

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ**

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

«До захисту в ЕК»

Директор інституту(декан факультету)

Грегірчак Н.М.
(підпис) (прізвище та ініціали)

«До захисту допущено»

Завідувач кафедри

Пирог Т.П.
(підпис) (прізвище та ініціали)

« » 2021 р.

« » 2021 р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ МАГІСТРА

з спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код та назва спеціальності)

Освітньо-професійної програми «Фармацевтична біотехнологія»

на тему: Вплив інсуліну на метаболізм глюкози і біологічні властивості клітин раку молочної залози людини нових постійних ліній

Виконав: здобувач 2 курсу, групи 02

Видасов Назар Володимирович
(прізвище, ім'я по батькові повністю)

(підпис)

Керівник Тетеріна Світлана Миколаївна
(прізвище, ім'я по батькові повністю)

(підпис)

Консультанти _____
(прізвище та ініціали)

(підпис)

(прізвище та ініціали)

(підпис)

(прізвище та ініціали)

(підпис)

Рецензент Піхова О.В.
(прізвище та ініціали)

(підпис)

Засвідчую, що в цій дипломній роботі немає запозичень із праць інших авторів без відповідних посилань.

Здобувач _____
(підпис)

Київ – 2021 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь магістр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код і назва)

Освітньо-професійна програма «Фармацевтична біотехнологія»

(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і мікробіології

Пирог Т.П.

“ 28 ” жовтня 2020 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

Видасова Назара Володимировича

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Вплив інсуліну на метаболізм глюкози і біологічні властивості клітин раку молочної залози людини нових постійних ліній

керівник роботи Тетеріна Світлана Миколаївна, к.т.н., доцент

(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом закладу вищої освіти від “26”жовтня2020 року № 868-кс

2. Строк подання здобувачем роботи _____

3. Вихідні дані до роботи: Лінії клітин: BCC/P, BC-ML, BC-BO, BC-LV та BC-KS

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) Вступ; Розділ 1. Літературний огляд; Розділ 2. Матеріали та методи
Розділ 3. Результати; Висновки; Список використаних джерел; Додатки.

5. Перелік графічного матеріалу

6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв

7. Дата видачі завдання 28 жовтня 2020 р.

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
	Розділ 1. Літературний огляд	09.09.2019-14.05.2020	
	Розділ 2. Матеріали та методи	14.12.2020-10.01.2021	
	Розділ 3. Результати	30.09.2019-10.01.2021	

Здобувач

(підпис)

Видасов Н.В.

(прізвище та ініціали)

Керівник роботи

(підпис)

Тетеріна С.М.

(прізвище та ініціали)

РЕФЕРАТ

Магістерську роботу присвячено дослідженню впливу високих і нормальних концентрацій інсуліну на проліферативну та метаболічну активність клітин раку молочної залози (PMЗ) людини нових унікальних ліній ВСС/Р, ВС-ML, ВС-ВО, ВС-KS та ВС-LV, які були отримані нами на базі ІЕПОР ім. Р.Є. Кавецького з плеврального випоту хворих на РМЗ III-IV стадії шляхом тривалого пасування в системі *in vitro*. В роботі також оцінювали вплив гормону на експресію білків цитоскелету і міжклітинної адгезії, що асоційовані зі ступенем злоякісності клітин РМЗ та їх чутливістю до дії протипухлинних засобів. Отримані результати дозволять нам виявити особливості роботи метаболічної системи вуглеводів цих злоякісних клітин і визначити вплив інсуліну на біологічні властивості клітин РМЗ. Такі дані можуть стати підґрунтям для пошуку нових способів боротьби з РМЗ на пізніх стадіях розвитку онкологічного процесу.

Встановлено, що клітини РМЗ ліній ВСС/Р, ВС-ML, ВС-ВО, ВС-LV та ВС-KS характеризуються зниженою чутливістю до мітогенної активності інсуліну і лише надмірна кількість гормону (5 мкг/мл) стимулює їх проліферацію. В клітинах РМЗ людини всіх досліджених ліній лише високі концентрації інсуліну, що відповідають умовам гіперінсулінемії, здатні підвищувати поглинання глюкози. Культивування клітин лінії ВСС/Р в присутності високих концентрацій інсуліну призводило до підвищення їх злоякісності: збільшення міграційної активності *in vitro* та підвищення посадочної ефективності на 56%, що корелюють з підвищенням експресії маркера мезенхімальних клітин - α -актину на 90,3%. Інсулін в найвищій з досліджених концентрацій (5 мкг/мл) стимулює підвищення експресії Акт (протеїнкіназа РКВ – один з ключових ферментів метаболізму глюкози) у 1,5-2,5 рази в клітинах ліній ВСС/Р, ВС-ML і ВС-ВО, що корелює з підвищенням проліферації пухлинних клітин. Разом з тим, інсулін впливає на зниження ступеня диференціювання та підвищення злоякісності клітин ліній ВСС/Р і ВС-ВО оскільки після їх обробки інсуліном в концентрації 5 мкг/мл спостеріголось

підвищення експресії маркера диференціації CD44 на 83,7% і 106,2%, відповідно.

Робота складається з вступу, розділу матеріали і методи, розділу результати та списку використаної літератури (95 посилань). Загальний обсяг роботи – 71 сторінки, містить 6 таблиць, 14 рисунків.

Ключові слова: рак молочної залози, інсулін, метаболізм глюкози.

Зміст

РЕФЕРАТ.....	3
ВСТУП.....	6
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	9
РОЗДІЛ 1. Особливості метаболізму пухлинних клітин. Роль інсуліну в процесі утворення пухлинних клітин та пухлинної прогресії	9
1.1. Порушення вуглеводного обміну в організмі людини.....	9
1.2. Молекулярні механізми виникнення гіперінсулінемії та інсулінорезистентності в процесі канцерогенезу.....	13
1.3 <i>In vitro</i> моделі для дослідження патологій вуглеводного обміну	16
1.4. Метаболічний фенотип пухлинної клітини.....	22
1.5 Існуючі способи метаболічної терапії пухлинних клітин.....	25
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА	28
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ	28
2.1. Матеріали	28
2.2. Методи.....	30
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ	35
3.1. Характеристика нових клітинних ліній РМЗ за молекулярним підтипом	35
3.2. Чутливість клітин РМЗ до мітогенної дії інсуліну	37
3.3. Вплив інсуліну на метаболізм глюкози клітинами РМЗ людини нових ліній	39
3.4. Продукція лактату в культуральному середовищі з клітин нових ліній РМЗ після їх культивування в присутності інсуліну.....	42
3.5. Вплив інсуліну на посадочну ефективність клітин лінії ВСС/Р	43
3.6. Аналіз впливу ІНС на міграційну активність клітин лінії ВСС/Р	45
3.7. Вплив інсуліну на експресію білків адгезії та цитоскелету в клітинах РМЗ людини лінії ВСС/Р	47
3.8. Вплив інсуліну на експресію білків, асоційованих з метаболізмом глюкози в клітинах РМЗ людини	49
3.9. Вплив інсуліну на чутливість клітин РМЗ людини ліній ВСС/Р та ВС-ML до дії доксорубіцину	55
ВИСНОВКИ	59
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	61

ВСТУП

В Україні рак молочної залози (РМЗ) посідає перше місце серед жіночих онкологічних хвороб. За останні 5 років показник захворюваності зріс майже на 6%. Разом з тим, показник смертності за той самий період зменшився на 6%. Однак, смертність від РМЗ все ще переважає у структурі смертей від злоякісних пухлин (20%) [1].

Відомо, що перепрограмування енергетичного метаболізму є характерною рисою пухлинного росту [2]. Метаболізм пухлинних клітин викликає величезний інтерес через велику кількість онкогенів і генів-онкосупресорів, залучених в цей процес.

Інсулін є гормоном пептидної природи, який відіграє важливу роль в метаболічних процесах нормальних та пухлинних клітин, а також є важливим фактором росту при утворенні та прогресуванні пухлини. Він володіє цілим спектром біологічних ефектів і впливає на велику кількість процесів у клітинах органів-мішеней, але найважливішу роль відіграє в регуляції вуглеводного обміну: основна біологічна функція інсуліну – регуляція рівня глюкози в крові [3].

Разом з тим, дослідження останніх років показали, що діабет тісно пов'язаний з підвищеним ризиком розвитку РМЗ [4]. Окрім того, різні метааналізи показали, що високий рівень інсуліну та С-пептиду (маркер секреції інсуліну) в сироватці крові корелюють з підвищеним ризиком розвитку раку кишечника, підшлункової, молочної залози та ендометрію у осіб не хворих на діабет [4]. Отже, гіперінсулінемія може сприяти прогресії РМЗ у пацієнтів.

Рецидив РМЗ з утворенням метастатичного плеврального випоту залишається причиною загибелі 25% хворих навіть після їх первинного лікування (хірургічне втручання, хіміотерапія, променева терапія) [5].

					НУХТ БТЕК 02.01.01 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Видасов Н.В.				ВСТУП	Літ.	Арк.	Акрушів
Консульт.	Лихова О.О.						5	2
Керівник	Тетеріна С.М.					Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Зав. каф.	Пирог Т.П.							

Цитологічна діагностика клітинного складу плевральних виділень 119 пацієнтів хворих на РМЗ показала, що у 97% випадків пухлинні клітини відповідали інфільтруючому протоковому раку – інвазивна високозлоякісна форма новоутворення [6]. Окрім того, результати отримані нами раніше [7] свідчать, що клітини РМЗ людини, отримані із плеврального випоту характеризуються високою проліферативною і міграційною активністю, туморогенністю *in vitro*, низькою чутливістю до дії протипухлинних препаратів платини і камптотецину. Однак, можливі механізми і ефекти впливу інсуліну на такі пухлинні клітини залишаються не дослідженими.

Відповідно до всього сказаного вище, актуальним питанням є порівняльний аналіз показників окремих ланок метаболізму вуглеводів і біологічних властивостей клітин РМЗ за умов їх обробки високими або нормальною концентраціями інсуліну. Новизною роботи є комплексне дослідження показників метаболізму вуглеводів і біологічних властивостей клітин РМЗ людини високого ступеня злоякісності після їх обробки інсуліном. Окрім того, в якості об'єктів дослідження було використано 5 нових унікальних ліній клітин, отриманих з плеврального випоту хворих на РМЗ, що знаходились на III-IV стадії захворювання. Лінії клітин були отримані шляхом тривалого пасажування в системі *in vitro* в Інституті експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України на базі Банку ліній з тканин людини та тварин.

У зв'язку з цим метою роботи була оцінка впливу різних концентрацій інсуліну, що відповідають умовам гіперінсулінемії або фізіологічного стану, на проліферативну активність клітин, інтенсивність поглинання ними глюкози і продукцію лактату, а також пошук можливих механізмів реалізації біологічних ефектів інсуліну.

Апробація результатів роботи. За результатами досліджень опубліковано тези в матеріалах XVI міжнародній науковій конференції студентів і аспірантів «МОЛОДЬ І ПОСТУП БІОЛОГІЇ», присвячена 75 річниці створення біологічного факультету Львівського національного університету ім. І. Франка та 90 річниці від дня народження проф. М.П. Деркача (Львів 27-29 квітня 2020 року), тезу в матеріалах Міжнародної наукової конференції молодих учених, аспірантів і студентів « Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у XXI столітті» (Київ 2–3 квітня 2020 р.) , тези в матеріалах IX Міжнародної науково-технічної конференції «Наукові проблеми харчових технологій та промислової біотехнології в контексті Євроінтеграції» (м. Київ, НУХТ, 10-11 листопада 2020 р.), статтю в журналі «Наукові праці Національного університету харчових технологій» Т.26, №6, с.57-67, тезу в матеріалах VIII науково-практичної конференції школи молодих науковців АТ «ФАРМАК» (Київ, 19 листопада 2020 р.) подано до друку тези в матеріали International Young Scientists Conference on Molecular and Cell Biology, (Warsaw, Poland planned on April 16-17, 2020, postpone the conference to February 25-26, 2021).

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

РОЗДІЛ 1. Особливості метаболізму пухлинних клітин. Роль інсуліну в процесі утворення пухлинних клітин та пухлинної прогресії

1.1. порушення вуглеводного обміну в організмі людини

Нормальне функціонування вуглеводного обміну в клітинах, тканинах та органах людини відіграє ключову роль в підтриманні сталості гомеостазу організму, оскільки вуглеводи виконують пластичну, опорну та енергетичну функції [1].

До порушень процесів вуглеводного обміну відносять такі захворювання як: метаболічний синдром (МС), патологічні типи гіперглікемії, зокрема цукровий діабет (ЦД) 1-го та 2-го типу та патологічні типи гіпоглікемії [2].

