерів екзосом у препаратах екзосом аналізували вестерн-блотом.

Результати. Виявлено, що концентрація екзосом, ізолюваних з клітин Renca з надекспресією Ruk/CIN85 за умов гіпоксії, зростала на порядок порівняно як з умовами нормоксії, так і з контрольними клітинами. За результатами вестерн-блоту встановлено, що вміст як Ruk/CIN85, так і маркерів екзосом A1ix та CD81 значно зростає в екзосомах, що продукуються клітинами Renca з надекспресією Ruk/CIN85 за умов нормоксії, і знижується при гіпоксії та порівняно з вмістом в контрольних клітинах.

Висновки. У результаті проведених досліджень вперше продемонстровано, що адаптерний протеїн Ruk/CIN85 є компонентом екзосом, які продукуються пухлинними клітинами. Також виявлено потенційну роль Ruk/CIN85 у контролі складу екзосом за умов нормоксії і гіпоксії.

ВПЛИВ АЛОГЕННИХ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН КІСТКОВОГО МОЗКУ НА КЛІТИННИЙ ЦИКЛ КАРЦИНОМИ ЛЕГЕНІ ЛЬОЇС У МИШЕЙ C57BL/6

*Л. Кладницька*¹, *А. Мазуркевич*¹, *М. Малуєк*¹, *В. Томчук*¹,
*С. Величко*³, *В. Данілов*¹, *Ю. Харкевич*¹, *О. Скачкова*⁴,
*Д. Шелест*², *В. Величко*¹

¹Національний університет біоресурсів і природокористування України

²Навчально-науковий центр «Інститут біології та медицини» Київського національного університету ім. Т. Шевченка

³Лікарня ветеринарної медицини

⁴Національний інститут раку, Київ, Україна

На сучасному етапі розвитку біологічної науки широко обговорюється питання застосування стовбурових клітин (СК) для лікування раку. Однак згідно з даними літератури результати впливу мезенхімальних СК (МСК) на пухлинний процес є неоднозначними і потребують подальших досліджень.

Метою досліджень було визначення впливу алогенних МСК на біологічні характеристики клітин первинної пухлини у мишей з трансплантованою карциномою легені Льюїс (КЛЛ).

Об'єкт і методи. Дослідження проводили на самцях мишей C57Bl/6 масою тіла 20–22 г віком 2–3 міс. МСК отримували з кісткового мозку і культивували за температури 37 °C (100% вологості, 5% CO₂) у середовищі Ігла, модифікованого Дюльбекко, з додаванням 20% фетальної сироватки бика (Sigma, USA), 1 мкл/см³ антибіотика-антимікотика (Sigma, USA). Середовище культивування змінювали кожні 3–4 доби. Суспензію пухлинних клітин в кількості 1 • 10⁶/0,1 мл розчину

Хенкса інокулювали мишам внутрішньом'язово в ділянку стегна. Мишам дослідної групи вводили алогенні МСК (по $1,25 \cdot 10^4$ клітин) на 8-му добу після інокуляції пухлинних клітин. Використовуючи метод проточної цитофлуориметрії, визначали вплив алогенних МСК (на 20-ту добу після трансплантації пухлини) на розподіл клітин КЛЛ за фазами клітинного циклу. Визначали також розподіл клітин первинної культури КЛЛ за фазами клітинного циклу.

Результати. За системного введення алогенних МСК тваринам із перещепленою КЛЛ кількість анеуплоїдних клітин у первинній пухлині збільшилася у 1,3 раза (у дослідній групі — $76,68 \pm 1,99\%$ проти $59,20 \pm 1,71\%$ у контрольній, $p < 0,05$). Збільшення цієї популяції клітин супроводжувалося зростанням проліферативного пулу, кількість клітин в $G_2/M+S$ становила $68,02 \pm 3,42\%$ у тварин дослідної групи і $56,17 \pm 2,90\%$ ($p < 0,05$) — у контролі. Кількість диплоїдних клітин у пухлинній тканині за впливу МСК достовірно зменшилася (у 1,7 раза). У дослідній групі спостерігали зниження проліферативного пулу $G_2/M+S$ диплоїдних клітин (до $6,86 \pm 2,02\%$) на противагу підвищенню цього показника у контролі (до $23,35 \pm 3,45\%$, $p < 0,001$). У дослідних тварин кількість диплоїдних клітин субпопуляції G_0/G_1 зростає до $93,18 \pm 2,01$ ($p < 0,01$).

Висновок. Системне введення алогенних МСК тваринам з трансплантованою КЛЛ зумовлює достовірне зростання вмісту анеуплоїдних клітин та збільшення їх кількості в проліферативній фазі $G_2/M+S$, а також накопичення диплоїдних клітин у фазі спокою G_0/G_1 .

ВПЛИВ АЛОГЕННИХ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН КІСТКОВОГО МОЗКУ НА ПУХЛИННИЙ РІСТ І ПРОЦЕСИ МЕТАСТАЗУВАННЯ У МИШЕЙ З ТРАНСПЛАНТОВАНОЮ КАРЦИНОМОЮ ЛЕГЕНІ ЛЬЮІС

Л. Кладницька¹, А. Мазуркевич¹, М. Малюк¹, В. Томчук¹, Л. Калачнюк¹, С. Величко³, В. Данилов¹, Ю. Харкевич¹, Т. Каченко¹, Д. Шелест², В. Величко¹, Ю. Ступак², О. Колотій²

¹Національний університет біоресурсів і природокористування України

²Навчально-науковий центр «Інститут біології та медицини» Київського національного університету ім. Т. Шевченка

³Лікарня ветеринарної медицини, Київ, Україна

Раніше було показано, що системне ведення алогенних мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) тваринам з трансплантованою карциномою легені Льюїс (КЛЛ) впливає на біологічні властивості пухлинних клітин, зумовлюючи збільшення кількості анеуплоїдних клітин та блокування диплоїдних клітин у фазі спокою G_0/G_1 .

Метою роботи було дослідження впливу алогенних МСК на пухлинний ріст і метастазування КЛЛ.

Об'єкт і методи. Дослідження проводили на самцях мишей C57Bl/6 масою тіла 20–22 г віком 2–3 міс. МСК отримували з кісткового мозку і культивували за температури 37 °C (100% вологості, 5% CO_2) у середовищі Ігла, модифікованого Дюльбекко, з додаванням 20% фетальної сироватки бика (Sigma, USA), 1 мкл/см³ антибіотика-антимікотика (Sigma, USA). Середовище культивування змінювали кожні 3–4 доби. Суспензію клітин КЛЛ

в кількості $1 \cdot 10^6/0,1$ мл розчину Хенкса інокулювали мишам внутрішньом'язово в ділянку стегна. Після інокуляції пухлинних клітин на 8-му добу миші експериментальної групи отримували алогенні МСК ($1,25 \cdot 10^4$ клітин/мишу). В обох групах визначали масу пухлини, кількість та лінійні розміри легеневих метастазів.

Результати. З 14-ї доби після трансплантації пухлини реєстрували достовірне зменшення маси тіла мишей експериментальної групи у порівнянні з контрольною групою. Встановлено, що при введенні МСК тваринам із трансплантованою КЛЛ маса пухлини збільшилася на 41,7% порівняно з показниками контролю ($4,0 \pm 0,4$ г проти $2,7 \pm 0,3$ г відповідно, $p < 0,05$). Об'єм метастазів у тварин цієї групи збільшився у 2,8 раза порівняно з аналогічним показником в контрольній групі ($29,8 \pm 6,1$ мм³ проти $10,3 \pm 4,1$ мм³ відповідно, $p < 0,05$). При цьому виявлено, що кількість метастазів розміром $> 0,5$ мм зростає майже вдвічі після введення МСК.

Висновок. Показано, що внутрішньовенне введення алогенних МСК у тварин із трансплантованою КЛЛ призводить до стимуляції пухлинного процесу, що проявляється у збільшенні маси пухлини та загальному об'єму легеневих метастазів. Збільшення кількості легеневих метастазів розміром понад 0,5 мм свідчить про перехід пухлинного процесу у васкулярну стадію.

ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ ЧУТЛИВОСТІ КЛІТИН РАКУ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ ЛЮДИНИ ІЗ РІЗНИМ СТУПЕНЕМ ЗЛОЯКІСНОСТІ ДО ВІРУСУ ХВОРОБИ НЬЮКАСЛА IN VITRO

Т.П. Козак^{1,2}, О.О. Лихова¹, Н.О. Безденежних¹, Н.В. Видасов¹

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

²Навчально-науковий центр «Інститут біології та медицини» Київського національного університету ім. Т. Шевченка, Київ, Україна

Рак молочної залози (РМЗ) є найпоширенішим типом раку серед жінок. Це гетерогенне захворювання, яке включає варіанти клітин, різноманітні за гістологічним типом та наявністю прогностичних маркерів (ER, PR, HER2) і, відповідно, відмінні за ступенем злоякісності, що ускладнює вибір тактики лікування. Зазвичай у комплексній терапії раку застосовують хірургічне втручання, хімотерапію та радіотерапію, однак із відкриттям здатності певних вірусів вибірково вбивати пухлинні клітини почали застосовувати і віротерапію. Вірус хвороби Ньюкасла (NDV) — це складний вірус, геном якого представлений (–)РНК. Він патогенний для домашньої птиці, однак є безпечним для людей. Окрім прямої цитотоксичної дії на пухлинні клітини, цей вірус має здатність індукувати продукцію таких протипухлинних цитокінів, як інтерферон та фактор некрозу пухлин. Актуальним є дослідження дії NDV *in vitro* на пухлинні клітини РМЗ із різним ступенем злоякісності.

Мета: оцінити та порівняти *in vitro* цитотоксичну дію NDV нелітичного штаму LaSota на клітини РМЗ людини з різним ступенем злоякісності.

Об'єкт і методи. У роботі використовували клітини ліній аденокарциноми молочної залози людини MDA-MB-231 (claudin-low, ER⁻, PR⁻, HER2⁻, мезенхімального фенотипу) та MCF-7 (luminal A, ER⁺, PR^{+/-}, HER2⁻, епітеліального фенотипу) та NDV низьковірulentного нелі-

тичного вакцинного штаму LaSota у вихідній концентрації $8 \cdot 10^6$ БУО/100 мкл або 800 ГАО/мл. Застосовували вірусологічні методи та методи культури клітин.

Результати. Була виявлена вища чутливість клітин MCF-7 до цитотоксичної дії NDV у порівнянні із клітинами MDA-MB-231. Після 48 год інкубації клітин, інфікованих NDV, титр вірусу за визначенням IC_{50} для клітин MCF-7 становив 2,58 ГАО/мл, а для клітин MDA-MB-231 — 8,0 ГАО/мл. Слід зазначити, що згідно з дослідженнями, які були проведені в нашій лабораторії раніше, титр NDV на рівні IC_{50} для клітин недрібноклітинного раку легені людини лінії A-549 становив 3,08 ГАО/мл, а для іморталізованих нормальних клітин нирки ембріона свині SPEV — 12,31 ГАО/мл.

Висновок. Клітини лінії MCF-7 більш чутливі до NDV нелітичного штаму LaSota, ніж MDA-MB-231, за однакових умов культивування *in vitro*. Цитотоксична активність NDV штаму LaSota вища для пухлинних клітин ліній MCF-7, MDA-MB-231 та A-549, ніж для нормальних клітин лінії SPEV.

ВИБІР ТАКТИКИ КОМБІНОВАНОГО ЛІКУВАННЯ МІСЦЕВО-ПОШИРЕНОГО РАКУ ПРЯМОЇ КИШКИ

О.О. Колеснік, Д.Е. Махмудов, В.В. Звірч, А.А. Шудрак, А.П. Безносенко

Національний інститут раку, Київ, Україна

За даними Національного канцер-реєстру та провідних світових баз даних, місцево-поширений рак прямої кишки (МППРК) становить до 20% всіх первинно виявлених пухлин. Ця форма характеризується несприятливим прогнозом перебігу. На сьогодні відсутні загальноприйняті стандарти діагностики, стадіювання та лікувальної тактики МППРК.

Мета: дослідити ефективність основних способів комбінованого лікування хворих на МППРК.

Об'єкт і методи. У період з 2008 по 2013 р. комбіноване лікування проведено 123 пацієнтам з МППРК. До основної групи увійшли 43 пацієнти, у яких неoad'ювантне лікування застосовували у вигляді телегаматерапії у сумарній вогнищевій дозі 50–60 Гр на фоні 2–3 курсів поліхіміотерапії на основі оксаліплатину та фторпіримідинів із подальшим оперативним втручанням через 8–10 тиж. До групи порівняння увійшли 80 пацієнтів, яким неoad'ювантне лікування проводилося у вигляді телегаматерапії 30–40 Гр із призначенням фторпіримідинів в якості радіомодифікаторів із подальшим оперативним втручанням через 4–6 тиж.

Результати. У цілому було зафіксовано 12 (29%) проявів гематологічної токсичності у пацієнтів основної групи, 20 (25%) — у контрольній групі; 16 проявів гастроінтестинальної токсичності у 6 (42%) пацієнтів основної групи та 19 проявів у 12 (38%) пацієнтів в контрольній групі; 7 інших проявів токсичності у 4 (29%) і 11 — у 8 (25%) пацієнтів відповідно. У більшості пацієнтів основної та контрольної груп відповідь на хіміопроменеву терапію (ХПТ) проявилася стабілізацією процесу (64 і 72% відповідно). Часткова регресія була відзначена в 29 і 22%, повна регресія (урT0) — у 1 пацієнта основної та 2 пацієнтів контрольної групи. Статистично достовірних відмінностей між групами не отримано. Інша тенденція спостерігалася при оцінці відповіді на ХПТ залежно від критеріїв mrTRG: так, 36% пацієнтів основної групи продемонстрували ступінь регресу mrTRG-2, 60% пацієнтів контрольної групи — mrTRG-3, що свідчить

про досить високий рівень ефективності ХПТ, попри відсутність зниження ступеня поширеності первинної пухлини відповідно до критеріїв RECIST. Загальна 5-річна виживаність становила в основній групі $55,0 \pm 12,3\%$ з медіаною 24 міс; в контрольній — $39,0 \pm 9,7\%$ з медіаною в 27 міс. Загальна 5-річна безрецидивна виживаність становила в основній групі $34,0 \pm 11,4\%$ з медіаною 11 міс; у контрольній групі — $28,0 \pm 11,7\%$ з медіаною 14 міс ($p < 0,05$).