Гіперглікемія, інсулінорезистентність, а також підвищення рівня тригліцеридів і гіпертонію, абдомінальне ожиріння, зниження рівня ліпопротеїнів високої щільності було описано Reaven у 1988 році і названо метаболічним синдромом (МС) або «синдромом інсулінорезистентності» [3,4,5]. Відомо, що метаболічний синдром пов'язаний з підвищеним ризиком виникнення цукрового діабету (ЦД) 2-го типу і серцево-судинних захворювань (ССЗ) [3,4].

Найважливішим показником, який характеризує функціональний стан вуглеводного обміну в організмі людини, є рівень цукру в крові. У здорових людей він складає 4,4-6,6 ммоль/л. Формування цієї величини відбувається внаслідок взаємодії як екзо- так і ендогенних чинників. Рівень цукру в крові характеризує відношення кількості глюкози, яку утилізували клітини організму, до сумарної кількості вуглеводів, які надійшли до організму ззовні та утворились ендогенно. Окрім цього, ця величина показує вплив нервової

					НУХТ БТЕК 02.01.01 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 1	Літ.	Арк.	Акрушів
Розроб.	Видасов Н.В.						7	20
Консульт.	Лихова О.О.					Кафедра БТМ		
Керівник	Тетеріна С.М.							
Н. Контр.								
Зав. каф.	Пирог Т.П.							

системи і ендокринних залоз на регуляцію вуглеводного обміну в організмі. Варто відмітити, що серед всіх гормонів, які виділяють ендокринні залози організму тільки інсулін знижує вміст глюкози в крові, решта – підвищують. Також важливим є те, що рівень цукру в крові часто використовується в ролі діагностичного показника в умовах патології. Хвороби, що перебігають з переважним ураженням ланок вуглеводного обміну, можуть супроводжуватися як підвищенням концентрації цукру в крові (гіперглікемія), так і її зниженням (гіпоглікемія). Наприклад, гіперглікемія характерна для цукрового діабету, гіпоглікемія – для глікогенозу [1].

ЦД є групою захворювань порушення обміну речовин, що виникає внаслідок порушеної секреції інсуліну (ЦД 1-го типу) та/або зниження толерантності до інсуліну чутливих клітин (ЦД 2-го типу) [6]. ЦД 1-го типу виникає внаслідок клітинно-опосередкованого аутоімунного руйнування панкреатичних бета-клітин, які виробляють інсулін [7]. Цукровий діабет 2-го типу характеризується зниженням чутливості клітин до інсуліну, спричиненою інсулінорезистентністю, подальшим зниженням вироблення інсуліну та кінцевою клітинною недостатністю [8].

Найбільш поширені клінічні типи цукрового діабету:

1. Інсулінозалежний цукровий діабет – ІЗЦД.
2. Інсулінонезалежний цукровий діабет – ІНЦД:
3. Інші типи діабету, пов'язані з:
 - а) хворобами гормональної етіології;
 - б) вживанням лікувальних засобів і хімічних сполук;
 - в) захворюваннями підшлункової залози;
 - г) деякими генетичними синдромами [7].

Епідеміологічні дані говорять про те, що МС і ЦД 1-го та 2-го типу пов'язані зі збільшенням рівня захворюваності та підвищеним рівнем смертності у пацієнтів з онкологічними захворюваннями [8-15].

Так, МС у хворих на рак молочної залози (РМЗ) корелює з менш сприятливим прогнозом перебігу онкологічного захворювання, а дворічна

безрецидивна виживаність у хворих на РМЗ із МС на 17% випадків менше, ніж у хворих без ознак останнього. Метаболічні порушення, асоційовані з МС, підвищують ризик виникнення і погіршують перебіг РМЗ. Так, у хворих із МС зареєстровано зниження чутливості пухлини до системної протипухлинної терапії, підвищення частоти післяопераційних ускладнень і зменшення показників загальної та безрецидивної виживаності порівняно з пацієнтами без МС. У пацієнок з МС достовірно частіше реєструють пухлини >2 см в діаметрі з більш вираженим метастатичним потенціалом. Адекватна корекція МС може бути додатковим напрямком спеціального лікування, а також первинної та вторинної профілактики РМЗ [9, 10]. Доказом цього є результати призначення метформіну хворим на РМЗ із МС одночасно з проведенням неoad'ювантної системної протипухлинної терапії порівняно з пацієнтами з МС, які отримували стандартне неoad'ювантне медикаментозне лікування, оскільки це сприяло: збільшенню кількості випадків клінічно повної регресії пухлини на 21,5% та часткової регресії на 31%; збільшенню кількості пацієнок з повною морфологічною регресією (V ступінь лікувального патоморфозу) на 20,5%; зростанню кількості клінічно значущих відповідей (повна регресія + часткова регресія) на проведене лікування на 52,5%; зниженню частоти прогресування РМЗ на фоні цитостатичного лікування на 15,5% [13].

Поширеність ЦД на даний момент досягла масштабів епідемії у всьому світі. Ряд широкомасштабних епідеміологічних досліджень показав, що пацієнти з ЦД є більш схильними до розвитку злоякісних новоутворень. Так, наявність ЦД 2-го типу підвищує ризик виникнення РМЗ на 20%, раку ендометрію на 50%, злоякісних новоутворень гепатобіліарної системи в 2 рази, раку підшлункової залози в 2-3 рази [14, 16]. З урахуванням епідеміологічних зв'язків між цими двома захворюваннями, в 2010р. на спільному консенсусному звіті Американського онкологічного товариства (American Cancer Society) та Американської асоціації діабету (American Diabetes Association — ADA) було прийнято рекомендацію щодо регулярного скринінгу раку у пацієнтів із ЦД.

Зв'язок між цими захворюваннями може бути прямим (наприклад внаслідок гіперглікемії, або ЦД – важливий біологічний фактор, який підвищує ризик розвитку раку) чи непрямыми (пов'язані з загальними факторами ризику – вік, ожиріння, фізична активність, дієта, вживання алкоголю, куріння). Втім біологічні механізми взаємодії пухлини і ЦД лишаються не достатньо вивченими. Допоки залишається нез'ясованим, чи впливає ЦД на смертність онкологічних хворих внаслідок розвитку діабету чи в результаті більш агресивної форми онкологічного захворювання за таких умов. На сьогодні встановлено, що наявність ЦД 2-го типу може значно підвищити як загальну, так і питому смертність пацієнтів з раком підшлункової залози (на 30-40%), раком ендометрію (на 30%), РМЗ (на 30%), колоректальним раком (на 50%), раком печінки (в 2,5 рази) [16-18]. Було показано, що вибір типу антидіабетичної терапії впливає на перебіг онкологічного захворювання. Тому, при виборі протипухлинного лікування слід враховувати ускладнення ЦД, адже вони іноді можуть знижувати ефективність лікування.

Серед факторів, що сприяють появі та прогресуванню онкологічних захворювань у пацієнтів з ЦД вирізняють: гіперглікемію, резистентність до інсуліну, гіперінсулінемію, підвищений рівень інсуліноподібного фактору росту-1 (IGF-1), дисліпидемію, підвищення кількості лептину та зниження кількості адипонектину, також відзначають роль запальних цитокінів [19, 20].

Нещодавно, на Національному з'їзді Американського хімічного товариства (American Chemical Society) 2019 р. в Сан-Дієго, США, були представлені результати досліджень групи американських вчених, які спробували пояснити причини підвищення ризику виникнення окремих видів онкологічних захворювань серед осіб з цукровим діабетом 1-го чи 2-го типу. Ними було встановлено, що пошкодження молекул ДНК, що виникає в результаті підвищеного рівня глюкози в крові, може призвести до нестабільності геному та розвитку онкологічних захворювань [21].

1.2. Молекулярні механізми виникнення гіперінсулінемії та інсулінорезистентності в процесі канцерогенезу

Інсулінорезистентність – знижена біологічна відповідь клітин на дію інсуліну. Вона є основною патогенетичною ланкою метаболічного синдрому та цукрового діабету 2-го типу. Розвиток інсулінорезистентності може призвести до розвитку такого клінічного синдрому як гіперінсулінемія, який характеризується підвищеним вмістом інсуліну в крові. На сьогоднішній день визнана роль гіперінсулінемії та інсулінорезистентності в процесі розвитку деяких онкологічних захворювань [22].

Механізми метаболічних порушень, що впливають на розвиток онкологічних захворювань наведено на *Рис. 1, Рис. 2*.

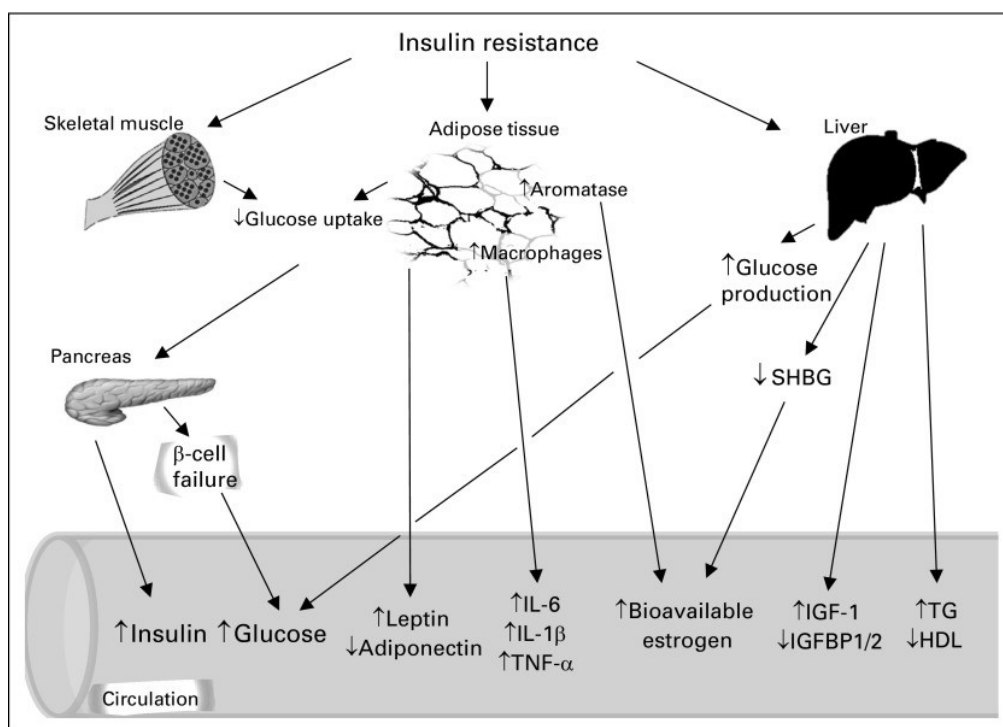


Рис. 1 Фактори, що впливають виникнення та прогресування пухлинних клітин (ПК)

В результаті постійної продукції інсуліну панкреатичними β-клітинами та розвитку резистентності до інсуліну в клітинах печінки, скелетних м'язів та жирової тканини виникає стан гіперінсулінемії. З часом панкреатичні β-клітини декомпенсуються та розвивається гіперглікемія. Також, гіперглікемія може

бути спричинена підвищенням продукції глюкози клітинами печінки в результаті їх інсулінорезистентності та зменшенням поглинання глюкози клітинами жирової тканини та скелетних м'язів.

Ендогенний інсулін, що взаємодіє з клітинами печінки, збільшує синтез інсуліноподібного фактора росту-1 (IGF-1) і призводить до зниження концентрації IGF-зв'язуючих білків (IGFBP) 1 і 2, тим самим потенційно збільшуючи локальну концентрацію біодоступного IGF-1.

Запалення жирової тканини виникає при інсулінорезистентності з виробленням цитокінів та зміною циркулюючих концентрацій адипокінів, таких як лептин та адипонектин. Надмірне ожиріння може призвести до посилення локальної ароматизації андрогенів до естрогенів, що разом із зниженням продукції печінкою гормону, що зв'язує глобулін (SHBG), викликане стійкістю до інсуліну в клітинах печінки, може призвести до підвищення рівня біодоступного естрогену.

Резистентність до інсуліну часто асоційована з порушеннями обміну ліпідів, включаючи підвищення рівня тригліцеридів (ТГ), зниження рівня холестерину та продукцією про-запальних цитокінів: інтерлейкіну (IL-6, IL-1 β), фактору некрозу пухлин (TNF- α) [15].

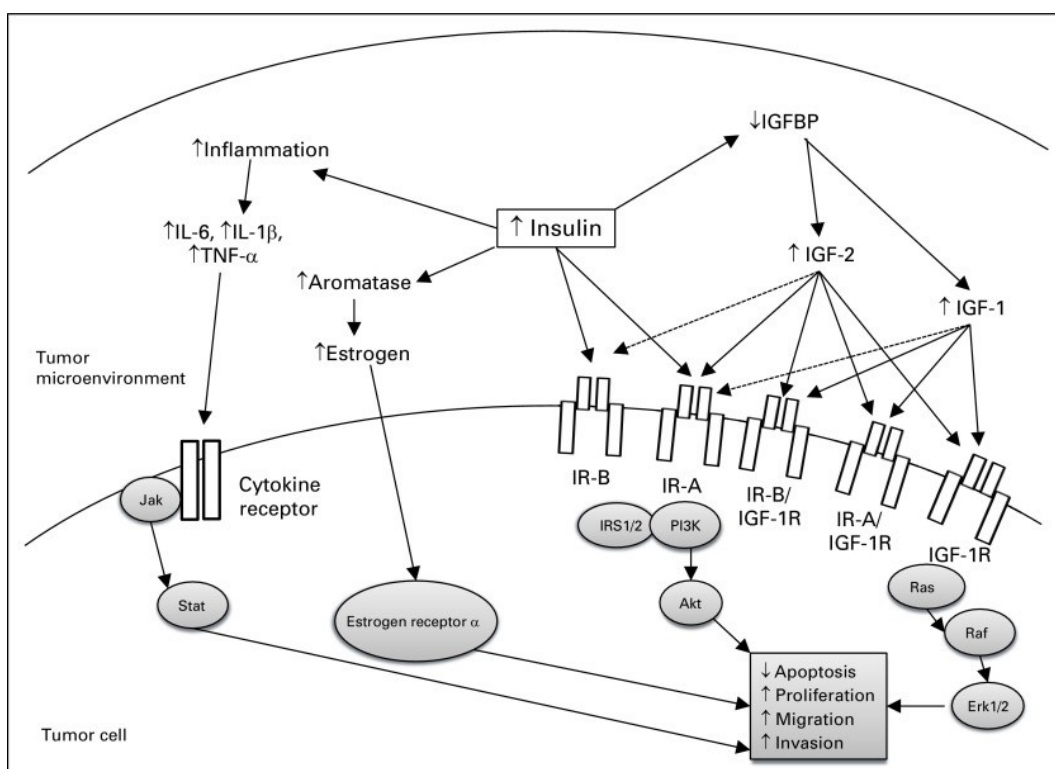


Рис. 2 Прямий та непрямий вплив інсуліну на ріст пухлини (*Erk*, кіназа позаклітинної регуляції; *IL*, інтерлейкін; *IRS1/2*, субстрат інсулінового рецептору; *TNF*, фактор некрозу пухлин)

На Рис. 2 зображений ефект гіперінсулінемії на мікрооточення пухлини та внутрішньоклітинну сигналізацію ПК, які сприяють прогресуванню захворювання. Інсулін, IGF-1 та IGF-2 зв'язуються з двома ізоформами рецепторів інсуліну (IR) (IR-A, IR-B), рецептором IGF-1 (IGF-1R) та IR / IGF-1R з гібридними рецепторами (IR-A / IGF-1R, IR-B / IGF-1R) з різною спорідненістю. Суцільні стрілки вказують на сильну спорідненість до рецептора, а пунктирні стрілки – на слабку спорідненість до рецептора. Кількість IGF-зв'язуючих білків (IGFBP) 1 і 2 регулюється інсуліном і може призвести до підвищення біодоступності IGF-1 та IGF-2. Зв'язування інсуліну з IR в першу чергу активує фосфатидилінозитол-3-кіназа (PI3K) –Akt – mTOR – сигнальний шлях мішені рапаміцину ссавців. Зв'язування IGF-1 та IGF-2 з IGF-1R стимулює сигнальні шляхи PI3K-Akt-mTOR та Ras-Raf-MAPK. Це призводить до переходу клітин з G1 у S фазу клітинного циклу, активації проліферації та пригнічення апоптозу клітин. Підвищення рівня інсуліну стимулює посилення експресії ароматази, що веде до підвищення продукції естрогену та активізації α -рецептора естрогену в ПК.

Запальні процеси в мікрооточенні ПК можуть бути посилені внаслідок гіперінсулінемії, що веде до локальної продукції цитокінів та активації Jak-Stat сигнального шляху в пухлині [15].

Дані про механізми впливу гіперінсулінемії та збільшення концентрації IGF-I на канцерогенез стали підґрунтям для розробки таргетних препаратів, які блокують взаємодію IGF-IR. Ці лікарські засоби наразі проходять клінічні випробування [11].

Окрім того варто відзначити, що деякі лікарські засоби, які застосовують у системній протипухлинній терапії РМЗ, посилюють інсулінорезистентність. Зокрема дексаметазон, який зазвичай призначають при хіміотерапії РМЗ, викликає гіперглікемію. Прийом тамоксифену у пацієнток із надмірною масою

тіла в менопаузі призводить до зниження чутливості до інсуліну майже в 7 разів і підвищення частоти виникнення ЦД 2-го типу порівняно з жінками, які не приймають тамоксифен. Широке застосування метформіну як препарату першої лінії для лікування хворих на ЦД 2-го типу призвело до частого одночасного призначення препарату з протипухлинними засобами у хворих зі злоякісними новоутвореннями різної локалізації та ЦД. Підвищення ефективності протипухлинної терапії у пацієнтів онкологічного профілю із ЦД 2-го типу, що приймають бігуаніди, порівняно з пацієнтами, які застосовують інші гіпоглікемічні засоби, стало передумовою для вивчення можливих протипухлинних механізмів дії метформіну. В експериментальних дослідженнях виявлено, що протипухлинний ефект метформіну зумовлений активацією аденозинмонофосфатзалежної протеїнкінази (АМРК), яка відіграє ключову роль в енергетичному балансі клітини. Активація АМРК призводить до гальмування анаболічних процесів (пригнічення неоглюкогенезу в гепатоцитах і ліполізу в адипоцитах, зниження синтезу білка шляхом пригнічення mammalian target of rapamycin) і запуску процесів катаболізму в клітині (підвищення гліколізу, окислення жирних кислот) [12, 23].

Останнім часом для терапії деяких видів злоякісних пухлин схвалено інгібітори mTOR (mTORi). Такі інгібітори mTOR, як еверолімус, пов'язані з підвищенням вмісту загального холестерину, ЛПНЩ і тригліцеридів. Робоча група PI3K-Akt-mTOR (PAM) Національного інституту раку США (US National Cancer Institute) нещодавно розробила керівні принципи для лікування гіперглікемії у хворих на рак. Як правило, ці метаболічні ефекти можуть проявлятися у пацієнтів із резистентністю до інсуліну або з більш високим ризиком гіперглікемії із ЦД в анамнезі [24].

1.3 *In vitro* моделі для дослідження патологій вуглеводного обміну

Тривалий час в світовій практиці для вивчення патологій вуглеводного обміну застосовували моделі *in vivo*. В якості піддослідних тварин частіше всього використовували щурів, китайських хом'ячків, мишей та кроликів. Однак дослідники, що працювали з даними моделями зіткнулись з рядом

серйозних етичних проблем, оскільки сучасний світ вимагає гуманного поводження з тваринами. Альтернативною та перспективною заміною їх є використання чутливих клітинних моделей в системі *in vitro* для дослідження патологій вуглеводного обміну [25]. Ці моделі зарекомендували себе як надійний та ефективний спосіб дослідження різного роду порушень вуглеводного обміну та широко використовуються в усьому світі в діагностичних та терапевтичних цілях.

Наприклад, дослідження впливу інсуліну і глюкози на функціональну активність Т-лімфоцитів-хелперів 17-го типу (Th17), в системі *in vitro* показали, що метаболічні порушення при ЦД 2-го типу, можуть асоціюватись з посиленням функціональної активності цих клітин.

На даний момент відомо, що ЦД 2-го типу асоціюється з розвитком субклінічного запалення, яке проявляє себе шляхом збільшення ІЛ-1 β , ІЛ-6 і (TNF)- α в крові. Дані цитокіни можуть створювати прозапальне мікрооточення, яке сприяє активації субпопуляції Th17 – клітин з потенціалом до модуляції запалення.

В якості об'єктів дослідження використовували мононуклеари периферичної крові хворих на ЦД 2-го типу та умовно здорових добровольців, які виділяли шляхом центрифугування на градієнті щільності. Аналіз клітин проводили на проточному цитометрі. Окрім цього на мононуклеарах периферичної крові здорових добровольців та пацієнтів з ЦД 2-го типу досліджували вплив інсуліну та глюкози на продукцію ІЛ-17. В культуральне середовище додавали інсулін та D-глюкозу в концентраціях, що відповідають умовам ЦД 2-го типу *in vivo*. В результаті було показано підвищення функціональної активності Th17 у пацієнтів із ЦД 2-го типу, що відображалось через активацію внутрішньоклітинного синтезу ІЛ-17 після культивування їх в поживному середовищі з вмістом глюкози 5 ммоль/л протягом 24 год [26].

В подальших дослідженнях було встановлено вплив різних концентрацій інсуліну і глюкози на продукцію про- і проти-запальних цитокінів клітинами здорових осіб або пацієнтів з ЦД 2-го. Об'єктом дослідження були

мононуклеари, які виділяли з периферичної крові. В культуральне середовище додавали інсулін і D-глюкозу в концентраціях подібних до норми і вищих за нормальний рівень. В супернатантах з первинних культур клітин (мононуклеарів) та сироватці крові всіх пацієнтів та умовно здорових добровольців визначали вміст IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, TNF α и інтерферона- γ (IFN γ). Окрім цього в супернатантах культур клітин методом твердофазного імуоферментного аналізу (ІФА) визначали вміст IL-23. Концентрацію глюкози в сироватці крові визначали глюкозооксидазним методом на аналізаторі. За результатами досліджень було виявлено гіперглікемію у пацієнтів з ЦД 2-го типу - рівень глюкози в крові складав 9,2 ммоль/л, у здорових добровольців – 4,9 ммоль/л. Також, у пацієнтів з ЦД 2-го типу відмічали гіперінсулінемію (медіана вмісту інсуліну в крові 13,65 мкМЕ/мл, проти 8,71 мкМЕ/мл в умовно здорових добровольців). Вміст про-запальних цитокінів IL-4 ($p < 0,001$), IL-6 ($p < 0,001$), IL-10 ($p = 0,014$), TNF- α ($p = 0,001$) і IL-17A ($p < 0,001$) в сироватці крові був вищий у пацієнтів з ЦД 2-го типу, ніж у здорових добровольців. Кореляційний аналіз даних встановив зв'язок між вмістом глюкози у сироватці крові пацієнтів з ЦД 2-го типу та рівнем IL-17A ($R = 0,8$; $p = 0,005$), IL-6 ($R = 0,8$; $p = 0,005$), IL-4 ($R = 0,7$; $p = 0,024$) і IL-10 ($R = 0,8$; $p = 0,005$). Культивування мононуклеарів в середовищі з підвищеним вмістом глюкози призводить до значного збільшення секреції TNF- α як мононуклеарами здорових осіб, так і пацієнтів з ЦД 2-го типу. Рівні секреції IL-23 і TGF- β клітинами здорових донорів підвищувались в міру зростання концентрації глюкози в поживному середовищі. У хворих на ЦД 2-го типу подібних змін не спостерігали, ймовірно, в зв'язку з тим, що мононуклеари знаходились в умовах гіперглікемії, ще перебуваючи в системній циркуляції, і виявились не чутливими до додаткового впливу високої концентрації глюкози *in vitro*. При додаванні в поживне середовище інсуліну в фізіологічній концентрації спостерігалось зниження продукції IL-23, IL-6 і TGF- β мононуклеарами здорових осіб, в той час як у пацієнтів з ЦД 2-го типу інсулін на секрецію цитокінів не впливав [27].

За літературними даними відомо, що інсулін індукує в клітинах продукцію інсуліно-подібних факторів росту, які, в свою чергу, взаємодіючи з відповідним рецептором, підвищують/активують проліферативну активність нормальних клітин [28].

Грунтуючись на такій властивості інсуліну були розроблені методики оцінки мітогенної активності цього гормону на моделі чутливої клітинної тест-системи нормальних ембріональних фібробластів миші за умови їх культивування в середовищі з низьким вмістом ФСТ (0,5%).

Інсулін індукує в клітинах продукцію інсуліно-подібних факторів росту, які підвищують проліферативну активність не тільки нормальних, але і злякано трансформованих клітин, зокрема відомі дані щодо досить високої чутливості клітин остеосаркоми, РМЗ, раку підшлункової залози, раку кишечника, печінки і легені людини до даного фактору [29].

Такі клітинні моделі можна також використовувати для оцінки мітогенної активності та дослідження механізмів впливу інсуліну або глюкози на проліферативну активність пухлинних клітин різного гістогенезу.

За літературними даними відомо, що преадипоцити мишей лінії 3T3-L1 експресують невелику кількість рецепторів до інсуліну (близько 9000 на клітину). Диференціювання цих клітин в адипоцити призводить до збільшення експресії рецепторів інсуліну на цих клітинах в 12 разів при цьому афінність рецепторів не змінюється. Однак, ріст клітин і накопичення ними жирових включень супроводжуються змінами метаболізму глюкози в клітинах та їх реакції на інсулін. Було показано, що залежність зв'язування інсуліну з рецепторами на модифікованих клітинах та біологічна відповідь цих клітин має нелінійний характер і для досягнення максимальної біологічної реакції адипоцитів (поглинання глюкози) необхідним є лише 40% заповнення рецепторів інсуліну [30-31].