Висновок. Проведення неoad'ювантної ХПТ (променевим навантаженням 50–60 Гр на фоні поліхіміотерапії на основі оксаліплатину) не викликає значного підвищення рівня токсичності, сприяє збільшенню частоти регресії пухлин та дає можливість підвищити загальну та безрецидивну виживаність у хворих на МППРК.

ПРОГНОСТИЧНІ МОЛЕКУЛЯРНО-БІОЛОГІЧНІ МАРКЕРИ ЗЛОЯКІСНОЇ ФІБРОЗНОЇ ГІСТІОЦИТОМИ

О.О. Литвиненко¹, Т.В. Борікун², Д.М. Горбик², Т.В. Задворний²

¹Національний інститут раку

²Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, Київ, Україна

Злоякісна фіброзна гістіоцитома (ЗФГ) є однією з найбільш розповсюджених пухлин м'яких тканин у дорослих. Варіабельність перебігу ЗФГ потребує пошуку додаткових маркерів, асоційованих із розвитком рецидивів цієї нозологічної форми онкопатології.

Мета: дослідити молекулярно-біологічні та епігенетичні особливості первинних та рецидивуючих ЗФГ.

Об'єкт і методи. Дослідження проведено на операційному матеріалі 46 хворих на ЗФГ T2bN0M0 стадії, що проходили лікування протягом 2008–2018 рр. в Національному інституті раку. Залежно від клінічного перебігу ЗФГ пухлини досліджених хворих були розподілені наступним чином: група 1 — 24 пухлини хворих, що мали сприятливий перебіг захворювання; група 2 — 22 пухлини хворих, у яких протягом перших трьох років після верифікації діагнозу діагностовано рецидив ЗФГ. У роботі використано методи проточної цитофлуориметрії, імуногістохімії, полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі.

Результати. Вивчення ДНК-цитометричних параметрів показало, що досліджені групи відрізняються значною гетерогенністю за показниками плідності ЗФГ. Серед ЗФГ хворих групи 1 визначалися як диплоїдні (70%), так і анеуплоїдні (30%) новоутворення, в той час як у хворих групи 2 всі досліджені пухлини були диплоїдними (100%). Аналіз розподілу клітин за фазами клітинного циклу в групі 1 показав, що основна частина клітин диплоїдних пухлин знаходилася в G_0/G_1 фазі клітинного циклу ($83,7 \pm 18,4\%$). Натомість у групі 2 цей показник становив $69,7 \pm 6,2\%$. Вміст клітин у G_2+M фазі був практично однаковим в обох групах. Кількість клітин в S-фазі клітинного циклу у пухлинах хворих групи 2 була у 3 рази більшою у порівнянні з пухлинами хворих групи 1. Показано, що проліферативна активність пухлинних клітин хворих групи 1 була низькою і становила $2,6 \pm 1,4\%$ (анеуплоїдні) та $25 \pm 2,1\%$ (диплоїдні). У клітинах пухлин хворих групи 2 цей показник був високим і становив $68,9 \pm 3,3\%$ (диплоїдні).

Для з'ясування епігенетичної складової у формуванні ступеня злоякісності ЗФГ нами проаналізовано рівень

експресії мікроРНК, що беруть участь у регуляції клітинного циклу та проліферативної активності. Визначено, що пухлини хворих на ЗФГ зі сприятливим та несприятливим перебігом відрізняються за профілем експресії досліджених мікроРНК. Характерною ознакою пухлин хворих на ЗФГ з несприятливим перебігом було підвищення рівня експресії мікроРНК-182 та -199а ($4,5 \pm 0,9$ та $5,0 \pm 0,6$ ум. од. відповідно) на тлі зниження рівня експресії мікроРНК-34а ($0,5 \pm 0,09$ ум. од.). Аналогічні показники у хворих на ЗФГ, що мали сприятливий перебіг, були меншими відповідно у 1,5 та 2 рази для мікроРНК-182 та -199а, а також вищими на 56% для мікроРНК-34а. Експресія мікроРНК-199а та -182 прямо корелює із проліферативною активністю та ступенем диференціювання ЗФГ в обох досліджених групах. Рівень мікроРНК-34а, навпаки, зворотно корелює із зазначеними показниками. Встановлено пряму кореляцію експресії мікроРНК-182, -199а та обернену кореляцію експресії мікроРНК-34а із виникненням рецидивів захворювання у 3-річний термін ($r = 0,59$, $r = 0,68$, $r = -0,71$ відповідно).

Висновки. Визначено характерні молекулярно-біологічні ознаки та деякі епігенетичні особливості первинних та рецидивуючих ЗФГ. Встановлено, що досліджені рецидивуючі ЗФГ є диплоїдними новоутвореннями з високою проліферативною активністю. Доведено зв'язок показників експресії мікроРНК-34а, -182 та -199а зі ступенем диференціювання та проліферативною активністю ЗФГ, а також із ризиком виникнення рецидиву захворювання. Отримані дані свідчать про можливість використання розробленої панелі маркерів для прогнозування агресивності перебігу ЗФГ.

БІОІНФОРМАТИЧНІ ІНСТРУМЕНТИ ОБРОБКИ ЗОБРАЖЕНЬ ДЛЯ ПОЛІПШЕННЯ АВТОМАТИЗОВАНОЇ ДІАГНОСТИКИ ТА ПРОГНОЗУ ПЕРЕБІГУ ОНКОЛОГІЧНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ

*М.Г. Мазур, В.В. Сарнацький, Т.В. П'ятчаніна
Інститут експериментальної патології, онкології
і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України,
Київ, Україна*

За даними Національного канцер-реєстру, в 2017 р. в Україні захворюваність на рак молочної залози (РМЗ) становила 74,4 випадку на 100 тис. населення, на рак передміхурової залози (РПЗ) — 41,2, що свідчить про необхідність розробок у напрямку поліпшення діагностики, прогнозування та лікування пацієнтів з цією патологією. Патогістологічна експертиза тканинних зрізів пухлинного післяопераційного матеріалу чи тканинного матеріалу біопсії — це золотий стандарт діагностики злоякісних новоутворень (ЗН), важливий для проведення клініко-патологічної кореляції та прогнозування. Процес підготовки гістологічних препаратів є трудомістким, характеризується варіабельністю якості та типів протоколів методик і реагентів. Тому актуальним є вдосконалення діагностики та прогнозу перебігу ЗН шляхом комп'ютерної автоматизації аналізу медичних мікрозображень за допомогою сучасних інструментів біоінформатики.

Мета: аналіз досвіду практичного застосування інструментів біоінформатики для задач обробки медичних мікрозображень з метою діагностики та прогнозу перебігу РМЗ та РПЗ.

Об'єкт і методи. Аналітичні та синтетичні дослідження масиву наукової інформації щодо біоінформатичних методів та інструментів обробки медичних зображень.

Результати. Проаналізовано методи і підходи біоінформатики як інструменти вирішення завдань обробки медичних зображень (цитологічних, гістологічних, імуногістологічних, імуноцитологічних мікрофото) гормонозалежних пухлин (РМЗ та РПЗ). Визначено ключові, найбільш поширені інструменти біоінформатики — кластерний аналіз, штучні нейронні мережі (ШНМ), глибокі алгоритми навчання, програмні платформи та мови програмування тощо. Розглянуті інструменти дозволяють здійснювати аналіз та класифікацію великих масивів графічних даних. Визначено пріоритетні напрями досліджень з переважанням вирішення завдань для напрямів «Уточнена та диференційна діагностика», «Прогноз перебігу захворювання». Практично значущими засобами виявилися: Computer-Aided Diagnosis; Computer-Aided Prognosis; Markov models for Decision Making; Artificial Neural Networks; Deep Learning Networks; Effective Statistical Texture Detection Algorithm; Wavelet Transform, Principal Component Analysis; Dimensional Principal Component Analysis; Support Vector Machine (SVM); Convolutional Neural Networks (CNN); Neural Network Classifier; Fuzzy C-Means Clustering; Shearlet transform; Self-Adaptive Resource Allocation Network Classifier; Classifier F-means; Classifier Navie Bayes; Classifier RBF; Classifier MLP; Classifier C4.5; Watershed Segmentation; H-maxima Segmentation; Hough Transform; Active Contour Model; Spatial Constraint Clustering; Multiphase Level Set; Graph Cut; Multi-Resolution Graph Cut; Dynamic Thresholding; Morphology Segmentation; Radial Symmetry Transform; Geodesic Active Contour Model; Texture Based Probability Map; Segmentation Clng. Виявлено широкий спектр методів ШНМ та завдань обробки медичних мікрозображень, які вони вирішують. Наприклад, щодо класифікації зображень біопсії РМЗ розроблено комбінований метод з використанням згорткових ШНМ — CNN та класифікатора на основі методу опорних векторів SVM. Метод розподіляє зображення за чотирма класами: нормальна тканина, доброякісні утворення, карцинома *in situ* та інвазивна карцинома (точність 77,8%, чутливість 95,6%). Н. Rezaeilouyeh та співавтори (2016) вперше автоматизували класифікацію РПЗ за різними класами шкали Глісона (G2–G5) шляхом поєднання методом Multiple Kernel Learning морфологічних, кольорових ознак та коефіцієнтів Shearlet transform. Досягнуто високої точності обробки мікрофото 100 зразків РПЗ за 4 класами агресивності пухлин. Новим сучасним і актуальним напрямком є розробка алгоритмів, автоматичних та функціональних інструментів, додатків, платформ, програм, баз графічних даних, що мають досить високий рівень складності і характеризуються унікальністю компонування різноманітних математичних та інформатичних методів, засобів та підходів. Нові розробки мають високу чутливість, специфічність, точність аналізу медичних мікрофото з кінцевою метою автоматизації процесу для поліпшення діагностики гормонозалежних пухлин та прогнозу перебігу захворювання.

Висновок. Біоінформатичні інструменти широко застосовують для діагностики та прогнозу РМЗ та РПЗ і здатні забезпечувати аналіз великих наборів графічних даних, мають високу точність, специфічність та чутливість. Актуальним напрямком подальших досліджень є розробка нових підходів на основі найбільш ефективних для впровадження в клінічній онкологічній практиці.

ЕКСПРЕСІЯ МОЛЕКУЛЯРНО-БІОЛОГІЧНИХ МАРКЕРІВ У ПУХЛИНАХ ХВОРИХ З РЕЦИДИВОМ РАКУ ЕНДОМЕТРІЯ

Ю.А. Моїсєснко, М.А. Теплова, Ю.В. Харченко
ДУ «Інститут медичної радіології ім. С.П. Григор'єва
НАМН України», Харків, Україна

Протягом останніх двох десятиріч в Україні відзначається зростання захворюваності на рак ендометрія (РЕ), який, за даними Національного канцер-реєстру України, нині становить 28 випадків на 100 000 жіночого населення (у 2007 р. — 26,4). Одним з найбільш актуальних і перспективних напрямків, який дозволяє глибше зрозуміти етіологію і патогенез злоякісного росту, вивчити процеси, що відбуваються в організмі хворого, є дослідження молекулярно-біологічних маркерів (МБМ), які характеризують апоптоз, проліферацію клітин і ангиогенез. Проте досі не визначені найбільш значимі МБМ для прогнозування перебігу захворювання і вибору обгрунтованої терапії.

Мета: вивчити молекулярно-біологічні особливості пухлини у хворих з рецидивом РЕ.

Об'єкт і методи. Проведено аналіз рівня експресії МБМ (p53, Vcl-2, Ki67, VEGF, ER, PR) у 21 пацієнтки на РЕ з рецидивом захворювання та без нього. Рецидив виник у 12 (57,1%) пацієнток. З них з I стадією (T1a–bN0–1M0) РЕ було 5 (41,7%), з II (T2N0–1M0) — 2 (16,7%), з III (T3N0–1M0) — 1 (8,3%), з IV (T3N0–1M1) — 4 (33,3%). Рецидиви захворювання були відсутні у 9 (42,9%) хворих на РЕ III–IV стадії.

Результати. Найчастіше рецидив захворювання виникав на вагінальному рубці, розвивалися метастази в лімфатичній системі та легенях, спостерігалася генералізація процесу по черевній порожнині.

Порівняльний аналіз рівня експресії МБМ показав, що у хворих на РЕ з рецидивом захворювання, на відміну від пацієнток без нього, існує тенденція до зростання позитивного рівня VEGF (66,7 та 50,0% відповідно) та помірного рівня експресії mtr53 (16,7 та 0% відповідно), а також до зниження проліферативної активності, оціненої за маркером Ki-67 (16,7 та 33,3% відповідно). У більшості пацієнток з рецидивом захворювання відмічено негативний статус ER та PR (41,7 та 22,3% відповідно), у хворих без рецидиву частіше виявляли позитивний статус ER та PR (66,7% та 33,3% відповідно).

Встановлено залежність рівня експресії МБМ у хворих на РЕ з рецидивом захворювання від гістологічної форми пухлини. У пацієнток із помірно диференційованою аденокарциномою значення як позитивного, так і негативного VEGF було однаковим (по 50%) на фоні високої експресії Vcl-2 (100%), негативної експресії mtr53 (100%), помірної проліферативної активності за Ki-67 (50%), позитивного статусу ER і PR (58,3 та 66,7% відповідно). У пацієнток з низькодиференційованою аденокарциномою значення як позитивного, так і негативного VEGF було аналогічним (по 50%) на фоні високої експресії Vcl-2 (87,5%), негативної та помірної експресії mtr53 (50%), високої проліферативної активності (Ki-67; 100%) та негативного статусу ER і PR (60%).

Висновки. Висока експресія VEGF та низька проліферативна активність (Ki-67) в поєднанні з негативним статусом ER та PR може свідчити про високий ризик

розвитку рецидиву РЕ. Рівень експресії МБМ та рецепторів ER і PR у хворих на РЕ залежить від гістологічної форми пухлини.

ПРОГНОСТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ ДИНАМІКИ ЕКСПРЕСІЇ МАРКЕРА HE-4 У ХВОРИХ НА РАК ЯЄЧНИКА

К.В. Немальцова

ДУ «Інститут медичної радіології ім. С.П. Григор'єва
НАМН України», Харків, Україна

Рак яєчника (РЯ) — найбільш поширена форма онкопатології у жінок репродуктивного віку в усьому світі, а проблема діагностики цього захворювання і сьогодні залишається актуальною. Визначення пухлинних маркерів є одним із найбільш перспективних напрямків в діагностиці злоякісних пухлин. СА-125 — золотий стандарт у діагностиці РЯ. Після ідентифікації HE-4 (human epididymis protein 4) було започатковано його активне вивчення. Експресію HE-4 виявлено в численних нормальних тканинах, а також у тканинах пухлин яєчника.

Мета: визначити прогностичне значення динаміки вихідних та післяопераційних рівнів пухлинних маркерів HE-4 і СА-125 у хворих на РЯ для оцінки ризику виникнення рецидивів.

Об'єкт і методи. Відібрано 60 пацієнток з відомими показниками HE-4 і СА-125 на момент встановлення діагнозу та після хірургічного лікування. 4 пацієнтки мали РЯ I стадії, 11 — II, 30 — III та 15 — IV. Більшість обстежених пацієнток (n = 50) мали серозний РЯ. Дискримінаційний рівень (ДР) пухлинного маркера СА-125 не залежить від віку хворої і становить 35 ОД/мл. ДР HE-4 у пременопаузі становить < 70 пмоль/л, а в постменопаузі — < 140 пмоль/л. Статистична обробка отриманих даних здійснювалася за допомогою пакета програм STATISTICA 10.0.

Результати. Частка пацієнток з підвищеними рівнями експресії HE-4 сягала 83,3%, в той час як експресія СА-125 перевищувала допустимі рівні в 95,0% спостережень. У післяопераційний період рівні досліджуваних маркерів значно знизилися: HE-4 — в 4,4 раза, а СА-125 — в 5,1 раза. Слід зазначити, що після хірургічного етапу лікування у частини пацієнток спостерігали нормалізацію рівнів експресії маркерів, частка пацієнток з підвищеними значеннями HE-4 становила 26,7%, СА-125 — 63,3%. У групі пацієнток з рецидивом звертають на себе увагу більш високі вихідні та післяопераційні максимальні значення експресії HE-4 (8650,00 і 1470,00 пмоль/л відповідно). При аналізі рівнів СА-125 у пацієнток з рецидивом РЯ виявлено, що вихідні показники вищі за післяопераційні у 7 разів (896,92 і 128,03 ОД/мл), а у пацієнток без пролонгації процесу — в 4,3 раза (637,64 і 146,68 ОД/мл).

Гіпотезою, що перевірялася під час дослідження, був можливий зв'язок між тривалістю безрецидивного періоду та динамікою експресії HE-4 до та після оперативного втручання. Введено додатковий розрахунковий показник відносної динаміки маркера (%dHE-4), який обчислювали за формулою:

$$\%dHE-4 = \frac{\text{вихідний рівень} - \text{післяопераційний рівень}}{\text{вихідний рівень}} \cdot 100\%$$

З'ясовано, що цей показник має статистично значущий характер (p = 0,050) із коефіцієнтом кореляції R = 0,46.

Висновки. Проведення хірургічного етапу лікування сприяє зниженню рівнів експресії маркерів HE-4 і СА-

125, однак у частини пацієнток маркери залишаються підвищеними, особливо СА-125. Як вихідні, так і після операційні рівні маркерів HE-4 і СА-125 у групі пацієнток з рецидивом були в 2,2–2,3 раза вищими, ніж в групі без рецидиву. Тривалість безрецидивного періоду корелює з динамікою рівня маркера HE-4 до і після хірургічного лікування.

ГЕТЕРОГЕННІСТЬ ГЕМОПОЕТИЧНИХ КЛІТИН-ПОПЕРЕДНИКІВ ОСІБ, ХВОРИХ НА МІЕЛОДИСПЛАСТИЧНИЙ СИНДРОМ, У КУЛЬТУРИ *IN VITRO*

М.В. Пахаренко¹, Г.С. Стародуб²

¹Національний університет
«Києво-Могилянська академія»

²ДУ «Інститут гематології та трансфузіології
НАМН України», Київ, Україна

Існування лейкомічних стовбурових клітин не викликає сумніву, однак функціонування лейкомічних клітин-попередників у хворих на мієлодиспластичний синдром (МДС) потребує подальшого вивчення. Проблема лікування пацієнтів з МДС на сьогодні залишається актуальною. Це пов'язано з переважанням пацієнтів похилого віку, наявністю супутньої патології, складністю самої процедури трансплантації та недоступністю сумісного донора. Лікування МДС зводиться до усунення симптомів захворювання та зниження ризику трансформації у гостру мієлоїдну лейкемію (ГМЛ). Вивчення лейкомічних стовбурових клітин у культурі *in vitro* дозволить своєчасно і ефективно застосувати корекцію у лікуванні таких хворих.

Мета: охарактеризувати особливості культивування *in vitro* гемопоетичних клітин-попередників кісткового мозку (КМ) хворих на МДС.

Об'єкт і методи. Предметом дослідження були гемопоетичні клітини-попередники, отримані з КМ п'яти пацієнтів з МДС (рефрактерна анемія). Мононуклеарну фракцію клітин КМ виділяли шляхом центрифугування у градієнті щільності Histopaque. Клітини культивували протягом 8 діб у напіврідкому середовищі DMEM з 20% фетальної телячої сироватки, 20 нг/мл гранулоцитарного колоніестимулюючого фактора (ГКФ) людини філграс-тиму, 3,3% агару Difco, 2 ммоль/л L-глутаміну та антибіотиками (пеніцилін/стрептоміцин 50 од/мл). Паралельно культивували суспензійну культуру у живильному середовищі того ж складу без додавання агару та ГКФ. Отримані культури досліджували під інвертованим мікроскопом (Olympus CK-2, Японія).

Результати. Проаналізовано колонієутворюючу здатність клітин-попередників КМ пацієнтів з МДС. Помічено, що здатність до колонієутворення клітин КМ обмежена. Встановлено, що використання у якості ростового фактора 20 нг/мл філграс-тиму призводить до утворення у напіврідкому агарі колоній ($8,0 \pm 1,2$) на 8-й день культивування. Подібна картина спостерігалася і для суспензійної культури без додавання ГКФ — на 8-й день культивування виявляли $12,0 \pm 2,4$ кластерів та $53,1 \pm 4,2$ колоній. Важливо зазначити, що при подальшому культивуванні відмічалася згасання культури, що зумовлено виснаженням ресурсу ростового фактора і природою культивованих злоякісних клітин.

Висновок. Культивування КМ пацієнтів із МДС з використанням 20 нг/мл ГКФ людини філграс-тиму у напіврідкому агарі призводило до утворення колоній. У разі культивування суспензійної культури без додавання рос-

тового фактора ріст відбувався значно інтенсивніше за рахунок наявності у живильному середовищі 20% фетальної телячої сироватки.

Для культивування гемопоетичних клітин-попередників пацієнтів із МДС в умовах *in vitro* наявність у живильному середовищі ГКФ не є обов'язковою, важливою залишається наявність фетальної телячої сироватки у концентрації 20%.

ІЗОЛЬОВАНІ МЕТАСТАЗИ КІСТОК У ЧОЛОВІКІВ ІЗ ПІДВИЩЕНИМ РІВНЕМ СИРОВАТКОВОГО МАРКЕРА PSA З ПОГЛЯДУ МОРФОЛОГІЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ КАРЦИНОМ НЕВІДОМОЇ ПЕРВИННОЇ ЛОКАЛІЗАЦІЇ

О.В. Пославська

ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України»,
Дніпро, Україна

Рівень сироваткового простатспецифічного антигену (PSA) широко використовується в онкологічній практиці для скринінгу раку передміхурової залози (ПЗ). У випадках злоякісного новоутворення невідомого походження у чоловіків з метастазами в кістках саме рівень сироваткового PSA може стати вирішальним для подальшого лікування. У літературі описано карциноми (К) з метастазами в кістках у чоловіків з підвищеним рівнем PSA у сироватці крові, що були двічі спростовані біопсією ПЗ, але мали позитивну динаміку під час проведення антиандрогенної терапії (bicalutamide) в поєднанні із хіміотерапією (zoledronic acid).

Мета: дослідити комплекс морфологічних, морфометричних (ImageJ) та імуногістохімічних (ІГХ) характеристик метастазів у кістках К невідомої первинної локалізації у чоловіків з підвищеним рівнем сироваткового PSA у порівнянні із первинними К ПЗ для вдосконалення діагностичних алгоритмів.

Об'єкт і методи. Проведено ретроспективний аналіз біопсійного матеріалу 21 пацієнта з первинною К ПЗ віком від 56 до 82 років (середній вік $66,0 \pm 7,8$ року; медіана 65 років) та 10 пацієнтів з метастазами К в кістках без первинної локалізації та з підвищеним рівнем сироваткового PSA віком від 43 до 57 років (середній вік $50,0 \pm 9,9$ року; медіана 46,5 року). За допомогою мікроскопа Zeiss Primo Star — AxioCam ERC 5s з ліцензованим програмним забезпеченням ZEN 2 blue edition інформативні поля зору були зафіксовані в форматі .jpg і оброблені в програмі ImageJ з визначенням периметра, площі та форми ядер пухлинних клітин. ІГХ дослідження проводили з первинними антитілами CD45, Cytokeratin, Pan, Vimentin, S100, PSA, CK 8/18, CK7, CK20, AR, AMACR згідно з протоколами компанії ThermoScientific (США).

Результати. У групі метастатичних К визначено переважання низькодиференційованих гістологічних форм аденокарцином (100%), об'єктивне зменшення площі та периметра ядер ($p = 0,00002$, $p < 0,0001$ відповідно), можливість втрати специфічних для ацинарних К ПЗ ІГХ маркерів AMACR (p504s) та AR (андрогенові рецептори) ($p = 0,008$) порівняно із первинними К ПЗ, що мають тенденцію до локального розповсюдження.

Висновок. Використання мінімальних первинної ІГХ панелі Cytokeratin, Pan (+)/Vimentin(-)/CD45(-)/S100(-) та вторинної — CK8(+)/PSA(+)/AMACR(+)/AR(+/-) дозволить довести відповідність фенотипу К невідомої первинної локалізації у чоловіків з метастатичним ураженням

кісток та підвищенням сироваткового PSA формі дисемінованої К ПЗ для обґрунтованого застосування терапії у випадках неінформативної біопсії.

ВИХІД АБЕРАЦІЙ ХРОМОСОМНОГО ТИПУ У ХВОРИХ НА РАК ЛЕГЕНІ ВПРОДОВЖ ДИСТАНЦІЙНОЇ ГАММА-ТЕРАПІЇ ^{60}Co НА АПАРАТІ РОКУС-АМ ТА МЕГАВОЛЬТНОЇ ТЕРАПІЇ НА ЛІНІЙНОМУ ПРИСКОРЮВАЧІ CLINAC 600C

Т.С. Сипко, Н.О. Мазник, Н.Д. Пшенічна, Л.К. Колтакова, В.П. Старенький

ДУ «Інститут медичної радіології ім. С.П. Григор'єва НАМН України», Харків, Україна

Променева терапія (ПТ) є одним з найбільш затребуваних методів лікування онкопатологій. Під час терапевтичного опромінення разом з тканинами пухлини радіаційного впливу зазнають і непухлинні клітини. Тому вивчення цитогенетичних ефектів у хворих онкологічного профілю є невід'ємною складовою заходів, спрямованих на мінімізацію наслідків променевого лікування.

Мета: оцінити рівень аберацій хромосомного типу в лімфоцитах периферичної крові (ЛПК) у хворих на рак легені при ПТ за дії різних джерел опромінення.

Об'єкт і методи. Методом класичного цитогенетичного аналізу визначали частоту радіаційно-індукованих аберацій хромосом у ЛПК 15 пацієнтів (віком від 53 до 79 років) з дрібноклітинним раком легені. ПТ проводили із застосуванням дистанційної гамма-терапії ^{60}Co на апараті РОКУС-АМ та мегавольтної терапії на лінійному прискорювачі Clinac 600C. Забір крові проводили до початку лікування, в середині курсу (після отримання 20 Гр) та наприкінці ПТ (після досягнення сумарної вогнищевої дози у 40 Гр). Лімфоцити культивували протягом 50–54 год з подальшим FPG-забарвленням метафазних препаратів відповідно до стандартного протоколу.

Результати. Сумарний рівень аберацій хромосомного типу ще до початку ПТ у пацієнтів був вірогідно вищим за значення групи порівняння. Протягом променевого лікування незалежно від джерела опромінення в обох досліджуваних групах хворих спостерігали підвищення сумарної частоти аберацій хромосомного типу та їх окремих видів. Рівень аберацій хромосомного типу до середини курсу перевищував у 10 разів відповідні значення до початку лікування. Після закінчення протирадіаційної ПТ частота радіаційно-індукованих пошкоджень у пацієнтів, що проходили лікування на апараті РОКУС-АМ, зростала у 16 разів, а при мегавольтній терапії на лінійному прискорювачі — у 18 разів. Розподіл дицентриків та центричних кілець у пацієнтів обох груп був наддисперсним щодо статистики Пуассона в середині та наприкінці дистанційної ПТ.

Висновки. Динаміка рівня аберацій хромосомного типу мала схожий характер при ПТ на апараті РОКУС-АМ і на лінійному прискорювачі Clinac 600C. Більш виражений приріст аберацій щодо променевих значень виявлено у пацієнтів, яким проводили ПТ на лінійному прискорювачі. Вивчення характеру динаміки цитогенетичних пошкоджень у пацієнтів з урахуванням різних режимів опромінення дозволить більш точно оці-

нити наслідки та ризики локального фракціонованого опромінення.

ПОРІВНЯННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ ВПЛИВУ ПРОТИПУХЛИННИХ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ НА КЛІТИННИХ МОДЕЛЯХ IN VITRO

Ю. Хмельницька^{1,2}, О. Перепеличина², Т. Гергелюк^{1,2}, Л. Остапченко¹, М. Сидоренко²

*¹Навчально-науковий центр
«Інститут біології та медицини»*

Київського національного університету ім. Т. Шевченка

*²Відділення біотехнічних проблем діагностики
Інституту проблем кріобіології і кріомедицини
НАН України, Київ, Україна*

Тестування протирадіаційних препаратів на моделі багатоклітинних пухлинних сфероїдів (БПС) може стати важливим етапом доклінічних випробувань, який дозволяє отримати більш повну інформацію щодо можливостей препарату впливати на різні клітинні популяції в пухлині.

Мета: порівняти чутливість БПС та моношарової культури клітин до дії протирадіаційних препаратів (цисплатину, метотрексату, доксорубіцину).