Такі зміни фенотипу клітин 3T3-L1 дозволили розробити чутливу клітинну тест-систему для аналізу одного з основних показників біологічної

активності інсуліну – його здатності стимулювати метаболізм глюкози в клітинах.

Використовуючи методику запропоновану Okaïma T та ін. [32] клітини вихідної лінії 3T3-L1 диференціюють в адипоцити. Клітини, що містять велику кількість ліпідних включень використовують в подальших дослідженнях механізмів різних порушень метаболічної активності клітин та визначення впливу інсуліну на біологічні властивості клітини, чутливих до дії цього гормону.

На сьогоднішній день встановлено, що ЦД 2-го типу пов'язаний з підвищеним ризиком розвитку таких онкологічних захворювань як: РМЗ, рак тонкої кишки, рак підшлункової залози та ряду інших злоякісних новоутворень [33-34]. Тому, важливо дослідити механізми впливу гіперглікемії, одного з ключових факторів розвитку онкологічних захворювань, на життєздатність пухлинних клітин *in vitro*. При оцінці впливу гіперглікемії на проліферативну активність злоякісно трансформованих клітин в якості об'єктів дослідження використовували клітини РМЗ людини ліній MDA-MB-231, SK-BR-3 та MCF-7. Культури клітин культивували в середовищі DMEM з різним вмістом глюкози (25 mM та 5 mM глюкози) [35].

Відомо, що рецептор до епідермального фактора росту (EGFR) активує мітогенні сигнальні шляхи, які є критичними для проліферації клітин. Надмірна експресія або гіперактивність EGFR є основною характеристикою багатьох злоякісних захворювань людини, включаючи рак молочної залози. Таким чином, EGFR зазвичай розглядають як основний онкогенний фактор і привабливу терапевтичну ціль [36]. Через критичну роль у різних клітинних функціях, сигналінг рецепторів EGF жорстко регулюється ретельним балансуванням між активацією рецепторів та пониженням сигналу, з подальшим включенням рецепторів ендоцитозу, деградації та рециркуляції. Після зв'язування лігандів, таких як EGF, рецептор димеризується, автофосфорилується і потім ініціює активацію різних сигнальних шляхів, що призводять до проліферації клітин. Однак деградація EGFR є засобом зниження

регуляції сигналу і є критичним для гомеостазу сигнальних шляхів EGF/EGFR. Білки Cbl каталізують деградацію EGFR та виступають мішенями для його убіквітинування. Більше того, Rho сімейство GTPase Cdc42 служить молекулярним вимикачем у клітинах та негативно впливає на убіквітинування EGFR, яке каталізується білками Cbl. Тоді аберантний статус цих білків може порушити баланс між рециркуляцією EGFR на поверхні клітини, що призводить до накопичення рецептора, надмірної мітогеної сигналізації і врешті-решт надмірної проліферації клітин.

В ході дослідження було встановлено, що високий вміст глюкози в середовищі сприяє розмноженню клітин РМЗ всіх досліджуваних ліній, що опосередковано активацією EGFR. Окрім того, отримані на даній моделі дані свідчать, що високий рівень глюкози стимулює активацію EGFR через GTPase Rac1 та Cdc42. Cdc42 сприяє фосфорилуванню EGFR, блокуючи деградацію EGFR, опосередковану білками Cbl, тоді як фосфорилування EGFR, опосередковане Rac1, не залежить від деградації EGFR. Поєднання цих регуляторних ефектів призводить до підвищення проліферативної активності клітин РМЗ при культивуванні їх в середовищі з високим вмістом глюкози [35].

Згідно даних літератури відомо, що гіперглікемія сприяє прогресуванню онкологічних захворювань, в той час як її вплив на міграційну та метастатичну активність ПК залишається незрозумілим. Для того щоб зрозуміти молекулярні механізми цих процесів в умовах гіперглікемії на моделі *in vitro*, використовували клітини РМЗ людини лінії MCF-7. Культуру клітин культивують в поживному середовищі з різною концентрацією глюкози (5,56 мМ, або 25,00 мМ) [37].

Іншим важливим чинником, що впливає на розвиток онкологічного захворювання є мікрооточення пухлини, оскільки воно складається з численних стромальних клітин, цитокінів та хемокінів, що помітно посилюють ріст пухлини, її інвазивність та здатність до метастазування [38]. Adham зі співавт. [39] продемонстрували, що концентрація глюкози в поживному середовищі регулює епітеліально-мезенхімальний перехід (ЕМП) пухлинних клітин. Крім

цього дослідження показали, що високий рівень глюкози в мікрооточенні пухлини може посилювати інвазивність клітин РМЗ.

Для кращого розуміння механізмів впливу високого рівня глюкози на життєздатність ПК варто відмітити, що злоякісно трансформовані клітини генерують аденозинтрифосфат (АТФ) в основному шляхом анаеробного гліколізу – ефект Варбурга [40]. Однак, через гідрофобність молекул глюкози, процес проходження глюкози через клітинні ліпідні шари повинен виконуватись за участі транспортера глюкози (Glut) [41]. Тому рівень експресії та функції Glut можуть частково впливати на ефект Варбурга. Транспортер глюкози 1 (Glut1), є одним з головних членів сімейства транспортерів глюкози. Завдяки високій спорідненості Glut1 до молекул глюкози, він може транспортувати їх в клітини навіть при низькій концентрації глюкози в середовищі. Оскільки анаеробний гліколіз є неефективним методом отримання енергії, ПК потребують посиленого постачання глюкози. Надмірний рівень експресії Glut1 спостерігається при таких видах онкологічних захворювань як: РМЗ, рак ендометрію, рак легенів, колоректальний рак [42-44]. В ході досліджень було визначено, що Glut1 є важливим прогностичним показником для пухлинного процесу. Однак чи може гіперглікемія, що є одним з клінічних проявів ЦД 2-го типу, в мікрооточенні пухлини посилити експресію Glut1 і посилити здатність клітин РМЗ до інвазії залишалось незрозумілим.

При використанні даної моделі *in vitro* було продемонстровано, що стан гіперглікемії провокує підвищення рівня експресії Glut1 в клітинах РМЗ. Висока концентрація глюкози може збільшувати експресію Glut1 і, як наслідок, посилювати інвазію клітин шляхом збільшення регуляції експресії матричної металопротеїнази 2 (MMP2) та матричної металопротеїнази 9 (MMP9) [37].

1.4. Метаболічний фенотип пухлинної клітини

Для підтримки гомеостазу клітинам необхідна енергія. Всі процеси життєдіяльності клітини, такі як створення градієнтів концентрації, рух цитоскелета, репарація ДНК, транскрипція, трансляція і везикулярний транспорт, є енергозалежними. Відомо, що енергетичний обмін нормальних

клітин істотно відрізняється від метаболізму клітин при тих чи інших захворюваннях. Тому метаболічний статус може служити інформативним діагностичним маркером, а також показником відповіді на лікування патологічних процесів. У зв'язку з широкою поширеністю онкологічних захворювань оцінка метаболічного фенотипу пухлинних клітин особливо актуальна сьогодні [45].

Пухлинні клітини характеризуються активною неконтрольованою проліферацією, в зв'язку з чим їх енергетичний метаболізм має деякі особливості в порівнянні з нормальними тканинами. На відміну від нормальних клітин, у яких основним способом синтезу АТФ є окислювальне фосфорилювання, у більшості ПК підвищений рівень гліколізу.

Характерною особливістю багатьох солідних пухлин є гіпоксія, яка виникає в результаті дисбалансу між надходженням кисню і його споживанням в тканинах. Вважається, що рівень кисню в пухлинах з гіпоксією нижче, ніж у відповідних нормальних тканинах, в середньому становить 1-2% і нижче. Основними факторами розвитку гіпоксії в пухлині є атипова структура мікросудин, великі відстані між кровоносними судинами і пухлинними клітинами, що обмежує надходження кисню шляхом дифузії, а також знижений транспорт кисню кров'ю в зв'язку з анемією. Численні дослідження останніх двох десятиліть показали, що гіпоксія відіграє істотну роль в пухлинній прогресії і є несприятливим фактором прогнозу лікування [46]. Гіпоксія індукує безліч складних сигнальних шляхів, включаючи HIF, PI3K / AKT / mTOR, MARK, NF-κB, залучених в регуляцію проліферації, апоптозу, запалення, міграції, виживання і метаболізму пухлинних клітин. Серед них найбільша роль в регуляції метаболізму належить HIF1 і mTOR [47]. Транскрипційні фактор HIF1 є головним регулятором метаболізму глюкози в умовах гіпоксії. Він може сприяти деградації мітохондрій через BNIP3-залежну аутофагію, а також блокувати біосинтез мітохондрій, пригнічуючи активність фактора транскрипції MYC. Шлях mTOR бере участь у запуску реакцій гліколізу, біосинтезі ліпідів, амінокислот, нуклеотидів і білків. В результаті в умовах

зниженої оксигенації ПК не здатні до запуску реакцій окисного фосфорилування, що змушує їх переходити на гліколіз [48]. Пухлинні клітини на відміну від нормальних використовують гліколіз навіть при нормальних умовах оксигенації. Даний ефект був відкритий в 1920-х рр. німецьким фізіологом Отто Варбургом і отримав назву аеробного гліколізу, або ефекту Варбурга [49]. Варбург вважав, що переважання гліколізу в присутності кисню обумовлено незворотними порушеннями функцій мітохондрій. Як було виявлено пізніше, насправді лише деякі пухлинні лінії мають мітохондріальні дисфункції, такі як знижена експресія білків-переносників і ферментів, які беруть участь в окисно-відновних реакціях, укорочений цикл трикарбонових кислот, знижена кількість мітохондрій, порушення структури комплексів дихального ланцюга, підвищена кількість інгібіторів мітохондріальної АТФ-синтази і висока чутливість мДНК до окислювального стресу. Показано, що при інгібуванні реакцій гліколізу більшість ПК відновлюють роботу мітохондрій і переходять на окисне фосфорилування [50, 51].

Перехід ПК на гліколітичний тип метаболізму викликаний низкою причин. По-перше, в основі цього лежить висока потреба ПК в синтезі макромолекул для активного росту. Саме в результаті гліколізу утворюються мономери, необхідні для синтезу нуклеїнових кислот, білків і ліпідів. По-друге, при гліколізі знижено утворення вільних радикалів, що знижує рівень генотоксичних пошкоджень в клітині і сприяє пригніченню апоптозу [52-54]. По-третє, продуктом гліколізу є лактат, який транспортується в міжклітинний простір. Відомо, що кисле середовище сприяє пухлинній інвазії і метастазуванню. Крім того, висока концентрація АТФ є несприятливою для ПК, оскільки вона пригнічує гліколіз, пригнічуючи фосфофруктокіназу-1 і піруваткіназу [50]. На сьогоднішній день встановлено, що енергетичний метаболізм пухлинних клітин є балансом між гліколізом і окислювальним фосфорилуванням, а теорія «чистого гліколізу» в пухлині спростована. У досліджах зі зниженням рівня кисню показано, що жодна ПК не може існувати тільки за допомогою гліколізу. Ряд гліом і клітини РМЗ використовують реакції

окисного фосфорилування в якості основного джерела АТФ (хоча їх метаболічний фенотип змінюється в умовах гіпоксії). Вважається, що максимальний внесок гліколізу в виробництво АТФ в ПК становить не більше 50-60%, а в деяких випадках рівень окисного фосфорилування в ПК навіть вище, ніж в оточуючих стромальних клітинах [55, 56]. Крім того, деякі ПК здатні оборотно перемикатися між гліколізом і окислювальним фосфорилуванням в залежності від наявності глюкози в середовищі [55]. Самі пухлини метаболічно гетерогенні, і співвідношення вироблення АТФ шляхом гліколізу і окисного фосфорилування може варіювати в широких межах між різними клітинами одного пухлинного вузла [57].

Таким чином, метаболічна активність ПК являє собою складний процес, який допомагає адаптуватися їм до різних умов навколишнього середовища, а також до їх змін [58].

1.5 Існуючі способи метаболічної терапії пухлинних клітин

Сучасні молекулярно-біологічні дослідження дозволили суттєво поглибити наші знання щодо біології пухлини. Сьогодні, до клініко-морфологічних факторів прогнозу перебігу патологічного процесу додаються все нові молекулярні особливості пухлинних клітин.

Провідні науковці в біології раку (Hanahan зі спіавт.) відзначають, що більшість молекулярно-біологічних маркерів, які сьогодні вивчають, залучені до патологічних процесів і в сукупності визначають здатність клітини до злоякісного росту [59].

Першими предиктивними молекулярно-біологічними маркерами для РМЗ стали рецептори естрогенів (estrogen receptors – ER) та прогестерону (progesterone receptors – PR). Вони являють собою протеїни, які специфічно зв'язують відповідні стероїдні гормони та індукують транскрипцію генів, задіяних у процесах диференціювання, проліферації, адаптації клітин та біосинтезу білка. Зазначають, що прогностичне значення цих маркерів пов'язане, перш за все, з високою чутливістю ER- та PR-позитивних пухлин до гормональної терапії антиестрогеновими препаратами. Дослідженнями вчених з

Малазії (Yip зі співавт.) доведено, що зі зростанням рівня експресії ER та PR посилюється й терапевтичний ефект гормональної терапії. Так, наприклад ER+/PR- -пухлини чутливі до гормонотерапії в 55–60% випадків, а ER+/PR+-пухлини – у 80%.

Услід за рецепторами стероїдних гормонів у клінічну практику увійшов Her2/neu, позитивний статус якого у хворих на РМЗ корелює з високою чутливістю до таргетної терапії трастузумабом [60].

Встановлення ролі молекулярно-біологічних маркерів в канцерогенезі проводиться в комплексі з дослідженням зв'язків між ризиком розвитку онкологічних захворювань, їх прогресії та наявності у хворих метаболічного синдрому (МС). Сьогодні чітко прослідковується взаємозв'язок між розвитком МС та появою онкологічних захворювань, зокрема РМЗ. Так, вчені з США (Garrow та Delegge) за результатами великого популяційного дослідження встановили, що пацієнти з МС мають на 75% вищий ризик виникнення колоректального раку, порівняно з пацієнтами без МС [61].

Relucchi зі співавт. проаналізували дані, отримані в результаті багатоцентрових досліджень за типом випадок-контроль, які проводилися в Італії та Швейцарії. У своєму дослідженні вчені підтвердили наявність прямого зв'язку між розвитком МС та виникненням раку товстого кишечника і прямої кишки у чоловіків, у жінок такої закономірності не виявили [62].

Групою вчених з Італії (Rosato зі співавт.) було вивчено вплив МС і його компонентів на ризик розвитку раку підшлункової залози (РПЗ). Вони встановили, що найбільший вплив на розвиток РПЗ з усіх компонентів МС має цукровий діабет [63].

Згідно з повідомленням дослідників у Lancet Oncology (Ma зі співавт.), ожиріння і гіперінсулінемія, а також поєднання цих двох станів, підвищують ризик смерті серед чоловіків хворих на рак передміхурової залози [64].

Вчені з США (Vona-Davis зі співавт.) вивчали прогностичну роль МС при РМЗ. Ними було встановлено, що у виникненні та прогресуванні РМЗ певну роль відіграє гормональний дисбаланс, наявний при МС. Зокрема,

експерименти *in vitro* показали, що лептин стимулює, а адипонектин пригнічує проліферацію пухлинних клітин і ангіогенез мікросудин, що дуже важливо для розвитку і прогресування РМЗ, оскільки при МС відзначається гіперлептинемія і дефіцит адипонектина, які продукуються жировою тканиною. Крім того, при МС простежується екстрагландулярний синтез естрогенів, зниження статевих гормон-зв'язуючого глобуліну з подальшим підвищенням рівня біоактивного вільного естрадіолу в плазмі, що супроводжується збільшенням біосинтезу інсуліну. Ці механізми мають мітогенний ефект як на недиференційовані, так і на неопластичні епітеліальні клітини молочної залози [65].

Вченими з Китаю (Zhang зі співавт.) було досліджено вплив інсуліну на стимуляцію антипроліферативної активності 2-дезоксиглюкози в клітинах раку товстої кишки (РТК) *in vitro*. Антипроліферативний ефект 2-дезоксиглюкози забезпечується пригніченням гліколізу в клітин РТК, що веде до зменшення продукції АТФ та лактату. Результати досліджень показали, що комбінація інсуліну з 2-дезоксиглюкозою підвищує цитотоксичність останньої за рахунок підвищеного рівня її поглинання. Дані дослідження дали змогу оцінювати 2-дезоксиглюкозу як потенційний терапевтичний засіб проти РТК [66].

Група вчених (Lu зі співавт.) дослідила вплив інсуліну на проліферативну активність клітин колоректального раку *in vitro*. Було показано, що інсулін стимулює проліферацію клітин колоректального раку за рахунок зміни активності протеїнкінази та зміни рівня експресії рецептора інсуліну [67].

Однак, не дивлячись, на значні успіхи в дослідженні молекулярно-біологічних маркерів перебігу пухлинного процесу та встановлення ролі інсуліну в процесі канцерогенезу, закордонними та вітчизняними вченими не досліджено вплив інсуліну на експресію білків, асоційованих з інвазивністю та метастатичною активністю в комплексі з аналізом особливостей експресії рецептора інсуліну в клітинах РМЗ з різним ступенем злоякісності. Окрім того не встановлено в повній мірі роль інсуліну в метаболічних процесах ПК, що відрізняються високою ступінню злоякісності. Дані питання потребують більш ґрунтовних досліджень.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1. Матеріали

Клітинні лінії:

В роботі було використано 5 нових постійних клітинних ліній РМЗ людини, отриманих з плеврального випоту хворих на РМЗ III-IV стадії в Інституті експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України на базі Банку ліній з тканин людини та тварин. Лінії клітин були отримані шляхом тривалого пасажування в системі *in vitro*. Клітини культивували в поживному середовищі RPMI-1640/DMEM (Biowest, Франція) у співвідношенні 1:1 з 10% фетальної сироватки теляти (ФСТ) (Biowest, Франція) та 40 мкг/мл гентаміцину (Sigma, США).

Лінії клітин були отримані з плевральної рідини хворих на РМЗ, за їхньої згоди.

Середовище: DMEM High glucose з 4,5 г/л D-глюкози (Biowest, Франція, кат.№ L0102-500), RPMI-1640 з 4 ммоль/л L-глутаміну (Biowest, Франція, № L0500-500)

Сироватка: фетальна сироватка теляти (ФСТ) (Biowest, Франція, кат. № S181B-500).

Розчини: розчин Версену (БіоТестЛабораторія, Україна), фосфатно-сольовий буфер (Sigma, США, кат. № D1408), фізіологічний розчин (Лекхим, Україна, серія 71033007), гентаміцин (Sigma, США, кат. № G1397).

Фарбники: кристалічний фіолетовий (Sigma, США, кат.№C6158), трипановий синій (Applichem, Німеччина, кат.№A0668).

Приготування фарбника кристалічного фіолетового: 50 мг кристалічного фіолетового розчиняли в 10 мл 70% метилового спирту, який отримували шляхом змішування 7 мл 100% метилового спирту і 3 мл дистильованої води.

					НУХТ БТЕК 02.01.01 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Видасов Н.В.				РОЗДІЛ 2		Літ.	Арк.
Консульт.	Лихова О.О.							28
Керівник	Тетеріна С.М.							7
Н. Контр.							Кафедра БТМ	
Зав. каф.	Пирог Т.П.							

Розчиняли барвник при кімнатній температурі протягом 20 хвилин, періодично перемішуючи отриманий розчин. Кінцева концентрація кристалічного фіолетового - 5 мг/мл. Отриманий барвник зберігали при + 4°C.

Моноклональні антитіла проти: E-cadherin, β -catenin, α -actin, .

Інші матеріали: пластиковий посуд для культури клітин, 96-лункові планшети для культури клітин (SPL, Корея), чашки Петрі (SPL, Корея), "Диагностический набор для определения концентрации глюкозы" (Cormaу, Польща), метанол (Альфарус, Україна), ацетон (Альфарус, Україна), доксорубіцин (Vista, Actavic, Італія), предметні скельця (Thermo Scientific, Germany), покривні скельця (Волес, Україна)

Прилади: CO₂-інкубатор (HealForce, Китай), інвертований мікроскоп Axiovert 25 (CarlZeiss, Germany), камера Горяєва (Фарммедтех, Україна), мини-шейкер PSU-2T (BioSan, Латвія), мультилунковий спектрофотометр (LabystemsMultiskanPLUS, Finland), автоматичний біохімічний аналізатор GBG ChemWell 2900 (AwarenessTechnology, США), центрифуга для мікропробірок типу EppendorfMiniSpin (Eppendorf, США).

.

2.2. Методи

2.2.1. Культивування клітин. Клітини РМЗ людини лінії ВСС/Р (82 пасаж) культивували в поживному середовищі RPMI-1640 з 10% ФСТ та 40 мкг/мл гентаміцину. Клітини РМЗ людини ліній ВС-ML (54 пасаж), ВС-ВО (12 пасаж), ВС-LV (9 пасаж) та ВС-KS (21 пасаж) культивували в поживному середовищі DMEM з 10% ФСТ та 40 мкг/мл гентаміцину. Досліджувані клітини культивували у зволоженій атмосфері з 5% CO₂ при 37°C. Зміну середовища і пересів клітин проводили за стандартною методикою [76]. Для подальших досліджень використовували клітини, що знаходились в експоненційній фазі росту.

2.2.2. Визначення життєздатності та проліферативної активності клітин колориметричним методом.

Проліферативну активність клітин РМЗ за умов їх культивування в присутності інсуліну оцінювали стандартними колориметричними методами шляхом фарбування клітин кристалічним фіолетовим (загальна кількість клітин за білком та ДНК) [76].

Клітини нових ліній висаджували в лунки 96-лункового планшету у 100 мкл повного поживного середовища RPMI-1640/DMEM з додаванням 10% ФСТ в концентрації 1×10^4 клітин/лунку. Клітини інкубували у зволоженій атмосфері в присутності 5% CO₂ при 37°C протягом 24 годин. На наступну добу з усіх лунок видаляли поживне середовище і промивали клітини фосфатно-сольовим буфером. В лунки вносили поживне середовище RPMI-1640/DMEM з 3,0% ФСТ. Далі, у відповідні лунки планшету вносили рекомбінантний інсулін людини (Lilly, Франція) до кінцевих концентрацій 5 мкг/мл, 0,5 мкг/мл, 0,02 мкг/мл, а в лунки негативного контролю додавали фізіологічний розчин (Лекхім, Україна). Одразу після внесення інсуліну,

клітини поміщали у CO₂-інкубатор і культивували при 5% CO₂ та 37⁰C ще 48 годин.

Після закінчення інкубації з усіх лунок планшету видаляли поживне середовище, визначали концентрацію глюкози і продукцію лактату, а в пусті лунки вносили по 50 мкл розчину кристалічного фіолетового (Sigma, США) (5 мг барвника в 1 мл 70% метилового спирту). Планшети інкубували при кімнатній температурі 10 хвилин, барвник видаляли, а залишки барвника вимивали холодною проточною водою. Планшет просушували на повітрі при кімнатній температурі в темному місці протягом 24 годин. Далі проводили елюцію барвника 96° етиловим спиртом (Укрспирт, Україна). Результати фіксували за допомогою мультилункового спектрофотометра (Labsystems Multiskan PLUS, Фінляндія) при довжині хвилі збудження 540 нм. Кількість живих клітин обраховували за формулою:

$$X = (A_{540}(\text{experiment})/A_{540}(\text{control})) \times 100\%.$$

2.2.3. Визначення кількості метаболізованої глюкози і продукція лактату in vitro. Кількість глюкози в поживному середовищі визначали колориметричним ензиматичним методом з оксидазою глюкози, використовуючи "Диагностический набор для определения концентрации глюкозы" (CORMAY, Польща), який проводили згідно інструкції виробника. Визначення вмісту лактату в культуральному середовищі проводили ферментативним методом з використанням лактатоксидази використовуючи "Диагностический набор для определения концентрации лактата" (CORMAY, Польща) згідно інструкції виробника. Визначення показників енергетичного обміну (поглинання глюкози та накопичення лактату) здійснювали із урахуванням вихідної концентрації глюкози в культуральному середовищі та кількості клітин в кожній лунці. Для оцінки результатів використовували

автоматичний біохімічний аналізатор GBG ChemWell 2900 (Awareness Technology, США).

2.2.4. Дослідження посадочної ефективності клітин in vitro. Для визначення посадочної ефективності клітин оцінювали їх колонієутворюючу активність на субстраті. Клітини РМЗ висаджували в лунки 12-лункового планшету у 1 мл повного поживного середовища RPMI-1640/DMEM в концентрації 5×10^4 клітин/лунку. Клітини інкубували у зволоженій атмосфері в присутності 5% CO₂ при 37°C протягом 24 годин. На наступну добу клітини обробляли інсуліном в концентраціях 5 мкг/мл, 0,5 мкг/мл, 0,02 мкг/мл. Одразу після внесення інсуліну, клітини поміщали у CO₂-інкубатор і культивували при 5% CO₂ та 37°C ще 72 години. Далі, клітини висаджували на чашки Петрі діаметром 60 мм в концентрації 2000 клітин/чашку у повному поживному середовищі RPMI-1640/DMEM з 10% ФСТ та 40 мкг/мл гентаміцину та інкубували при 37°C в присутності 5% CO₂ протягом 14 днів. Причому в 1/2 частину чашок Петрі протягом всього періоду інкубації (через 3 доби) додавали інсулін в концентрації 5 мкг/мл, 0,5 мкг/мл, 0,02 мкг/мл.