Об'єкт і методи. В якості моношарової культури використали клітини лінії MCF-7, які культивували за стандартних умов. БПС отримували шляхом культивування клітин лінії MCF-7 в неадгезивних умовах з додаванням 2% карбоксиметилцелюлози на орбітальному шейкері (PSU-10i, Biosan, Латвія). Протирадіаційні препарати додавали у таких концентраціях: цисплатин — 0,01 мкг/мл, 0,1 мкг/мл, 1 мкг/мл; метотрексат та доксорубіцин — 0,1 мкг/мл, 1 мкг/мл, 10 мкг/мл. Поживне середовище змінювали кожні 2 доби. Частку живих клітин визначали за допомогою МТТ-тесту. Розміри БПС вимірювали в програмі Stem2000 (Zeiss, Німеччина). Для статистичної обробки даних (програмний пакет Statistica 8) застосовували однофакторний аналіз дисперсії та t-критерій Стюдента. Поріг значень — $p \leq 0,05$.

Результати. Моношарова та сфероїдна культури однаково відображають тренди кореляції чутливість/стійкість пухлинних клітин (ПК) щодо концентрацій протирадіаційних препаратів (цисплатину, доксорубіцину, метотрексату). Резистентність ПК MCF-7 до метотрексату виявлена як в моношаровій, так і в сфероїдній культурі клітин. Дозозалежна чутливість до цисплатину та доксорубіцину була зазначена на обох клітинних моделях. Кількість живих ПК під впливом цисплатину у концентраціях 0,01–0,1–1,0 мкг/мл становила 96,5–92,2–77,5% відповідно. У сфероїдній культурі підвищення концентрації цисплатину зумовлювало зменшення об'єму БПС на 10% (0,01 мкг/мл), 50% (0,1 мкг/мл) та 90% (1,0 мкг/мл) проти контролю. Доксорубіцин сприяв дозозалежному зменшенню об'єму БПС на 60 та 80% (0,1 та 1,0 мкг/мл відповідно). При інкубуванні з доксорубіцином показано зниження чутливості клітин у БПС порівняно з моношаровою культурою. Так, за концентрації доксорубіцину 0,1 мкг/мл кількість живих клітин в моношарі зменшилася до 77%, а в сфероїдній культурі — до 84%.

Висновок. Отримані дані свідчать про нижчу чутливість клітин БПС (сфероїдної культури) до протирадіаційних лікарських засобів порівняно з клітинами моношарової культури. При тривалому культивуванні відсоток живих ПК в БПС був статистично вищим, ніж в моношаровій культурі клітин.

ОЦІНКА СТАНУ ІМУННОЇ СИСТЕМИ ТВАРИН-ПУХЛИНОНОСІЇВ ПІСЛЯ ЗАСТОСУВАННЯ НАНОКОМПЛЕКСІВ НА ОСНОВІ НАНОЧАСТИНОК ВАНАДІЮ ТА ХОЛЕСТЕРИНУ

О. Челомбітько, М. Бондарович, Н. Бабенко, Ю. Гаєвська,
А. Гольцев

Інститут проблем кріобіології та кріомедицини
НАН України, Харків, Україна

Взаємодія імунної системи та пухлини являє собою тонкий баланс між процесами імунної активації та супресії, що забезпечується функціонуванням імунокомпетентних клітин (зокрема природних кілерних клітин, Т- та В-лімфоцитів). Показана роль сполук ванадію в регуляції функціонування В- і Т-лімфоцитів, що дозволяє розглядати такі речовини в якості перспективних протипухлинних препаратів з імуномодулюючою дією.

Мета: оцінка впливу наноконкомплексів на основі наночастинок ортованадатів рідкісноземельних елементів $GdYVO_4:Eu^{3+}$ і холестерину на ріст аденокарциноми Ерліха (АКЕ) і стан імунної системи тварин-пухлиноносіїв.

Об'єкт і методи. Експерименти виконані на мишах лінії Balb/c на моделі АКЕ (асцитна форма). У дослідженні використані наноконкомплекси на основі наночастинок ортованадатів рідкісноземельних елементів $GdYVO_4:Eu^{3+}$ і холестерину, синтезовані в Інституті сцинтиляційних матеріалів НАН України. Тварини були розділені на дві групи: група 1 — перешеплення пухлинних клітин без попередньої інкубації з наноконкомплексами; група 2 — попередньо інкубовані протягом 3 год з наноконкомплексами клітини АКЕ вводили мишам інтраперитонеально ($3 \cdot 10^6$ клітин/мишу). Визначення кількості апоптотичних і некротичних пухлинних клітин після інкубації протягом 3 год з наноконкомплексами проводили шляхом забарвлення анексином-V (BD, USA, Cat. #556419) та пропідію йодидом (Sigma, USA, Cat. #81845–25MG). У тварин обох експериментальних груп на 7-му добу після інкубації пухлини визначали абсолютну кількість пухлинних клітин в перитонеальній порожнині та інтенсивність росту пухлини. На 2-гу, 4-ту, 7-му доби пухлинного росту у цих же тварин проводили оцінку субпопуляційного складу клітин селезінки за допомогою McAt до CD4, CD25, CD16/32, CD19 (BD Biosciences, США) цитофлуориметричним методом. В якості контролю використовували інтактних мишей лінії Balb/c.

Результати. Встановлено, що при розвитку АКЕ протягом 2–7 діб кількість клітин всіх досліджуваних субпопуляцій поступово зменшувалася, за винятком $CD4^+CD25^+$ -клітин, вміст яких в селезінці наприкінці строку спостереження був достовірно вищим, ніж в контролі. Це свідчить про поступовий розвиток імунодепресивного стану тварин-пухлиноносіїв, що створило сприятливі умови для розвитку АКЕ. Обробка наноконкомплексами зумовила збільшення кількості клітин з ознаками некрозу та пізнього апоптозу. Попередня обробка наноконкомплексами призводила до формування *in vivo* пулу пухлинних клітин з максимально зниженою проліферативною активністю — інгібіція росту пухлини при цьому становила $74,70 \pm 4,38\%$. Це супроводжувалося зростанням кількості $CD16/32^+$ -клітин та зниженням вмісту $CD4^+CD25^+$ -клітин в селезінці, що свідчить про активацію природних кілерних клітин та пригнічення супресорної ланки імунітету у відповідь на застосування наноконкомпозитів.

Висновок. Використання наноконкомплексів на основі наночастинок ортованадатів рідкісноземельних елементів $GdYVO_4:Eu^{3+}$ і холестерину зумовлює інгібіцію росту АКЕ у мишей лінії Balb/c та опосередковує активацію протипухлинної активності імунної системи тварин-пухлиноносіїв.

ПОЛІПЕПТИД ЕМАР II ЯК ПОТЕНЦІЙНИЙ АНТИАНГІОГЕННИЙ ТАРГЕТНИЙ АГЕНТ

І.М. Шуба¹, О.Ю. Цуварев², О.Я. Главацький¹, В.В. Лило²,
О.І. Корнелюк²

¹ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова
НАМН України»

²Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,
Київ, Україна

Злоякісні внутрішньомозкові пухлини головного мозку — найбільш поширена форма онкологічної патології із вкрай несприятливим прогнозом. Розвиток молекулярної біології та орієнтація на персоніфіковану медицину сприяли принципово новому підходу в лікуванні хворих — застосуванню молекулярних таргетних препаратів. Перспективним є використання білків, що демонструють протипухлинні властивості, мають низьку токсичність, можуть бути специфічно націлені на клітини-мішені та інгібують патологічні процеси. Відомо, що злоякісні гліоми характеризуються вираженою васкуляризацією, їх клітини продукують проангіогенні фактори, тому доцільним є застосування препаратів, для яких характерна антиангіогенна дія.

Мета: дослідити вплив цитокіну ЕМАР II (ендотеліальний моноцитактивуючий поліпептид II) на життєздатність гліомних клітин у первинній культурі у порівнянні з хіміотерапевтичним препаратом темозоломідом (TMZ).

Об'єкт і методи. Рекомбінантний поліпептид ЕМАР II людини був отриманий у відділі білкової інженерії і біоінформатики Інституту молекулярної біології і генетики НАН України з використанням генно-інженерних методів. З попередніх даних відомо, що ЕМАР II здатен впливати на властивості ендотеліальних клітин, моноцитів та лейкоцитів *in vitro*.

Клітини гліом отримували з фрагментів тканини пухлин головного мозку, вилучених під час хірургічного втручання. Культивування проводили в середовищі (DMEM — Dulbecco's modified Eagle's medium, «Sigma», США) із додаванням 10% ембріональної телячої сироватки («Sigma», США) в CO_2 -інкубаторі (ES-160 «Nüve», Туреччина) в стандартних умовах ($t = 37^\circ C$, 5% CO_2). Життєздатність клітин визначали за включенням 4% трипанового синього, підрахунок кількості клітин здійснювали за допомогою світлового мікроскопа та камери Горяєва.

Результати. Життєздатність клітин визначали після 24 год інкубації з препаратами білка ЕМАР II в діапазоні концентрацій від 1 до 1024 нМ та TMZ в діапазоні концентрацій від 8 до 256 мкМ. Показано, що ЕМАР II та TMZ впливають на життєздатність клітин, але діють за різними механізмами. ЕМАР II проявляє дозозалежні цитотоксичні властивості з максимумом в діапазоні концентрацій від 4 до 64 нМ. TMZ, що належить до препаратів з алкілюючим механізмом дії, більшою мірою діє як цитостатик, пригнічуючи поділ клітин. При цьому спостерігається обернено пропорційна залежність виживання клітин від дози TMZ у зазначеному діапазоні концентрацій.

Висновки. Поліпептид ЕМАР II є перспективною сполукою для подальших досліджень цитотоксичного впливу на гліомні клітини.

ОСОБЛИВОСТІ ЕКСПРЕСІЇ ЦИКЛІНУ D1 І ТРАНСКРИПЦІЙНОГО ФАКТОРА E2F1 У КЛІТИНАХ ЕПІТЕЛІАЛЬНИХ ПУХЛИН ЕНДОМЕТРІЯ

Н.П. Юрченко, А.О. Лавренова, Л.Г. Бучинська
 Інститут експериментальної патології, онкології
 і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України,
 Київ, Україна

На сьогодні відомо, що структурні та функціональні зміни в онкогенах та генах-супресорах зумовлюють нестабільність геному, що призводить до патологічної проліферації пухлинних клітин. Остання спричинена послідовністю подій, яка розглядається в контексті клітинного циклу. У злоякісних пухлинах різного генезу часто виявляють пошкодження одного з ключових регуляторів клітинного поділу — цикліну D1, що є компонентом сигнального шляху $p16^{INK4a}$ — циклін D1-Cdk4/6 — Rb-E2F1 і регулятором переходу з G₁ до S-фази клітинного циклу. Прогресія раку ендометрія (РЕ) пов'язана з молекулярними змінами, які потенціюють біологічні особливості, що зумовлюють різний перебіг цього захворювання.

Мета: оцінити експресію цикліну D1 і вільного E2F1 у клітинах РЕ залежно від ступеня диференціювання, плоідності та проліферативної активності пухлини.

Об'єкт і методи. Зразки операційного матеріалу 68 хворих на РЕ I–II стадії (середній вік $59,3 \pm 3,2$ року). Методи: морфологічний, цитофлуориметричний (індекс ДНК — іДНК, індекс проліферації — ІП), імуногістохімічний (ІГХ), статистичний. При оцінці результатів дослідження використовували статистичний метод визначення медіани (Me): при кількості позитивно забарвлених клітин, меншій за Me, експресію білка вважали низькою, а при значеннях, вищих за Me, — високою. Достовірними вважали розбіжності при $p < 0,05$.

Результати. ІГХ дослідження показало, що кількість клітин РЕ з експресією E2F1 і цикліну D1 у середньому становила $12,3 \pm 1,4$ і $14,6 \pm 2,2\%$ відповідно. У РЕ низького (G3) ступеня диференціювання визначався найбільший рівень експресії E2F1 ($18,1 \pm 1,5\%$) порівняно з помірно (G2) ($13,2 \pm 2,0\%$) та високодиференційованими (G1) пухлинами ($11,2 \pm 2,7\%$, $p = 0,046$). Аналіз експресії цикліну D1 показав, що найменша кількість клітин з експресією цього білка спостерігалася у G1-пухлинах ($8,3 \pm 4,2\%$), а у G2 і G3 експресія дослідженого маркера була майже однаковою ($14,3 \pm 2,8$ і $13,9 \pm 3,8\%$). У високопроліферативних пухлинах (ІП \geq Me = 18,9%) відмічалася вища експресія як цикліну D1, так і E2F1 ($13,4 \pm 2,5$ і $33,6 \pm 1,8\%$) порівняно з РЕ, що мали низький ІП ($9,3 \pm 0,1$ і $3,25 \pm 0,4\%$). Поряд з цим в анеуплоїдних РЕ виявлено більшу кількість клітин з експресією цикліну D1 і E2F1 ($23,4 \pm 8,3$ і $14,1 \pm 1,8\%$ відповідно) порівняно з цими показниками у диплоїдних пухлинах ендометрія ($11,8 \pm 1,6\%$, $p = 0,06$ і $5,2 \pm 1,7\%$, $p = 0,05$ відповідно).

Висновок. Висока експресія цикліну D1 і фактора транскрипції E2F1 у клітинах епітеліальних пухлин ендометрія асоціюється з такими показниками злоякісності пухлинного процесу, як анеуплоїдія, низький ступінь диференціювання та висока проліферативна активність.

MOLECULAR SCREENING OF THE SAMPLES OF THYROID NEOPLASMS

A. Babych¹, Yu. Tarashchenko², T.V. Rybalchenko¹

¹Educational and Scientific Centre «Institute of Biology and Medicine», Taras Shevchenko National University of Kyiv

²SI «V.P. Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism, NAMS of Ukraine», Kyiv, Ukraine

Thyroid nodules are present in most people of middle and old age. Whereas only 5% of thyroid nodules demonstrate malignancy, there are still limited opportunities in prediction of the prognosis for patients with easily detectable neoplasms. At the same time the frequency of thyroid tumours is rapidly growing in the world and in Ukraine. The issue is especially serious for Ukrainians because of the Chernobyl accident in 1986.

Nonetheless, the management of thyroid tumours is poorly developed. The diagnostics is usually performed by blood tests (TSH, thyroid hormones), ultrasonography and fine-needle aspiration cytology (FNAC). The last one permits quite accurate diagnosis of most common forms of thyroid cancer but is very restricted when the prognosis and management is required. Thyroid cancers are treated according to the general scheme that includes thyroidectomy and radioiodine therapy. However, there are much criticism of these approaches due to many drawbacks and low efficiency in some cases.