Через 2 тижні, колонії клітин фарбували розчином кристалічного фіолетового протягом 10 хвилин, лунки промивали проточною водою і рахували кількість колоній в кожній лунці за допомогою біокуляра [77].

2.2.5. Аналіз міграційної активності пухлинних клітин in vitro методом scratch assay. Клітини висаджували на планшет і обробляли інсуліном за схемою, що описана вище та інкубували при 37°C і 5% CO₂ до моменту утворення 100% моношару. Використовували наконечники для смплера об'ємом до 200 мкл для створення пошкоджень клітинного моношару. Після чого, для видалення клітинного дебрису і вирівнювання країв подряпин, повністю змінювали поживне середовище в усіх лунках. Процес міграції клітин в зоні пошкодження клітинного моношару спостерігали за допомогою

фазово-контрастного мікроскопа Axiovert 25 та фотографували за допомогою цифрової камери. Перша серія фото була зроблена одразу після пошкодження моношару, а наступні – через кожні 12 годин. Всі фото проаналізували і визначили час інкубації, необхідний досліджуваним клітинам для повного відновлення клітинного моношару [78].

2.2.6. Імуноцитохімічний аналіз. Для проведення імуноцитохімічного аналізу досліджувані клітини висаджували в чашки Петрі на покривні скельця в повному поживному середовищі в концентрації 4×10^5 клітин/чашку. Чашки інкубували протягом 24 годин. Далі, клітини обробляли інсуліном за схемою, що описана вище та інкубували при 5% CO₂ і 37°C протягом 72 годин. В якості контролю використовували клітини, які культивували без інсуліну. Після інкубації скельця з клітинами поміщали у фіксуючий розчин (метанол + ацетон: 1:1) на 2 год. при -20° C, після чого інкубували 20 хвилин з 1% розчином бичачого сироваткового альбуміну (БСА). Потім на 1 годину наносили моноклональні антитіла проти: рецептора естрогену, рецептора прогестерону, HER-2/Neu, віментин, β -catenin, α -actin, CD24, CD44 (Thermo Scientific, США). Після чого, застосовували систему візуалізації Ultra Vision LP Value Detection system (Thermo Scientific, США), яка містить вторинні антитіла, кон'юговані з пероксидазою, активність якої виявляли за допомогою субстрату діамінобензидину (DAB). Після проведення імуноцитохімічної реакції препарати промивали проточною водою та дофарбовували розчином гематоксилін-еозину (15-30 сек.) (Sigma, США), після чого препарати заключали в Faramount Aqueous Mounting Medium (Thermo Scientific, США). Аналіз результатів проводили підраховуючи клітин з експресією (коричнєве забарвлення клітин) за допомогою світлового мікроскопу та оцінювали за допомогою класичного метода H-Score:

$$S=1xA+ 2xB + 3xC,$$

де S – показник «H-Score», значення якого знаходяться у межах від 0 (білок не експресується) до 300 (сильна експресія у 100% клітин); А- % слабо «зафарбованих» клітин, В - % помірно «зафарбованих» клітин, С - % сильно «зафарбованих» клітин [79].

2.2.7. Статистичний аналіз. Розрахунки середнього значення досліджуваних показників (М) та середньої помилки середньої арифметичної (m) виконані за допомогою програмної пакета Excel 2016. Для оцінки рівнів значимості відмінностей середніх значень між групами застосовували t-критерій Ст'юдента. Розрахунки виконані за допомогою програмного пакета STATISTICA 6.0. Достовірними вважали відмінності з вірогідністю не менше 95% ($p<0,05$).

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ

3.1. Характеристика нових клітинних ліній РМЗ за молекулярним підтипом

Для характеристики патологічних і молекулярних властивостей клітин РМЗ нових лінії використовували імуноцитохімічний аналіз експресії рецепторів естрогену, прогестерону і HER-2/Neu (Таблиця 1). Результати експресії даних рецепторів є тими факторами, які враховуються в плануванні ад'ювантного лікування в рамках Сент-Галленського консенсусу [80].

Таблиця 1

Характеристика клітин РМЗ за рецепторним статусом

Клітинна лінія	HER-2/Neu	Рецептор прогестерону	Рецептор естрогену
BCC/P	—	—	—
BC-ML	—	—	—
BC-BO	$99,7 \pm 6,5$	—	—
BC-LV	—	—	$114,0 \pm 8,7$
BC-KS	$78,3 \pm 4,1$	$102,7 \pm 7,5$	—

Дослідження не виявили експресію зазначених маркерів в пухлинних клітинах BCC/P та BC-ML. Це дозволяє нам можна віднести ці клітини до базального (тричі негативного) молекулярного підтипу (Рис.1). Для

					НУХТ БТЕК 02.01.01 КР ПЗ							
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 3				Літ.	Арк.	Акрушів	
Розроб.	Видасов Н.В.											
Консульт.	Лихова О.О.										35	22
Керівник	Тетеріна С.М.								Кафедра БТМ			
Н. Контр.												
Зав. каф.	Пирог Т.П.											

пухлинних клітин данного підтипу характерний низький ступінь диференціювання, високий мітотичний індекс та метастатичний потенціал. Наявність клітин такого типу у хворих на РМЗ характерна для агресивного перебігу захворювання і відсутності молекулярних мішеней, дія на які могла б забезпечити клінічний ефект терапії.

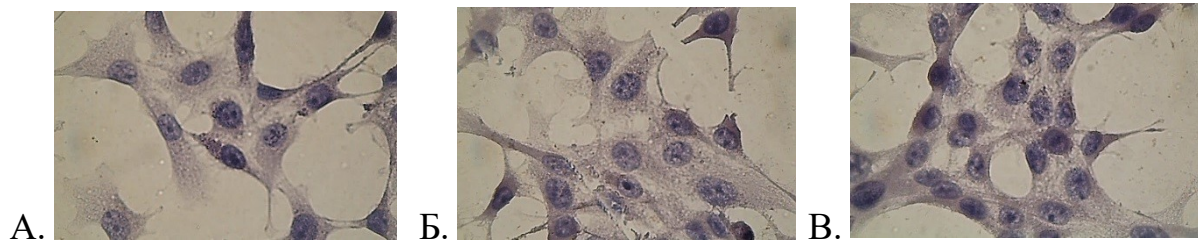


Рис.1 Відсутність експресії рецептора естрогену (А), рецептора прогестерону (Б) і HER-2/Neu (В) в клітинах лінії BCC/P.

Результати характеристики рецепторного статусу клітин лінії BC-BO вказують на те, що їх можна віднести до HER2-позитивного молекулярного підтипу (Рис. 2).

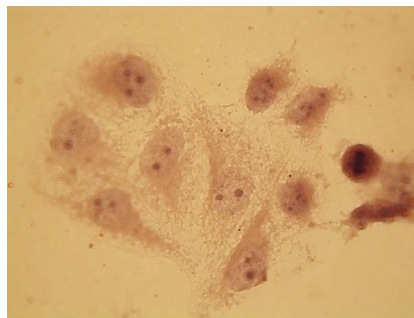


Рис. 2 Експресія рецептора HER-2/Neu в клітинах лінії BC-BO.

Наявність експресії рецептора естрогену в клітинах лінії BC-LV (Рис. 3 А) і експресії рецептора прогестерону (Рис. 3 Б) та HER-2/Neu (Рис 3 В) в клітинах лінії BC-KS дозволяє нам віднести їх до люмінального молекулярного підтипу.

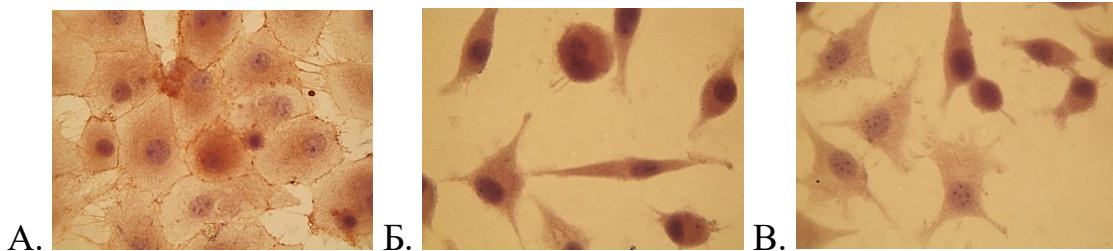


Рис. 3 Експресія рецептора естрогену в клітинах лінії BC-LV (А); експресія рецептора прогестерону та HER-2/Neu в клітинах лінії BC-KS.

3.2. Чутливість клітин РМЗ до мітогенної дії інсуліну

Однією із важливих характеристик пухлинних клітин вважається їх проліферативна активність. Відомо, що інсулін (ІНС) прямо та опосередковано стимулює синтез ДНК і білків в клітині. Біохімічний механізм впливу ІНС на проліферацію клітин заснований на анаболічній дії гормону, а також на регуляції процесів фосфорилювання, що відбувається шляхом активації та інгібування ферментних систем клітини. Це сприяє підвищенню проліферативної активності як нормальних, так і пухлинних клітин [81].

Всі дослідження було проведено в поживному середовищі з низьким вмістом сироватки (2%). Оскільки вона може вплинути на кінцевий результат дослідження, так як містить в своєму складі ІНС та інші фактори росту.

Було показано, що обробка клітин постійної лінії BC-ML інсуліном в концентраціях 5 мкг/мл та 0,5 мкг/мл, що відповідає умовам гіперінсулінемії, супроводжувалась статистично достовірним підвищенням проліферативної активності досліджуваних клітин на 15-30%, в порівнянні з контролем (клітини, які культивували без інсуліну). Нижчі концентрації гормону не впливали на проліферацію клітин BC-ML. Разом з тим, при культивуванні клітин лінії BCC/P в присутності таких же концентрацій інсуліну виявляли підвищення проліферації пухлинних клітин на 23%, в порівнянні з контролем,

лише при їх обробці гормоном у найвищій із досліджених концентрацій (5 мкг/мл). Варто відзначити, що жодна з досліджених концентрацій інсуліну статистично достовірно не вплинула на проліферативну активність клітин ліній BC-BO та BC-LV. Лише для клітин лінії BC-KS всі досліджені концентрації інсуліну спричиняють статистично достовірне збільшення кількості живих клітин на 20-35%, в порівнянні з контролем (Табл. 3.1)

Таблиця 3.1

Проліферативна активність клітин РМЗ людини нових ліній після їх культивування в присутності інсуліну людини

Концентрація інсуліну, мкг/мл	Назва лінії				
	BCC/P	BC-ML	BC-BO	BC-LV	BC-KS
	Кількість живих клітин, %				
5,0	122,7 ± 1,7*	131,7 ± 3,8*	113,8±1,9*	98,1±3,2	134,8±3,3*
0,5	111,9 ± 3,4	115,0 ± 2,3*	109,5±1,8	99,6±3,8	126,8±3,8*
0,02	101,5 ± 2,2	102,4 ± 6,3	99,2±1,9	112,0±3,1	120,1±3,0*
Контроль	100,0 ± 4,1	100,0 ± 3,8	100,0 ± 2,0	100,0 ± 3,2	100,0 ± 4,2

*Примітка: статистично достовірні відмінності в порівнянні з показниками контролю клітин, $p < 0,05$.

Отримані результати свідчать, що клітини більшості нових ліній РМЗ (4 із 5) характеризуються зниженою чутливістю до мітогенної активності ІНС і лише надмірна кількість гормону стимулює їх проліферацію.

3.3. Вплив інсуліну на метаболізм глюкози клітинами РМЗ людини нових ліній

Інсулін володіє цілим спектром біологічних ефектів і впливає на багато процесів у клітинах органів-мішеней, але найважливішу роль відіграє в регуляції вуглеводного обміну: основна біологічна функція інсуліну – регуляція рівня глюкози в крові. Інсулін – єдиний гормон, що знижує рівень глюкози в крові [82].

Одним з найпоширеніших типів онкологічних захворювань є РМЗ, механізм прогресування якого характеризується здатністю клітин до швидкого і неконтрольованого росту і розмноження. Таким чином, одну з ключових ролей, в процесах розвитку та прогресування РМЗ людини, відіграють різні фактори росту. Оскільки ІНС є відомим фактором росту, що впливає на всі тканини організму, його зв'язок з РМЗ людини є цілком логічним, хоча на сьогодні не вивченим в повній мірі.

Тому наступним етапом наших досліджень стало вивчення впливу ІНС на метаболізм глюкози клітинами РМЗ людини нових ліній.