In recent years, the development of molecular screening of thyroid cancer samples offers new opportunities for thyroid carcinoma diagnosis and testing. Many molecular targets have also been suggested. However, there is a need to broaden these markers to allow more accurate prediction as well as to adopt them for planning of treatment strategies.

The aim: to perform molecular screening of the samples of thyroid cancer patients for markers: $BRAF^{V600E}$, $BRAF^{K601E}$, $RET/PTC1$, $RET/PTC3$, $PAX8/PPARG$ and $BRCA1/2$.

Materials and methods. 52 fine-needle aspiration (FNA) samples were obtained from patients of the State Institution «V.P. Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine» with thyroid tumours. Real time PCR was performed to analyse a set of molecular markers: $BRAF^{V600E}$ (p.V600E, c.1799T>G>A), $BRAF^{K601E}$ (p.K601E, c.1801A>G>G), $BRCA1$ (185delAG, 4153delA, 5382insC, 3819delGTCT, 300T>G (C61G), 2080delA) and $BRCA2$ (6174delT) point mutations, $RET/PTC1$, $RET/PTC3$ and $PAX8/PPARG$ fusion transcripts in samples of thyroid tumours. $BRAF^{V600E}$ marker was analysed as the $BRAF^{V600E}/BRAF$ (total) rate (in %). HBB gene and TBP and $YWHAZ$ transcripts were used as internal controls.

Results. For all 52 cases, $BRAF^{V600E}$ marker was analysed. The mutation was absent in 32 samples and its presence was lower than 1% in one sample that can be considered as negative result. One sample contained very low number of cells and the result is thought to be unreliable. The rest 20 samples were positive in $BRAF^{V600E}$ with $BRAF^{V600E}/BRAF$ rate < 10% in 8 cases, 10–50% in 8 cases and > 50% in 4 cases.

All 18 samples of thyroid tumours were negative for $BRAF^{K601E}$. $RET/PTC1$ and $RET/PTC3$ were analysed in 13 samples and was detected in 2 and 3 of them respectively. Interestingly, two cases of $RET/PTC1$ and $RET/PTC3$ coincided. $PAX8/PPARG$ marker was revealed in 3 of 8 samples. $BRCA1/2$ markers were analysed in 16 samples and heterozygous 6174delT in $BRCA2$ was observed only in one case.

Conclusion. The analysed markers were present in some patients with thyroid tumours with different rates. $BRAF^{V600E}$ was the most widely present that could prove his major role among others in diagnostics of thyroid malignancies. $BRCA2$ mutation

was present only in one case whereas *BRCA1* mutation was absent that corresponds with the fact that these markers were never used in thyroid cancer diagnostics. All analysed cases of thyroid tumors were negative for *BRAF*^{K601E}.

PERI- AND POSTOPERATIVE ISCHEMIA AT MAJOR LIVER RESECTION IN COLORECTAL CANCER PATIENTS

A.A. Burlaka, O.O. Kolesnik

National Cancer Institute, Kyiv, Ukraine

The effect of ischemia-reperfusion (I/R) in the liver most often occurs while performing large and extended liver resections, in particular with occlusion of blood flow by the Pringle maneuver (PM), total occlusion of the inflow and outflow.

The aim of our study was to investigate the effect of I/R and post-ischemic events in patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) who undergo the R0-resection, as well as to evaluate possible oncological effects.

Materials and methods. The study meaning is a retrospective analysis of the influence of the methodology of performing resection of the liver on the survival prognosis of mCRC patients. The patients were divided into 2 groups: group A (n = 61), patients with mCRC, liver resection conducted without PM; group B (n = 64), patients with mCRC, liver resection conducted using full or partial PM.

Results. Groups show a statistically significant difference in level of postoperative complications, in particular, relaparotomy (4/6.3%) and non-invasive surgery under the control of ultrasound/CT (9/14.1%) were performed with higher frequency in patients of group B where used MP and its modifications (p = 0.17). In group B severe stages of ALF were fixed in 30-day postoperative period (A — 3 (4.6%), B — 7 (10.9%), and C — 4 (6.3%)) than in group of comparison (A — 1 (1.6%), B — 3 (4.9%) and C — 1 (1.6%)) (p = 0.03). The median survival rate for patients was 25.61 ± 5.2; 24.07 ± 4.7; 14.03 ± 2.9 and 27.87 ± 9.4 months in group A (PLI+), B (PLI-), B (PLI+) and A (PLI-), respectively (p = 0.03).

Conclusion. Our results show the negative impact of applying Pringle classic maneuver on the survival of patients with mCRC. Ischemia of the operated liver may be a new factor in oncological prognosis and an indicator of the quality of surgical treatment.

ANONYMOUS METASTASES OF NEUROENDOCRINE TUMORS: DEFINITION OF NEOPLASM'S PRIMARY LOCATION ACCORDING TO MORPHOLOGICAL STUDY AND IMMUNOSTAINING

G.E. Chitaeva¹, L.M. Zakhartseva^{1,2}

¹Bogomolets National Medical University

²Kyiv City Oncological Center, Kyiv, Ukraine

Neuroendocrine tumors are extremely heterogeneous in their location, morphology and manifestations. Even small, well differentiated neuroendocrine tumors can quickly metastasize hematogenously. At least in 20% cases the primary diagnosis of neuroendocrine tumor begins with anonymous metastases verification of the lymph nodes, liver, soft tissues, bones, brain, etc. The study of anonymous metastases morphology and immunohistochemical organospecificity allows to determine primary location of the neoplasm, to predict clinical flow of the disease, and to optimize treatment.

The aim: to determine primary location of the neuroendocrine tumors of different organs according to anonymous metastases morphological study and immuno-staining.

Materials and methods: 28 samples of anonymous metastases, most likely of neuroendocrine tumors, obtained during biopsy or surgery (in 2014–2018), have been fixed with formalin and filled in paraffin blocks, then histological study and immunostaining was performed (markers Cromogranin A, Synaptophysin, CD56, CK7, CK20, CDX2, TTF-1; proliferation index Ki-67).

Results: during 2014–2018 90 neuroendocrine tumors of different organs were revealed, in 28 (31.1%) observations we found anonymous metastases: 39.3% — in the lymph nodes (n = 11), 28.6% — in the liver (n = 8), 17.9% — in soft tissues (n = 5), 10.7% — in retroperitoneum (n = 3), 3.5% — in bones (n = 1). Positive expression of cromogranin A, synaptophysin testified about primary pheochromocytoma (10.7%) or paraganglioma (10.7%); expression of cromogranin A, synaptophysin CD56, and CK7 — about primary neuroendocrine tumor in the pancreas (32.1%), of cromogranin A, synaptophysin CD56, CK7, TTF-1 — about primary neoplasm in the lungs (46.5%). 5 (17.9%) neuroendocrine tumors, which caused anonymous metastases, considered to be grade 2, 23 (82.1%) — grade 3.

Conclusion. According to our data, in 31.1% patients with neuroendocrine tumors of different organs anonymous metastases were found first; most often they were detected in lymph nodes (39.3%) and liver (28.6% of all cases). Anonymous metastases were caused by neuroendocrine tumors of the lung (46.5%), and pancreas (32.1%), by pheochromocytoma (10.7%), and paraganglioma (10.7%).

PERSONALIZED DENDRITIC CELL BASED IMMUNOTHERAPY IN PATIENTS WITH DIFFERENT TYPES OF NON-SMALL CELL LUNG CANCER

O. Gorbach, N. Khranovska, O. Skachkova, M. Inomistova, V. Sovenko, A. Ganul, V. Orel

National Cancer Institute, Kyiv, Ukraine

Immunotherapy using dendritic cells (DC) represents a novel and promising therapeutic method for patients with non-small cell lung cancer (NSCLC). A lot of clinical trials have been carried out or are in progress to assess the therapeutic potential of DC based vaccines in cancer patients.

The aim: to investigate the efficacy of DC based immunotherapy in patients with IIB–IIIA NSCLC — lung adenocarcinoma (LAC) and squamous cell carcinoma (SCC).

Materials and methods: two hundred fifty eligible patients with stage IIB–IIIA NSCLC (138 with LAC and 112 with SCC) were enrolled into the study. Patients were randomized into two groups: 1st — patients received DC immunotherapy as adjuvant treatment, 2nd — control group of patients who received surgery only. Generated autologous DCs loaded with mechanically heterogenized microparticles of tumor cells were injected intravenously in 1–3 courses (6 months interval). One course consisted of 5 injections with one-month interval and immunological monitoring was performed before each injection.

Results. DC based immunotherapy contributes to significant increase of 10-years overall survival (OS) and progression-free survival (PFS) in all NSCLC patients. The 10-years OS rate reached 30.3% vs 13.8% in DC immunotherapy and control groups, respectively (p = 0.009; HR = 0.60; 95% CI 0.43–0.85). At 10-years follow-up, PFS rate reached 22.6% in immunotherapy group compared to 10.5% in control group (p = 0.0032; HR = 0.58; 95% CI 0.42–0.80). In patients with LAC, 10-years OS rate was 43.5% vs 22.2% (p = 0.01; HR = 0.38; CI% 95 0.21–0.67) and PFS rate was 29.3% vs 17.3% (p = 0.015; HR = 0.43; 95% CI 0.25–0.74) in DC immunotherapy and control groups respectively. According to

Kaplan — Meier survival analysis, we didn't observe significant difference in 10-years OS ($p = 0.017$; HR = 0.64; 95% CI 0.36–1.14) and PFS ($p = 0.26$; HR = 0.7; 95% CI 0.34–1.23) in patients with SCC, who received DC vaccine. The most notable changes in cell-mediated immune response was observed after 4th injection of DC vaccine. Namely, the balance of Th1- and Th2-mediated immune response was changed, in particular the number of CD3⁺IFN- γ ⁺ lymphocytes prevailed upon CD3⁺IL-4⁺ lymphocytes.

Conclusion. DC based immunotherapy contributes to significant increase of 10-years OS and PFS in patients with LAC. Unfortunately, DC based immunotherapy don't provide survival benefit for patients with SCC. Notable changes in cell-mediated immune response were observed after 4th injection of DC vaccine with CD3⁺IFN- γ ⁺ lymphocytes increasing.

OPPORTUNITIES OF THE CELL CULTURES METHOD IN THE EVALUATION OF THE DRUG EFFECTIVENESS AND SENSITIVITY OF BRAIN GLIOMAS

O.O. Gromak, L.D. Liubich, T.A. Malysheva, L.P. Stayno

SI «A.P. Romodanov Institute of Neurosurgery, NAMS of Ukraine», Kyiv, Ukraine

Treatment of patients with malignant brain gliomas (BG) is an unsolved and urgent problem of neurooncology. At the present stage, efforts are focused on searching the treatment personalization and optimization. It is necessary to find a drug that can stimulate anti-tumor immunity and inhibit tumor proliferation. Attention is directed towards the neurogenic stem/progenitor cells (NSC/NPC) due to their similarities with brain tumors' stem cells and immunomodulatory properties.

The aim: to study the influence of NSC/NPC conditioned medium (NCCM) on the cell viability, mitotic and proliferative activity, apoptosis (PI⁺, CD95⁺, p53⁺), expression of tumor markers (CD133⁺, TGF- β 1⁺) by BG cell cultures.

Materials and methods. NCCM was obtained from rat brain NSC/NPC (E14). The human BG ($n = 37$) and rat BG (cell line C6, $n = 6$; cell line 101.8, $n = 6$) cells were cultured in standard conditions and with adding NCCM (in concentration 0.10 mg/ml on the total protein content) for 48 hours. The methods of cell cultivation, flow cytometry, immunocytochemistry were used.

Results. NCCM revealed the cytotoxic, antimitotic and antiproliferative effects on cultured BG cells. In human BG cultures sensitivity to NCCM was detected in 72.9% of samples; the cytotoxic index was 34–45%, mitotic index reduced by 1.6–4.0 times, the number of cells in the terminal stages of apoptosis (PI⁺) and CD95⁺ cells increased. A comparative study showed a similar effect of NCCM and immunomodulatory preparation galavit on human BG cells.

In rat BG cultures C6 and 101.8 the exposure to the NCCM decreased the total number of cells (by 1.7 times), mitotic index (4.4 times). Immunocytochemical study in C6 cultures after exposure to the NCCM revealed the decreased number of proliferating (Ki-67⁺) tumor cells (2.7 times), CD133⁺ (stem) tumor cells (4.0 times), TGF- β 1⁺ tumor cells (1.7 times), while the number of p53⁺ cells increased by 2.0 times.

Conclusion. Primary human BG cultures are an adequate instrument for determination the individual sensitivity of tumor cells to biopreparations so as individual assessment of their effectiveness. Standardized BG lines (C6) can serve as an experimental model for the initial testing of biological and antitumor properties of new preparations so as studying their mechanisms of action at the intracellular and molecular level.

KNOCKDOWN OF ADAPTOR PROTEIN RUK/CIN85 IN TUMOR CELLS RESULTS IN INHIBITION OF THEIR INVASIVENESS AND METASTATIC POTENTIAL MEDIATED BY ANGIOSTATIN PRODUCTION

I. Horak, T. Skaterna, O. Khudiakova, D. Gerashchenko, D. Shytikov, D. Petukhov, A. Tykhomyrov, L. Kapustianenko, T. Grynenko, L. Drobot

Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

Adaptor proteins serve for organization, regulation and facilitation of cell signaling. Adaptor protein Ruk/CIN85 is involved in the control of cell motility, proliferation, RTKs endocytosis and sorting, apoptosis, and survival. It was demonstrated that increased Ruk/CIN85 expression is associated with progression of breast, cervix, colon, head and neck cancers, melanomas and gliomas.

The aim of this study was to investigate the role of Ruk/CIN85 in invasiveness and metastasis of cancer cells.

Materials and methods. As a model we used mouse breast adenocarcinoma 4T1 cells and Lewis lung carcinoma (LLC) cells with stable shRNA-mediated knockdown of Ruk/CIN85. Matrigel invasiveness *in vitro* was estimated using Boyden chamber assay. For metastasis analysis *in vivo* experimental metastasis model was used. Matrix metalloproteinases (MMPs) activity was analysed by gelatin zymography. Angiostatin production was evaluated by Western-blotting using anti-K5 polyclonal antibodies.

Results. It was demonstrated that Ruk/CIN85 knockdown resulted in decreased Matrigel invasion by 5 times for 4T1 cells and 3 times for LLC cells. Also pulmonary metastases number was significantly decreased in both Ruk/CIN85-downregulated 4T1 and LLC cells. Gelatinolytic analysis revealed that MMP-2 and -9 activities in Ruk/CIN85-downregulated cancer cells increased in more than 3 times compared to corresponding control cells, while treatment with MMPs inhibitor GM6001 restored invasiveness of these cells. At the same time, we found elevated production of angiostatin (peptides originated from plasminogen cleavage by several proteases, including MMPs) in 4T1 and LLC cells with Ruk/CIN85 knockdown.

Conclusion. The obtained data indicate possible role of adaptor protein Ruk/CIN85 in the control of cancer cells invasion and metastasis.

IN VITRO SENSITIVITY OF CLL B CELLS TO CHEMOTHERAPY AGENTS IS DEPEND ON CD150 AND CD180 CELL SURFACE EXPRESSION LEVEL

V. Kholodniuk, I. Gordiienko, V. Huryn, T. Ivanivska, L. Shlapatska

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

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is characterized by variable clinical outcome. Patients with indolent form of CLL live during many years without any symptoms. For these patients the «watch and wait» strategy is used. Aggressive CLL require immediately treatment. Basic scheme of first-line therapy for patients with aggressive CLL include combination of fludarabine, cyclophosphamide and rituximab (FCR) or bendamustine with rituximab (BR). In recent years, medicine became more personalized and the schemes of treatment are selected individually for each patient. Studying of CLL molecular and functional heterogeneity could help to find new prognostic and

predictive markers of disease outcome. In this aspect, attractive candidates are differentially expressed signaling molecules on CLL B cells including cell surface receptors.

The aim of our study was to explore whether sensitivity of CLL B cells to chemotherapy agents depends on CD150 and CD180 cell surface expression level.

Materials and methods. The study was performed on peripheral blood mononuclear cells isolated from 33 previously untreated patients with CLLs. Flow cytometry was used for immunophenotyping CLL B cells. Metabolic activity of the CLL B cells was determined after 48 h of incubation with chemotherapy agents *in vitro* by Alamar Blue test.

Results. Based on flow cytometry results in 51.5% of tested CLL cases B cells expressed CD150 on cell surface (csCD150⁺) and 20% were positive for CD180 (csCD180⁺). We showed that csCD150⁺ than csCD150⁻ CLL B cells were more sensitive to bendamustine and fludarabine *in vitro*. From the other hand, effectiveness of bendamustine was higher in csCD180⁻ compare to csCD180⁺ CLL B cells. Response of CLL B cells to cyclophosphamide alone or in combination with fludarabine did not depend on CD150 and CD180 cell surface expression. csCD150⁺CD180⁺ CLL B cells were more responsive to fludarabine and cyclophosphamide (up to 7 and 5%, respectively) than csCD150⁻CD180⁻. While, sensitivity of csCD150⁻CD180⁻ CLL B cells to bendamustine was higher up to 15% compare to csCD150⁺CD180⁺.

Conclusion. Response of CLL B cells to different chemotherapy agents *in vitro* is variable that depend on CD150 and CD180 cell surface expression level.

EXPERIMENTAL DOXORUBICIN-INDUCED DILATED CARDIOMYOPATHY: THE EFFECT OF NANODISPERSED CERIUM DIOXIDE

N. Khudenko¹, V. Sarnatskaya¹, I. Nychyporenko¹, L. Paziuk², I. Timashkov³, L. Yushko¹, V. Nikolaev¹

¹*R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology, NAS of Ukraine*

²*Educational and Scientific Centre «Institute of Biology and Medicine», Taras Shevchenko National University of Kyiv*

³*V.I. Vernadskii Institute of General and Inorganic Chemistry, NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine*

Anthracyclines are widely used in the treatment of malignant neoplasms. Doxorubicin, the mostly used drug of this group, has a pronounced cardiotoxic effect. Acute and chronic doxorubicin cardiotoxicity leads to the development of dilated cardiomyopathy (DCMP), mortality of which reaches 60%. It's considered that such negative effect of doxorubicin is associated with increasing manifestations of oxidative stress. Recently, the possibilities for clinical usage of nanodisperse cerium dioxide (CeO₂) as a trap of highly reactive oxygen species (ROS) and nitrogen (NOS) derivatives were investigated.

The aim: to study the effectiveness of nanodispersed CeO₂ in the treatment of experimental animals suffering from DCMP caused by doxorubicin.

Materials and methods. Twenty one female white mongrel rats were randomized into the following groups: (1) weekly intra-peritoneal (IP) injection of saline (n = 7, control animals); (2) thrice-weekly IP injections of doxorubicin at a dose 2.5 mg/kg (n = 7); (3) twice-weekly IP injections of nanodisperse CeO₂ (0.2 mg/kg) (n = 7). Treatments continued for 2 weeks.

Results. The administration of nano-dispersed CeO₂ resulted in thickening of cardiomyocytes, reduction of grains and vacuolization of sarcoplasm, increasing of nuclei, and re-

duction of manifestations of dystrophic and necrotic changes in the myocardium. In spleen, the most lymphoid follicles become rounded, and their size increased. In liver, the usage of nano-dispersed CeO₂ resulted in moderate positive effect on hepatocytes, without any pronounced positive changes in parenchyma at all, and in kidney — any visible positive changes of their structure were observed. The introduction of cerium dioxide nanoparticles led to an increase in GSH and catalase activity, and decrease in the level of oxidative modifications of proteins and lipids.

Conclusion. The morphological examination of heart, spleen and liver as well as biochemical parameters of peripheral blood are evidenced in a positive correcting effect of nanodispersed CeO₂ on histological structure of organs and decrease the level of oxidative stress indexes.

NONCODING RNA AS AN IMPORTANT COMPONENT OF CANCER CELLS INTEGRAL REPROGRAMMING

K.M. Lebid-Biletska, D.O. Minchenko, D.O. Tsybal, O.H. Minchenko

Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

Non-coding RNAs are important factors of post-transcriptional and epigenetic regulation using RNA interference, changes in DNA methylation, histone modification, etc. The ability of non-coding RNAs to reprogram gene expression patterns can be used as a tool to control tumor cell proliferation processes.

The aim of our study was to identify the binding sites of non-coding RNAs in the areas of genes encoding selected transcription factors and tumor suppressors involved in IRE1-mediated regulation of glioma tumor cell proliferation, in order to find out the molecular mechanisms of regulation of tumor growth associated with IRE1/ERN1-mediated signaling pathway of endoplasmic reticulum stress.

Materials and methods. The expression level of genes encoding transcription factors and tumor suppressors, in glioma cells was studied by quantitative polymerase chain reaction. We used bioinformational methods to identify the binding sites of non-coding RNAs in for selected mRNAs.

Results. Inhibition of IRE1 activity affects the expression of transcription factors *HOXC6, ATF3, TBX2, EPAS1, E2F8, FOXF1, TBX3, MYBL1, MYBL2, TCF3, TCF8, and SNAI2* that are known regulators of tumor cells proliferation. We have also shown that mRNAs for most studied genes have specific binding sites to selected microRNA and that microRNAs possibly participate in their expression at post-transcriptional level. It has been established that an increase in the expression of transcription factor MYBL1 and MYBL2 in glioma cells with inhibited IRE1 signaling is accompanied by a significant decrease of miR-19 and miR-143, correspondingly indicating a possible role of the studied microRNA in the regulation these gene expressions. Furthermore, down-regulation of transcription factor EPAS1 (HIF-2a) in glioma cells after inhibition of the activity of IRE1 signaling enzyme is associated with up-regulation of microRNA miR-182. It is possible that this microRNA participates in the regulation of EPAS mRNA expression on post-transcriptional level.

Conclusion. Results of our investigation demonstrate that inhibiting of IRE1 signaling affects the expression of the transcriptional factors studied. MiRNAs whose binding sites are found for all studied transcription factors can be involved in the regulation of this process.

RATIOS OF CELLS RELATING TO INNATE AND ACQUIRED IMMUNE SYSTEM IN SECONDARY (METASTATIC) AND PRIMARY GLIAL CEREBRAL TUMORS

N.I. Lisiany, I.A. Gnedkova, A.A. Shmeleva, V.V. Vaslovich, V.O. Fedirko, T.A. Malysheva, M.A. Gnedkova
SI «A.P. Romodanov Institute of Neurosurgery, NAMS of Ukraine», Kyiv, Ukraine

The aim of investigations was to study the content of leukocytes (L), neutrophils (Nph), and lymphocytes (Lym) in the peripheral blood (PB) as indicators of the innate and acquired immune response and systemic inflammation in patients with primary glial and secondary metastatic cerebral tumors in preoperative and postoperative periods.

Materials and methods. PB indicators were studied in 71% of patients having primary glial and secondary metastatic (n = 20) cerebral tumors. PB values were evaluated on automatic hematologic analyzer MINDRAY BC = 3000 plus. Absolute platelet (Plt), Nph and Lym counts were determined as well as the ratios of PLT/Lym, PLT/Nph, and percentage ratio of Nph/Lym were established.

Results. In preoperative period, patients with glioblastomas and metastatic tumors have the increased absolute count of L and Nph, Nph/Lym ratio, decreased Plt/Nph ratio proportional to the increase in the extent of cerebral tumor anaplasia. In postoperative period, in patients with cerebral tumors the intensity of inflammatory reactions — leukocytosis, neutrophilia — grows by 2–2.5 times as compared to preoperative period, with the decrease of L percentage.

Conclusions. Patients with malignant cerebral tumors — primary (glioblastomas) and secondary (metastases) — reveal in preoperative period similar changes in PB — the increased activity of inflammatory reactions reflected in the growth of absolute value of L and Nph, Nph/Lym value, decrease in Plt/Nph ratio proportional to the increase in the extent of cerebral tumor anaplasia and decrease in Lym count. This indirectly reflects the activation of innate immune system reactions and inhibition of the adaptive immune response reactions.

BIPOLAR ANDROGEN THERAPY IN PATIENT WITH CASTRATION-RESISTANT PROSTATE CANCER (CASE REPORT)

O.V. Lukyanchuk, D.A. Popov, O.N. Slynko, S.Yu. Pliyushchenko, A.O. Savelev

Odessa Regional Oncology Center, Odessa, Ukraine

The main method of palliative care in patients with metastatic prostate cancer is surgical or medical castration. According to literature data, in most patients on MAB castration-resistant state and progression of the disease occurs within the range from 1 to 3 years. As prostate cancer cells transition from a hormone-sensitive to castration-resistant state, one of the most frequently observed events is adaptive upregulation of androgen receptors expression. Consequent use of chemotherapy (docetaxel, cabazitaxel) and second-line hormone treatment (abiraterone acetate and enzalutamide) in patients with castration-resistant prostate cancer had been shown the median of survival from 6 to 12 month, according to literature data. Studies exploring that administration of supraphysiologic testosterone doses (400 mg 1 per 28 days) with surgical or medical castration have a positive effect on survival in a group of patients progressed on second line hormonal treatment.

Case report. Patient O., 67 years, has been remaining under care of Odessa Regional Oncology Center since January

2014 with diagnosis of metastatic prostate cancer. Prostate-specific antigen (PSA) native — 650 ng/ml. Pathology report: G3 prostate AC, Glison 9 (4 + 5), with perivascular and perineural growth. The patient underwent surgery of bilateral orchiectomy in 2014 with consequent administration of androgen-deprivation therapy (bicalutamide 50 mg per 2 years). In 2016 patient underwent 10 cycles of chemotherapy (docetaxel) due to progression of castration-resistant prostate cancer. In 2017 patient underwent 2 cycles of chemotherapy (vinorelbine). Due to progression of castration-resistant prostate cancer on chemotherapy, the patient was administrated abiraterone acetate per 3 months, with subsequent growths of PSA level to 7897 ng/ml. The poor effect of already administered therapy was the main indication to administer bipolar androgen therapy (testosterone propionate 400 mg i.m. 1 time per 28 days in combination with etoposide 100 mg *per os* 1 time per day from 1 to 14 day). In 1 month of bipolar androgen therapy the PSA level dropped to 58.27 ng/ml. In 3 month of bipolar androgen therapy the PSA level was 62.17 ng/ml. The effect of therapy was maintained for 6 months, until PSA level reached ½ PSA baseline. After that, the patient was transferred to second-line hormone treatment.

Conclusions. Bipolar androgen therapy (testosterone propionate 400 mg i.m. 1 time per 28 days in combination with etoposide 100 mg *per os* 1 time per day from 1 to 14 day) may be effective in the group of patients, who had progressed on second-line hormone treatment. The mode of action of supraphysiologic testosterone doses needs further study, in order to improve the selection of patient groups for effective treatment.

DIFFERENTIAL EXPRESSION OF AURORA KINASES' GENES IN PROSTATE CANCER AND PROSTATE ADENOMA SAMPLES POINTS ON POSSIBILITY OF THEIR DISTINCT ROLES IN PROSTATE CANCER DEVELOPMENT

O. Mankovska¹, G. Gerashchenko¹, E. Rozenberg¹, E. Stakhovsky², O. Kononenko², Yu. Bondarenko³, V. Kashuba⁴

¹*Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine*

²*National Cancer Institute*

³*SI «Institute of Urology, NAMS of Ukraine», Kyiv, Ukraine*

⁴*Department of Microbiology, Tumor and Cell Biology (MTC), Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden*

Prostate cancer is today big problem all around the world, due to difficulties in its early diagnosis and heterogeneity of this disease. Aurora kinases are crucial for adequate cell division, and was shown to be involved in carcinogenesis, although the role of them in cancer is not fully understood.

Materials and methods. We collected adenocarcinomas with paired conventionally normal prostate tissues (T/N pairs) (n = 33) and prostate adenoma samples (n = 17). We isolated RNA from clinical material with Trizol, synthesized cDNA from 1 mkg of total RNA and analyzed it by qPCR. We estimated relative expression (RE) of genes using 2^{-ΔCT} and 2^{-ΔΔCT} and processed this data statistically.

Results. No significant differences in RE of *AURKA*, *AURKB* and *AURKC* was found between adenocarcinoma and corresponding normal tissues. However, *AURKA* expressed at significantly higher levels in adenomas, compared with stage III–IV adenocarcinomas. *AURKC* expression was significantly higher in adenocarcinomas and the paired conventionally normal prostate tissues (the stage III–IV), than in normal prostate tissue of patients with cancer of the stage I–II. Cor-

relation analysis demonstrated the presence of negative correlation between stage and *AURKB* expression ($rs = -0.344$, $p < 0.05$). In the same time, expression of *AURKB* correlated with expression of *AURKA* gene ($rs = 0.365$, $p < 0.05$). Expression of *AURKC*, however, correlated with stage positively ($rs = 0.372$, $p < 0.05$).