Було показано, що лише у найвищій із досліджених концентрацій (5 мкг/мл) ІНС статистично достовірно посилює поглинання глюкози клітинами ВСС/Р на 26,8%, в порівнянні з контролем (Рис.3).

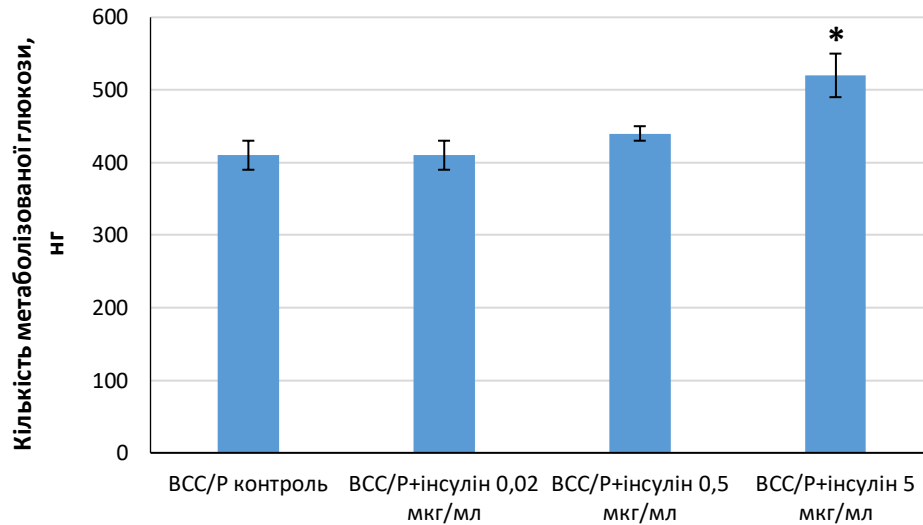


Рис.3 Кількість глюкози метаболізованої клітинами BSC/P після їх культивування в присутності ІНС. *Примітка: статистично достовірні відмінності в порівнянні з показниками контролю клітин, $p < 0,05$.

При оцінці впливу інсуліну на метаболізм глюкози клітинами ліній BC-ML, BC-BO та BC-LV було показано, що фізіологічна концентрація інсуліну (0,02 мкг/мл) не впливає на рівень спожитої глюкози досліджуваними клітинами, однак умови гіперінсулінемії (0,5-5 мкг/мл інсуліну) сприяли підвищенню кількості спожитої глюкози клітинами на 39-70%. Для клітин лінії BC-KS не спостерігався вплив фізіологічної концентрації ІНС (0,02 мкг/мл) на метаболічну активність клітин, однак, варто відмітити, значний вплив гіперінсулінемії (0,5-5 мкг/мл інсуліну) на цей показник, оскільки кількість метаболізованої глюкози збільшилась на 80-146% (Табл. 3.2).

Таблиця 3.2

Кількість метаболізованої глюкози клітинами РМЗ людини нових ліній після їх культивування в присутності інсуліну людини на поживному середовищі з низьким вмістом сироватки.

Лінія клітин	Концентрація інсуліну, мкг/мл			
	Контроль (0,0)	5,0	0,5	0,02
	Кількість метаболізованої глюкози нг/мл			
ВСС/Р	528,1 ± 41,0	788,2 ± 56,8* (↑ на 49,3%)	540,5 ± 37,5	553,3 ± 28,6
BC-ML	622,0 ± 47,3	911,0 ± 64,2* (↑ на 46,5%)	863,7 ± 43,8* (↑ на 38,9%)	618,7 ± 50,9
BC-BO	444,8 ± 44,8	746,8 ± 54,5* (↑ на 67,9%)	653,1 ± 26,5 * (↑ на 46,8%)	468,5 ± 35,7
BC-LV	149,1 ± 30,5	254,5 ± 32,6* (↑ на 70,7%)	220,3 ± 19,8* (↑ на 47,8%)	128,2 ± 39,0
BC-KS	201,5 ± 34,6	496,1 ± 31,0* (↑ на 146,2%)	361,6 ± 30,4* (↑ на 79,5%)	198,3 ± 40,9

*Примітка: статистично достовірні відмінності в порівнянні з показниками контролю клітин, $p < 0,05$.

Отже, отримані результати свідчать, що в клітинах РМЗ людини всіх досліджених ліній лише високі концентрації інсуліну, що відповідають умовам гіперінсулінемії, здатні підвищувати поглинання глюкози. Тобто, досліджені клітини мають знижену чутливість до дії інсуліну.

3.4. Продукція лактату в культуральному середовищі з клітин нових ліній РМЗ після їх культивування в присутності інсуліну.

Також, з метою вивчення метаболічного профілю досліджуваних клітин оцінювали продукцію ними лактату - побічного продукту анаеробного обміну, який служить джерелом енергії для пухлинних клітин.

Отримані результати показали, що лише в найвищій концентрації (5 мкг/мл) ІНС сприяв підвищенню рівня продукції лактату на 31,6%, в порівнянні з контролем, клітинами лінії ВС-KS.

В жодній з досліджених концентрацій ІНС не впливав на продукцію лактату клітинами ліній ВСС/Р, ВС-ML, ВС-BO, ВС-LV.

Таблиця 3.3

Продукція лактату клітинами РМЗ людини нових ліній після їх культивування в присутності інсуліну людини.

Лінія клітин	Концентрація інсуліну, мкг/мл			
	Контроль (0,0)	5,0	0,5	0,02
	Кількість лактату в культуральному середовищі ммоль/л			
ВСС/Р	5,05 ± 0,07	4,97 ± 0,07	4,95 ± 0,05	5,00 ± 0,06
ВС-ML	6,42 ± 0,06	6,57 ± 0,08	6,62 ± 0,06	6,44 ± 0,07
ВС-BO	6,27 ± 0,07	6,35 ± 0,06	6,19 ± 0,08	6,24 ± 0,06
ВС-LV	6,13 ± 0,05	5,8 ± 0,04* (↓ на 5,4%)	6,04 ± 0,05	6,07 ± 0,04
ВС-KS	2,09 ± 0,02	2,75 ± 0,08* (↑ на 31,6%)	2,26 ± 0,05* (↑ на 8,1%)	1,88 ± 0,02

*Примітка: статистично достовірні відмінності в порівнянні з показниками контролю клітин, $p < 0,05$.

Отже, статистично достовірне підвищення продукції лактату клітинами РМЗ лінії BC-KS на 31,6%, в порівнянні з контролем, спостерігали після їх обробки інсуліном у найвищій концентрації. Слід зазначити, що такі метаболічні зміни спостерігали саме в тих клітинах, що були найбільш чутливими до мітогенної дії гормону. В інших клітинних лініях інсулін суттєво не впливав на продукцію лактату.

3.5. Вплив інсуліну на посадочну ефективність клітин лінії BCC/P

Пухлинні клітини характеризуються високим ступенем автономності та аутокринною регуляцією росту – здатністю продукувати ростові фактори і деякі поживні речовини необхідні для їх існування. Посадочна ефективність пухлинних клітин є одним із показників їх злоякісності [83]. Цей показник обраховували оцінюючи кількість пухлинних клітин, що здатні утворювати проліферуючі колонії клітин на субстраті (пластиковий посуд для культури клітин) за умов їх висаджування у низькій концентрації (Рис.4, 5). Було показано, що короткотривала обробка клітин BCC/P ІНС (72 години) суттєво не впливала на показник колонієутворювальної активності (КУА) пухлинних клітин.

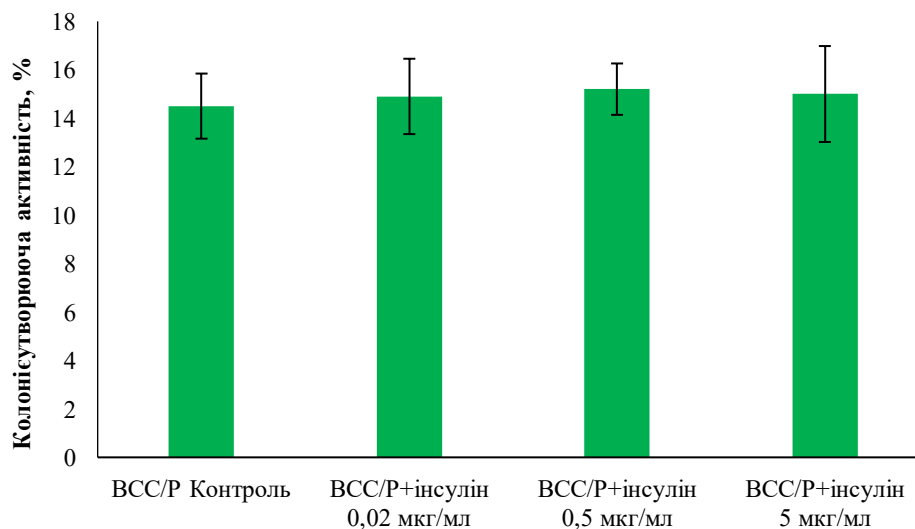


Рис.4 Короткотривалий вплив ІНС на посадочну ефективність клітин ВСС/Р (72 години обробки клітин ІНС)

Однак при обробці досліджуваних клітин ІНС в тих же концентраціях протягом 14 діб спостерігалась зміна показника КУА клітин ВСС/Р (Рис.5). Було показано, що лише найвища із досліджених концентрацій ІНС (5 мкг/мл) призводила до статистично достовірного підвищення КУА клітин ВСС/Р на 56%, в порівнянні з контролем.

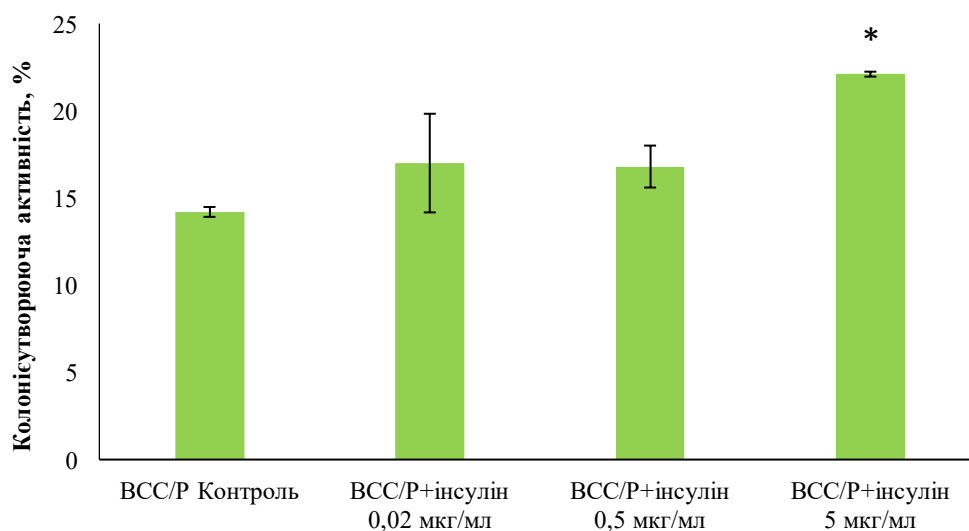


Рис.5 Зміни посадочної ефективності клітин ВСС/Р *in vitro* після їх культивування в присутності ІНС протягом 14 діб.

*Примітка: статистично достовірні відмінності в порівнянні з показниками контролю клітин, $p < 0,05$.

Отримані результати свідчать, що лише тривала обробка клітин ВСС/Р надмірною концентрацією ІНС призводила до підвищення їх автономності, і відповідно, злоякісності.

3.6. Аналіз впливу ІНС на міграційну активність клітин лінії ВСС/Р

Ще один важливий показник злоякісності пухлинних клітин – це їх здатність до міграції. Одним з найпростіших методів аналізу швидкості міграції клітин *in vitro* є scratch assay. Наші дослідження показали, що обробка клітин лінії ВСС/Р інсуліном в концентрації 0,02 мкг/мл та 0,5 мкг/мл не впливала на міграційну активність пухлинних клітин *in vitro* – в контрольній і цих експериментальних групах відновлення цілісності клітинного моношару спостерігали через 36 годин після його пошкодження. Однак, в групі клітин які культивували в присутності високої концентрації інсуліну (5 мкг/мл) спостерігали підвищення міграційної активності клітин ВСС/Р. Відновлення моношару фіксували вже через 24 години після нанесення «подряпини» (Рис.6). Такі зміни свідчать про підвищення злоякісності клітин ВСС/Р в умовах гіперінсулінемії.