Conclusion. We demonstrated that *AURKA* and *AURKC* are differentially expressed in PCa, compared with normal tissue or adenoma, especially at advance stages of the disease. As cell cycle kinases their role in development of malignant cell phenotype can be crucial, especially for *AURKC*, which RE positively correlates with tumor stage. For explanation of these results further research is needed.

THE ROLE OF HIPEC IN THE COMPLEX TREATMENT OF PATIENTS WITH PERITONEALLY-DISSEMINATED CANCER OF THE STOMACH

A.O. Mashukov^{1,2}, *V.E. Maksimovsky*¹, *R.R. Yarema*³,
*O.I. Tkachenko*¹

¹Odessa National Medical University

²Odessa Regional Oncological Center, Odessa, Ukraine

³Lviv Oncological Regional Center for Treatment and Diagnostic, Lviv, Ukraine

The combination of gastrectomy (GE), peritoneoectomy (PE) and hyperthermic chemoperfusion (HIPEC) with gastric cancer (GC) is part of a specific medical ideology that has been implemented by a group of enthusiasts united under PSOGI (Peritoneal Surface Oncology Group International — the global medical community for the study of peritoneal carcinomatosis).

The aim. Considering the controversialities of world experience in the use of HIPEC (the results vary from extremely positive to rather negative), it was necessary to study the survival of patients with carcinomatosis using standard chemotherapy and HIPEC.

Materials and methods. The study included 47 patients who were operated at the Clinic of Reconstructive and Plastic Medicine of the Odessa National Medical University in the period 2015–2017. Only radical or conventionally radically operated patients were included in the study (14 men and 33 women, average age — 54.9 years). In order to compare the survival of patients after PE/HIPEC, a retrospective comparison group was selected, which included 22 patients with abdominal cancers, for whom only intravenous systemic chemotherapy (SCh) was used.

Results. Own observation based on the analysis of case histories of 47 patients who underwent HIPEC in stomach cancer, ovarian cancer, colorectal cancer, and some other types of malignant abdominal pathology. The survival rate of patients after HIPEC and patients with carcinomatosis of the abdominal cavity, who received only SCh, was compared. Survival after HIPEC was slightly worse than after SCh. The possibility of individualization of the scheme of the HIPEC in terms of the appointment of a certain chemotherapeutic drug represents the interest. Before the procedure, a laparoscopy is carried out with a sufficient amount of material taken from the tumor tissue, followed by its immunohistochemical study on the main marker of sensitivity: TOP2A, ERCC1, TS.

Conclusion. It was concluded that more careful patient selection is needed based on the value of the peritoneal carcinomatosis index and the level of planned cytoreduction.

RETENTION OF STAT5 PROTEIN IN CYTOPLASM IN B-CELLS OF PATIENTS WITH CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA

*A.S. Matvieieva*¹, *L.M. Kovalevska*¹, *T.S. Ivanivska*¹,
E.V. Kashuba^{1,2}

¹R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology, NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

²MTC, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden

We have shown previously that the IL-2-STAT5 (JAK-STAT5) cellular signaling pathway is inhibited in B-cells of patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL).

The aim: to find out the cause of inhibition of the IL2-STAT5 signaling pathway in B-CLL cells.

Materials and methods. CLL cells were isolated from peripheral blood, using gradient centrifugation on a ficoll-verografin mixture. Expression of *STAT1–6* genes at the mRNA level was analyzed using the Oncomine database. Expression, phosphorylation status and cellular localization of the STAT5 protein were studied by fluorescence microscopy using specific antibodies.

Results. Unlike B-cells of healthy donors, expression of the STAT5A protein was low in patient CLL cells. As we have previously shown, the IL-2-STAT5 (JAK-STAT5) signaling pathway is inhibited in CLL cells. Now we demonstrated a low level of phosphorylation of the STAT5 protein, or a complete lack of phosphorylation in CLL cells. The STAT5A protein shows cytoplasmic localization, indicating the absence of complexes in the nucleus that activate/repress transcription of the STAT5-dependent genes.

Conclusion. Inhibition of the IL-2-STAT5 pathway in CLL cells is due to lack of STAT5 proteins phosphorylation and/or absence of the active STAT5A transcription complexes in the nucleus of CLL cells.

USE OF TRANSECTED CELLS IN CLINICAL PRACTICE? UNEXPECTED RESULTS AND POSSIBLE CONSEQUENCES

L. Ostrovska

StemCiTerra, LLC; Reisterstown, Maryland, USA

Stem cells tracking in tumors can provide useful information for solid tumor diagnostics and for choice of therapeutic approaches. It can also help understanding tumor etiology, physiology and pathology, as well as role of mesenchymal stem cells (MSC) in tumor development.

The aim: we performed study with the purpose to obtain MSC expressing the extracellular target receptor that can be used for non-invasive magnetic resonance imaging of MSC incorporation to the functional tumor neovasculature.

Materials and methods. We utilized engineered MSC (bone marrow derived murine MSC line C57Bl6) that expressed a unique cell surface CD4-receptor (truncated human CD4) with a specific vascular contrast agent targeted to this receptor. We have constructed a recombinant plasmid, containing GFP and CD4 fragments, and determined its expression in transfected recipient MSC. Transfected cells were labeled with superparamagnetic MACS CD4-MicroBeads and isolated on MACSelect magnetic column.

Results. Plasmid transfection resulted in stable and efficient GFP fluorescence; however, expression levels of CD4 were neither efficient nor stable. Most importantly, transfected MSC in long-term culture spontaneously formed foci of transformation (comprised of cells that lost contact

inhibition) with higher frequency than non-transfected cells. Subpopulations of genetically modified stem cells (transfected with the reporter gene) also changed their ability to differentiate accordingly to differentiation factors.

Conclusion. Stem cell transfection and genome manipulations using lentiviral or retroviral vectors can provide a useful tool for stem cell tracking in pre-clinical studies; however, transduced cells raise safety concerns and may have very limited clinical applications due to unpredictable consequences of the transfection and introduction of the new genetic material to the cell. Those consequences may include unforeseen changes in cell functionality and neoplastic transformation of cells.

To overcome these consequences, we've proposed a different method for stem cell imaging. This method is suitable for both diagnostic and therapeutic purposes in oncology (pending patent application).

MORPHOLOGY AND IMMUNOPHENOTYPE OF LYMPHOID CELLS WITH HAIR-LIKE PROJECTIONS OF CYTOPLASM IN B-CELL LYMPHOPROLIFERATIVE DISEASES

A.S. Polishchuk, L.M. Sklyarenko, T.S. Ivanivska

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

B-cell tumors representing mature lymphocytes with villous cytoplasm accounts for 1–3% of total lymphoproliferative diseases (LPD). Some features of such tumors distinguish them from other B-cell lymphomas that should be taken into account for providing the rational therapy.

The aim: to examine the morphology and immunophenotype of substrate lymphoid hairy cells in B-cell LPD.

Materials and methods. Smears of the samples from peripheral blood and bone marrow, lymphoid cells isolated from blood and bone marrow in Ficoll-verografin gradient. Methods: cytomorphological, cytochemical (assay for tartrate sensitive/resistant acid phosphatase); immunocytochemical (alkaline phosphatase avidin-biotin — LSAB-AP) method for determining antigen expression on membranes and in cytoplasm of pathological cells employing the broad panel of monoclonal antibodies, flow cytometry.

Results. Hairy cell leukemia (HCL) was diagnosed in 137 patients aged 26–70. Leukocyte count ranged from deep leucopenia ($0.7-1.5 \cdot 10^9/l$) to $20-30 \cdot 10^9/l$ with the content of the substrate cells being 5–10% and more. Hypoplasia of bone marrow with occasional substrate cells of lymphoid cell predominance was evident. The hairy cells amounted to $\frac{1}{3}-\frac{2}{3}$ of all lymphoid cells. HCL substrate cells were of moderate or slightly larger size with grey villous cytoplasm. The nuclei were rounded or oval located eccentrically in a fraction of cells with loose chromatin structure. The pattern of acid phosphatase reaction was polymorphic. In most lymphoid cells, small granulated to moderate diffuse granulated reaction was evident. The strong reaction was observed in 10–15% of cells. In half of positive cells, reaction was inhibited by tartrate ions. In the rest of cells, both weak to moderated reaction as well as strong reaction was detected. In 90% of cells, immunophenotype was such as follows: $CD19^+CD20^+CD22^+$ (bright) $CD11c^+$ (bright) $CD25^+CD103^+CD5^-$. Cyclin D1 was weakly expressed in a third of cases. In 266 patients, splenic marginal zone lymphoma (SMZL) was diagnosed. In a fraction of peripheral blood lymphocytes and lymphocytes of bone marrow, small cytoplasmic projections could be discern-

ible. In lymphoma cells the pattern of acid phosphatase reaction was from weak to moderate small granulated. Also several cells with brighter staining were detected. In 60% of cases, reaction was inhibited by tartrate ions. Nevertheless, in some cells reaction was tartrate-resistant. B-cell markers were detected on cell surface ($CD19^+CD20^+CD22^+$). In half of cases, CD11c expression was revealed. In 10% of cases, weak expression of CD25 or CD5 was observable. Sometimes, $CD25-CD103^+$ (weak) expression pattern was revealed. Cyclin D1 was not detected. Among patients with suspected HCL, we suggest HCL-variant (HCL-v) in five cases based on the laboratory findings of peripheral blood and bone marrow. In three cases, we supposed the rare disease — splenic red pulp lymphoma (SRPL).

Conclusions.

1. Morphological and cytochemical features of cells from peripheral blood and bone marrow in HCL, HCL-v, SMZL, and SRPL were characterized.

2. Immunophenotype of these cells was determined.

3. Cytomorphological and immunophenotypical findings allow one to delineate the separate nosological forms among LPD wherein the substrate cells are represented by hairy cells relying only on studying the samples of peripheral blood and bone marrow (and not the samples from resected spleen).

DUAL TARGETING OF CANCER ENERGY METABOLISM WITH SODIUM DICHOROACETATE AND 2-DEOXY-D-GLUCOSE IS BENEFICIAL IN TUMOR TREATMENT

I.V. Prokhorova, D.L. Kolesnik

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

Cancer cells use different energy sources and metabolic pathways for their energetic and anabolic requirements. Such peculiarities of their metabolism promotes cell proliferation and migration, leading to cancer progression. Dual targeting of the glycolysis and OXFOS in cancer cells represent a viable and promising strategy of cancer therapy.

The aim: to study the antitumor activity of sodium dichloroacetate (DCA) in combination with 2-deoxy-D-glucose (2DG) against highly angiogenic variant of Lewis lung carcinoma (LLC/R9) and glioma C6.

Materials and methods. DCA and 2DG were administered *per os* (i) to C57Bl/6 mice 5 times per week for 3 weeks at a total dose of 1.5 g/kg and 1.0 g/kg and (ii) to Wistar rats every day during 12 days at a total dose of 1.0 g/kg and 0.5 g/kg, respectively, as single agents or as combined treatment starting from the following day after cancer cell inoculation. Parameters of LLC/R9 growth and metastasis as well as lifespan of C6 bearing rats were estimated. The tumor level of lactate and pyruvate was determined by enzymatic methods. Electron paramagnetic resonance was used for analyzing the functional state of the components of mitochondrial respiratory chain. Engulfing activity and reactive oxygen species (ROS) production of tumor-associated $CD14^+$ cells was analyzed by flow cytometer.

Results. It has been shown that antigliomic effect of DCA and 2DG, after their administration as a single agents, is significantly enhanced in the case of their combined use, causing an increase in life expectancy by 44.0% ($p < 0.05$). Despite the absence of the antitumor effect of DCA against LLC/R9, the inclusion of the inhibitor of glycolysis 2DH in the scheme of DHA therapy leads to inhibition of tumor

growth by 71.0% ($p < 0.05$). The antitumor effect of combined therapy in this case correlates with an increase of ROS production by tumor-associated CD14⁺ cells by 120.0% ($p < 0.01$) and a decrease in the level of lactate in tumor tissue by 37.0% ($p < 0.05$). It has been revealed that DCA, both in monotherapy and in combination with 2DG, exhibits high antimetastatic activity against LLC/R9, statistically reliably reducing both the number and volume of metastases by 58.0 and 73.0%, respectively.

Conclusion. Dual targeting of cancer energy metabolism with DCA in combinations with 2DG showed high antitumor efficacy against experimental tumors and can be used as a potential strategy for cancer treatment.

MITOCHONDRION AS AN IMPORTANT COMPONENT OF INTEGRAL REPROGRAMMING CANCER CELLS METABOLISM AND SURVIVING

O.O. Riabovol, O.H. Minchenko

Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

The common hallmark of cancer cells is total reprogramming of their metabolism to ensure growth and surviving even under extreme micro-environmental conditions. Different extracellular stimuli such as hypoxia lead to induction of endoplasmic reticulum stress which is the crucial component of tumor growth. Blockade of IRE1, the key signal transducer of the unfolded protein response results in significant suppression of glioma growth through changes in the expression level of thousands of genes related to the angiogenesis, apoptosis, proliferation and mitochondrial functions. Mitochondria play a pivotal role in the regulation of many bioenergetic and biosynthetic processes as well as apoptosis, which are remodeling in tumors. Approximately 1500 nuclear-encoded mitochondrial proteins control the functional activity of mitochondria and most of these enzymes and factors are multifunctional and take part in the metabolic reprogramming of these organelles in tumors.

The aim of our study was to investigate IRE1-dependent mechanisms of expression regulation of a subset of nuclear-encoding mitochondrial proteins for evaluation the significance of functional reprogramming of mitochondria in IRE1-mediated inhibition of tumor growth.

Materials and methods. We used U87 glioma cells and their subline with blockade of IRE1 function by cDNA-construct. The expression level of studied genes was determined in glioma cells by real-time quantitative polymerase chain reaction.

Results. It was shown that the expression level of most nuclear genes encoded key enzymes of Krebs cycle and factors responsible for functional activity of mitochondrial genome is significantly down-regulated in glioma cells without IRE1 enzyme function, except *IDH2*, *NNT*, *ENDOG* and *FAM162A* genes, which expression level is strongly up-regulated. At the same time, inhibition of IRE1 leads to suppression of expression level of *AIFM1*, *ATG7* and *TRADD* genes, which are involved in apoptosis and autophagy signaling pathways.

Conclusion. The expression of all studied genes is responsible to IRE1 signaling enzyme function in gene specific manner, because inhibition of IRE1 significantly affects their expression. Therefore, the changes in expression level of nuclear-encoding mitochondrial proteins demonstrate the phenomenon of metabolic reprogramming of mitochondria through IRE1-mediated endoplasmic reticulum stress signaling and correlate with suppression of glioma cell proliferation upon inhibition of the IRE1 enzyme function.

OVARIAN CANCER AND MUTATIONAL STATUS OF BRCA1 AND BRCA2 GENES

L. Rybchenko, L. Poluben, H. Bychkova, H. Stefanovych, B. Klimuk, S. Klymenko

SI «National Research Center for Radiation, NAMS of Ukraine», Kyiv, Ukraine

One of the causes of ovarian cancer (OC) is mutations in the hereditary predisposition genes. Thus, 10.0–15.0% of all ovarian tumors are hereditary. The greatest achievement of the hereditary OC types studies was discovery of the *BRCA1* and *BRCA2* genes. The risk of OC manifestation for *BRCA1* and *BRCA2* mutation carriers is 39.0 and 11.0%, respectively. In Ukraine, same as in other Eastern European countries, the most frequent *BRCA1* and *BRCA2* gene mutations are 185delAG, 5382insC, 4153delA, 300T>G and 6174delT. The possibility to differentiate hereditary and sporadic OC types on a molecular level is the prerequisite for the determination of the rational approaches for its treatment and therapy individualization.

The aim: to study the frequency of *BRCA1* gene mutations 185delAG, 5382insC, 4153delA, 300T>G, and *BRCA2* gene mutations 6174delT in patients with OC.

Materials and methods. Peripheral blood samples from 249 female patients with OC, which were sent from 22 medical centers of Ukraine were included in the study. Genomic DNA was obtained using NeoPrep100 DNA Magnet Kit (Neogene, Ukraine) in accordance with manufacturer's instructions. The mutations were detected using allele-specific multiplex PCR on Gene-Amp PCR 2400 thermocycler (Applied Biosystems, USA) and reagents GoTag Green PCR Master Mix (Promega, USA). PCR products were separated for visualization according to molecular weight by agarose gel (1.5%) electrophoresis using bromide ethidium for coloring.

Results and conclusions. The frequency of mutations in OC patients was 12.8% (32 from 249 females). Pathogenic *BRCA1* 5382insC was dominant — 62.5% (20 DNA samples) among studied mutational spectrum. The mutation 300T>G was identified in 18.7% of cases (6 DNA samples), 4153delA — in 12.5% of cases (4 DNA samples), 185delAG — in 6.3% of cases (2 DNA samples). However, *BRCA2* 6174delT mutation was not detected in any of the biological samples.

FREQUENCY OF KRAS MUTATION IN PATIENTS WITH COLORECTAL CANCER IN UKRAINE

B.M. Shkurupii^{1,2}, S.V. Klymenko¹, L.M. Zakhartseva², B.T. Klimuk¹, L.A. Rybchenko^{1,2}, L.O. Poluben¹

¹Bohomolets National Medical University

²SI «National Research Center for Radiation Medicine, NAMS of Ukraine», Kyiv, Ukraine

Determination of KRAS mutation status is an important predictor of response to target therapy with monoclonal antibodies against the epidermal growth factor. In most cases, the presence of the KRAS mutation is associated with the resistance to these drugs. According to the literature, the frequency of KRAS mutations in the world among patients with colon cancer is from 35.0 to 45.0%.

The aim: to evaluate the frequency of KRAS mutations in patients with colorectal cancer in Ukraine, to determine the range of KRAS mutations.

Materials and methods. 352 paraffin-embedded colorectal tumor samples taken during surgical intervention. A tissues suspension of cells containing at least 70% of tumors received from deparaffinized tumor sample. DNA was isolated with QIAamp DNA minikit and Nucleospin Tissue DNA Mini-Kit kits. The mutation status of KRAS was studied by ampli-

fying the mutant DNA sequence in the presence of a normal allele suppressor with the simultaneous labeling of the PCR product with biotin followed by selective hybridization of the specific biotinylated product on the KRAS strain test oligonucleotide tests StripAssay.

Results. Among the 352 tumor samples, the KRAS mutation status was positive in 163 cases (46.3%). Due to DNA damage during histological preparations, 15 (4.3%) testing attempts were unsuccessful. The replacement of glycine with aspartate in the 12th codon (Gly12Asp) has been detected more often among identified mutations (35.6%, 58 of 163 patients with mutation). In other cases, the mutation was found at the following frequency: p.Gly12Val — 22.1% (36 out of 163 patients with mutation), p.Gly13Asp — 16.6% (27 out of 163 patients), p.Gly12Ser — 8.0% (13 out of 163 patients), p.Gly12Ala — 6.7% (11 out of 163 patients), p.Gly12Cys — 5.5% (9 out of 163 patients), p.Gly12Arg — 4.3% (7 out of 163 patients), p.Gly13Ser — 0.6% (1 out of 163 patients), p.Lys117Asn — 0.6% (1 out of 163 patients). There were never found two or more mutations at the same time.

Conclusion. According to the results of our KRAS studies, the mutation in colorectal cancer patients among Ukrainian residents is quite common and makes up 46.3%, which is not different from the literature data.

MOLECULAR MECHANISMS OF HYPOXIC REGULATION OF PROLIFERATION RELATED GENE EXPRESSIONS IN GLIOMA CELLS

M.Y. Sliusar, O.O. Riabovol, O.H. Minchenko

Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

Hypoxia is one of the powerful inducers of the expression of a large group of genes, which control glycolysis and proliferation processes in low oxygen conditions or as a result of low oxygen consumption. Hypoxia-inducible factor (HIF) activates the transcription of genes that are involved in crucial aspects of cancer biology, including angiogenesis, cell survival, glucose metabolism and invasion. Moreover, hypoxia is one of the factors which induce the endoplasmic reticulum stress which, like hypoxia, is an obligatory component of malignant tumor growth. The transcription factor X-box binding protein 1 (XBP1) is a key component of the endoplasmic reticulum stress response and controls close to one thousand genes responsible for tumor growth including hypoxia inducible genes.

The aim of this study was to identify regulatory binding sites for transcription factor HIF and XBP1 in the promoter regions of cancer growth related genes in order to clarify the molecular mechanisms of the interaction of hypoxic regulation with endoplasmic reticulum stress signaling pathways at the level of transcription factor teamwork.

Materials and methods. For identification of HIF and XBP1 binding sites in the promoter regions of cancer growth related genes we have used the bioinformatic methods. The expression level of these genes in glioma cells was studied by quantitative polymerase chain reaction.

Results. We have studied the effect of hypoxia on the expression level of glioma growth related genes such as *GPI*, *ALDOC*, *ENO2*, *NNT*, *IDH1*, *IDH2*, *MDH2*, *GOT1*, *GOT2*, *FAM16A*, *ETHE1*, *ENO2*, *ALDOC*, *AIFM1*, *ACO1*, and *ACO2* in relation to inhibition of the endoplasmic reticulum stress mediated by IRE1 signaling. We have shown that hypoxia affects the expression level of most studied genes in gene specific manner and that effect of hypoxia on the expression of some genes is modulated by IRE1. Binding sites for HIF and XBP1 were found in most

studied genes and some of these binding sites can recognize both transcription factor sites.

Conclusion. Results of our investigation demonstrate that hypoxia affects the expression of genes which have binding sites for HIF and XBP1 and that IRE1 can modify the effect of hypoxia on gene expressions.

IMMUNIZATION WITH XENOGENEIC EMBRYO PROTEINS POSITIVELY EFFECTS MACROPHAGES FUNCTIONS IN MICE BEARING EHRlich CARCINOMA

T.V. Symchych, O.M. Karaman, N.I. Fedosova, I.M. Voyeykova, H.V. Didenko

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

Macrophages (Mph) may play a potent role in cancer immunosurveillance, although in most cases Mph anticancer activity is switched to cancer-promoting one. Modulating Mph functions may be an efficient tool influencing efficacy of cancer treatment.

The aim: to study the effect of immunization with chicken embryo proteins (CEP) as the prototype of a xenogeneic cancer vaccine on activity of Mph in mice bearing Ehrlich carcinoma.

Materials and methods. Ehrlich carcinoma cells ($4 \cdot 10^5$ cells/mouse) were injected i.m. Immunizations with CEP (0.3 mg/ml, 0.3 ml/mouse) were performed on days 2, 5, and 8 after the tumor injection. The Mph activity was checked on days 7, 14, 21 and 28 after the tumor challenge. The cytotoxic activity (CTA) and the antibody-dependent cytotoxic activity (ADCC) of the Mph were determined by MTT assay. The Mph metabolic activity (MA) (spontaneous and induced with Pyrogenal) was measured by NBT assay. IL-1 β and TNF- α production by adherent splenic cells was analyzed by ELIZA. The data of the immunized mice were compared to unimmunized tumor-bearing and intact mice (are referred to as the unimmunized and the intact control, respectively).

Results. In the unimmunized group, Mph CTA, ADCC and induced MA were below the intact control level ($p < 0.05$ for CTA and ADCC on days 14–28, for induced MA — on day 28). In the immunized group Mph spontaneous MA, CTA and ADCC were increased on day 7 ($p < 0.05$ as compared to the intact mice); as compared to the unimmunized control, on days 14 and 28 (CTA), and 28 (induced MA and ADCC).

The adherent splenocytes of unimmunized mice produced *in vitro* less IL-1 as compared to the intact control ($0.05 < p < 0.1$ on days 14, 21); TNF- α level did not differ from the intact group one. In the immunized group, TNF- α production reached its peak on day 21 ($0.05 < p < 0.1$ for TNF as compared to the intact control, $p < 0.05$ as compared to the day 14) and remained high on day 28.

Correlation analyses revealed the decrease of Mph CTA in the unimmunized group inversely correlate with the level of the medium size circulating immune complexes (CIC) ($r = -0.71$, $p = 0.03$) and IL-4 ($r = -0.59$, $p = 0.07$) in serum. Both CIC and IL-4 are among the factors known to polarize Mph towards 2 type and together with the decrease in CTA, ADCC and IL-1 β production point to the type 2-like Mph activation in the unimmunized mice. In the immunized group, Mph CTA, NBT reduction and TNF- α production were increased or normal and did not correlate with the IL-4 or CIC level pointing to the type 1-like Mph activation in the group.

Conclusion. Immunization with CEP elicited Mph activation on early stages of tumor growth and possibly protected these cells from type 2 polarization later. The precise study of the CEP impact on Mph polarization is needed.

USING OF P16^{INK4a} IN DIFFERENTIAL DIAGNOSTICS OF PRIMARY PULMONARY SQUAMOUS CELL CARCINOMA AND METASTATIC CERVICAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA TO THE LUNG

L.M. Zakhartseva¹, O.O. Huz¹, Yu. Zakhartsev²

¹Bogomolets National Medical University

²Kyiv City Clinical Oncological Center, Kyiv, Ukraine

Squamous cell carcinoma (SCC) of the cervix is one of the most common cancer in women worldwide. Pulmonary metastasis was reported to occur in 3.1 to 8.2% of patients with cervical carcinoma. In 90.0% of cases the cause of cervical cancer is human papilloma virus (HPV). This carcinoma often metastasizes to the lungs and gives a positive reaction on marker p16^{INK4a} (clone E6H4) — excellent surrogate marker for HPV infection in SCC of the cervix with strong expression in more than 95.0% of cases. There is no reliable immunohistochemical marker that discriminates between primary pulmonary SCC and cervical SCC metastatic to the lung.

The aim: this study evaluates the diagnostic utility of p16^{INK4a} in the differential diagnostics of pulmonary metastasis from cervical cancer.

Materials and methods. We report 5 cases of SCC in the lung in patients with a previous history of cervical SCC who underwent surgical treatment and two cases of primary pulmonary SCC. Formalin-fixed, paraffin-embedded biopsy specimens of primary cervix cancer (n = 5) and pulmonary SCC (n = 2) were analyzed using p16^{INK4a} immunohistochemical staining.

Results. In preparations of the cervix and tissues of the lung, a tumor of a similar morphological structure appears as a SCC with areas of necrosis. Among all cases of metastatic cervix carcinoma more than 90.0% of tumor cells both in the cervix and lung tissues had a positive reaction with p16^{INK4a}. All cases of primary SCC lung showed negative p16^{INK4a} reactivity.

Conclusion. Morphological picture that includes clinical data and results of immunohistochemical studies corresponded to metastasis of moderately differentiated SCC of cervix to the lung. Thus, p16^{INK4a} may be useful for the distinguishing primary pulmonary SCC from metastatic SCC of the cervix.

EXPRESSION OF TOPOISOMERASE II ALPHA: CORRELATION ANALYSIS WITH DIFFERENT MOLECULAR BREAST CANCER SUBTYPES, PROLIFERATIVE INDEX AND AGE OF PATIENT

L. Zakhartseva^{1,2}, M. Yanovytska^{1,2}, L. Nekrasova², M. Plodienko¹

¹Bogomolets National Medical University

²Kyiv City Oncology Center, Kyiv, Ukraine

Topoisomerase II alpha (TOP2) is considered to have predictive value for anthracycline-based chemotherapy regimens. Immunohistochemical detection of TOP2 remains to be the most relevant in our country due to its low value.

The aim: to evaluate correlation between TOP2 expression and molecular breast cancer subtypes, proliferative index and age of patient.

Materials and methods. 128 paraffin-embedded tumor samples from core biopsy specimens with histologically confirmed breast cancer were evaluated by immunohistochemical analysis for TOP2, estrogen receptors, progesterone receptors, Her2neu protein and Ki-67. Correlation-regression analysis (Pearson's correlation coefficient) was used to evaluate the data.

Results. Expression of TOP2 (evaluated as positive when higher than 20.0%) was detected in all molecular breast cancer subtypes. 76.0% was positive for TOP2 in luminal B subtype (n = 50), 64.0% in Her2-enriched tumors (n = 14), 50.0% was positive in triple-negative subtype (n = 16) and 23.0% in luminal A subtype (n = 48). Relationship between proliferative index and TOP2 expression was high and statistically significant (p = 0.0001). No statistically significant correlation between age and expression of TOP2 was found.

Conclusion. Our data confirms that TOP2 expression is higher in aggressive subtypes of breast cancer (associated with high Ki-67) and can be interpreted as a kind of proliferative marker. It is also associated with luminal B, Her2neu-enriched and triple-negative subtypes.