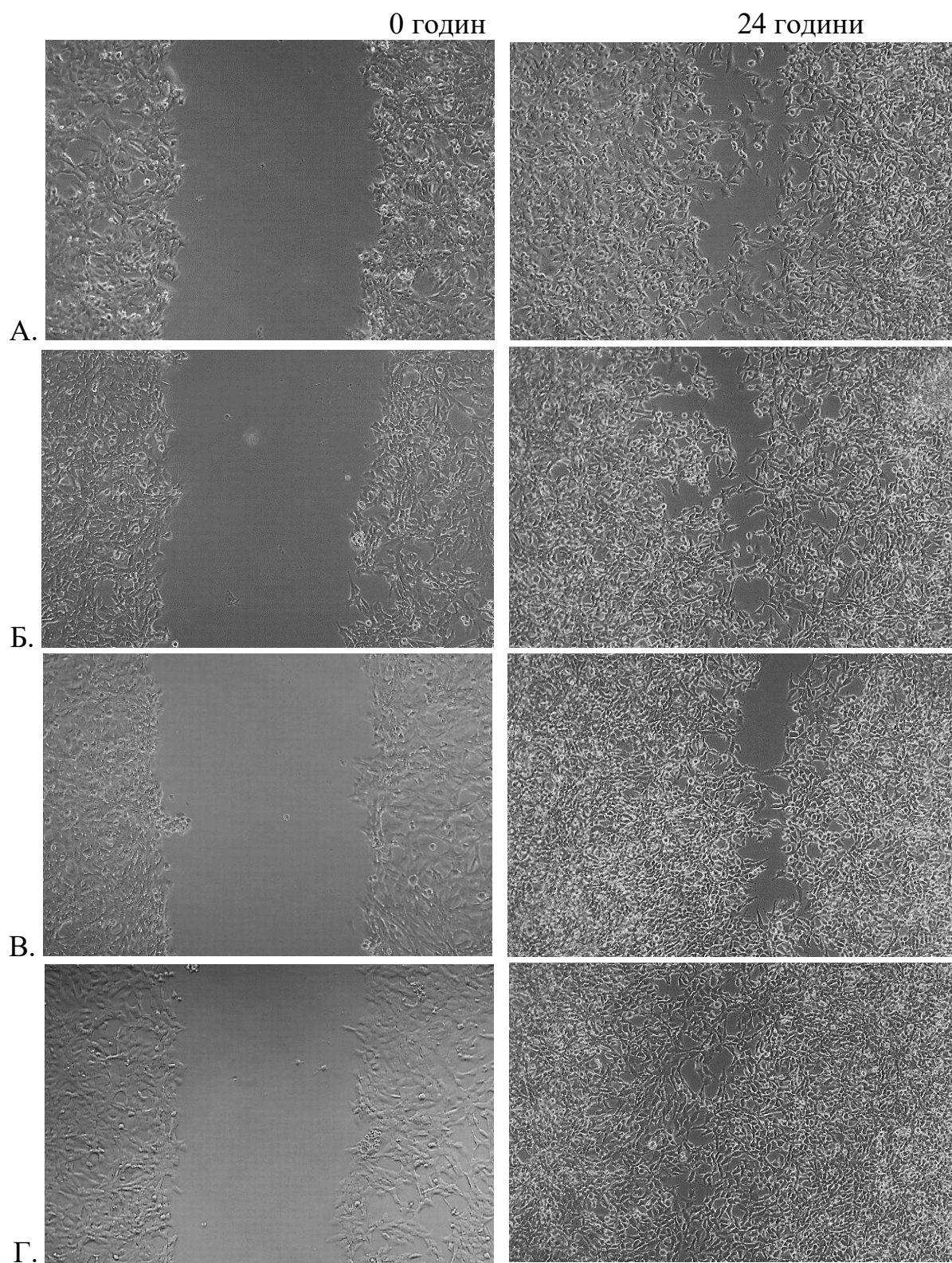


Рис.6 Аналіз міграційної активності клітин ВСС/Р *in vitro* методом scratch assay після їх культивування в присутності ІНС. – ВСС/Р контроль, Б. – ВСС/Р + ІНС 0,02 мкг/мл,

В. – ВСС/Р + ІНС 0,5 мкг/мл, Г. – ВСС/Р + ІНС 5 мкг/мл (збільшення x100).

3.7. Вплив інсуліну на експресію білків адгезії та цитоскелету в клітинах РМЗ людини лінії ВСС/Р

Підвищення проліферативної і міграційної активності, а також посадочної ефективності клітин ВСС/Р в умовах гіперінсулінемії дозволили нам припустити, що такі зміни біологічних властивостей пухлинних клітин супроводжуються змінами їх молекулярного фенотипу. Зокрема, було досліджено вплив ІНС на експресію білків міжклітинної адгезії (Е-кадгерин, β -катенін) і на білок цитоскелету – α -актин. Результати таких досліджень можуть пояснити деякі механізми, що забезпечують описані нами вище зміни біологічних властивостей клітин РМЗ.

Результати імуноцитохімічного аналізу показали, що обробка клітин ВСС/Р ІНС не спричиняла змін рівня експресії Е-кадгерину і β -катеніну, однак, призводила до статистично достовірного і дозозалежного підвищення експресії α -актину на 37,5% (0,5 мкг/мл) і 90,3% (5 мкг/мл), в порівнянні з контролем (Рис.7, 8).

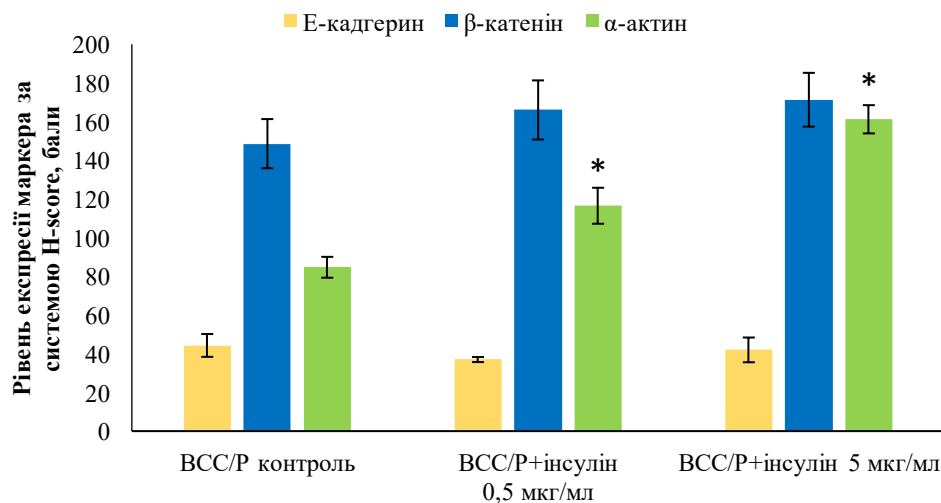


Рис. 7 Рівень експресії Е-кадгерину, β -катеніну і α -актину в клітинах лінії ВСС/Р після їх культивування в присутності ІНС.

*Примітка: статистично достовірні відмінності в порівнянні з показниками контролю клітин, $p < 0,05$.

Слід відмітити, що за системою H-score (бали) рівень експресії β -катеніну в контрольній і експериментальних групах не відрізнявся, однак, мікроскопічний аналіз клітин ВСС/Р виявив зміни експресії молекули в межах популяції: обробка клітин ІНС призводила до підвищення гетерогенності популяції клітин РМЗ за рівнем експресії β -катеніну (Рис.9).

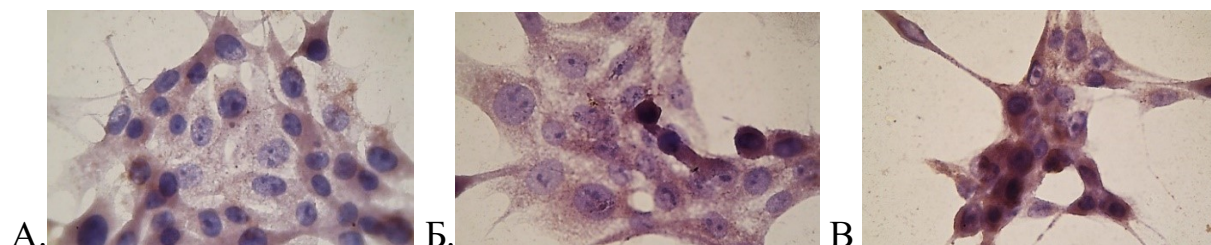


Рис.8 Зміни експресії α -актину в клітинах ВСС/Р в умовах гіперінсулінемії.
А. – ВСС/Р контроль, Б. – ВСС/Р + інсулін 0,5 мкг/мл, В. – ВСС/Р + інсулін 5 мкг/мл.

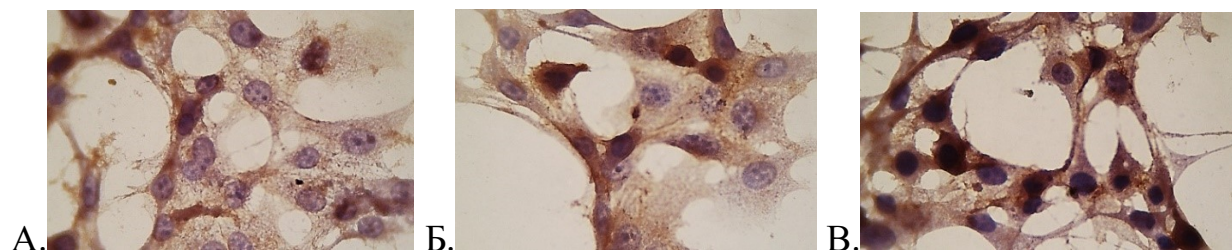


Рис.9 Зміни експресії β -катеніну в клітинах ВСС/Р в умовах гіперінсулінемії.
А. – ВСС/Р контроль, Б. – ВСС/Р + інсулін 0,5 мкг/мл, В. – ВСС/Р + інсулін 5 мкг/мл.

Підвищення експресії α -актину в клітинах ВСС/Р в умовах гіперінсулінемії свідчить про набуття ними більш мезенхімального і злоякісного фенотипу, що корелює зі змінами біологічних властивостей клітин РМЗ, які представлені вище: підвищення проліферативної, метаболічної і міграційної активності, збільшення посадочної ефективності.

3.8. Вплив інсуліну на експресію білків, асоційованих з метаболізмом глюкози в клітинах РМЗ людини

З метою пошуку можливих молекулярних механізмів і фенотипових змін в клітинах РМЗ, що активуються дією інсуліну, досліджували рівень експресії білків, асоційованих з метаболізмом глюкози, а також маркера диференціації пухлинних клітин. Всі досліджені маркери характеризують особливості метаболічного фенотипу клітин РМЗ, а також ступінь їх злоякісності. Зокрема, вивчали експресію Akt (протеїнкіназа PKB) – одного з ключових ферментів метаболізму глюкози і маркера диференціації CD44.

Протеїнкіназа B (Akt) в клітинах відіграє важливу роль в таких процесах, як транспорт і метаболізм глюкози, проліферація, міграція клітин, апоптоз і транскрипція [84-85]. Показано, що підвищена експресія Akt прямо пов'язана зі збільшенням швидкості метаболізму глюкози, що спостерігається в пухлинних клітинах [86].

Akt активується інсуліном та різними факторами росту та виживання [85]. Akt сприяє виживанню клітин шляхом інгібування апоптозу за допомогою фосфорилювання та інактивації кількох мішеней, включаючи Bad, c-Raf [87] та каспазу-9. Akt може також відігравати певну роль у стимуляції інсуліном процесу транспорту глюкози [88].

CD44 є добре відомою молекулою клітинної адгезії і опосередковує зчеплення клітин з позаклітинним матриксом [89]. Цей глікопротеїн бере участь у багатьох клітинних процесах, в тому числі в рості, виживанні, диференціюванні і рухливості [90, 91]. CD44 супресує апоптоз, що може відіграти ключову роль у розвитку пухлини товстої кишки і переході аденоми в рак, асоціюється з агресивною поведінкою пухлини [92, 93], пов'язаний з пухлинною прогресією. CD44, як і деякі інші молекули адгезії, можуть виступати в якості супресорів міграції пухлинних клітин [94]. У той

же час сплайс-варіанти CD44 або CD44 разом з іншими молекулами адгезії, такими як CD26, можуть привести до формування метастатичних фенотипів пухлинних клітин [95].

Методом імуноцитохімічного аналізу в клітинах РМЗ нових ліній дослідили експресію білків, асоційованих з метаболізмом глюкози. Було показано, що експресія Akt статистично достовірно підвищується в клітинах РМЗ у 1,5-2,5 рази лише після їх обробки інсуліном у найвищій із досліджених концентрацій (5,0 мкг/мл), причому підвищення експресії фермента корелювало з підвищенням проліферації пухлинних клітин у відповідних групах (Таблиця 3.4).

Так, результати дослідження впливу інсуліну на експресію Akt показали, що обробка клітин ліній ВСС/Р, ВС-МЛ і ВС-ВО найвищою із досліджених концентрацій ІНС призводить до статистично достовірного підвищення експресії цього маркера на 146-106%, відповідно, в порівнянні з контролем (Рис 10-12).

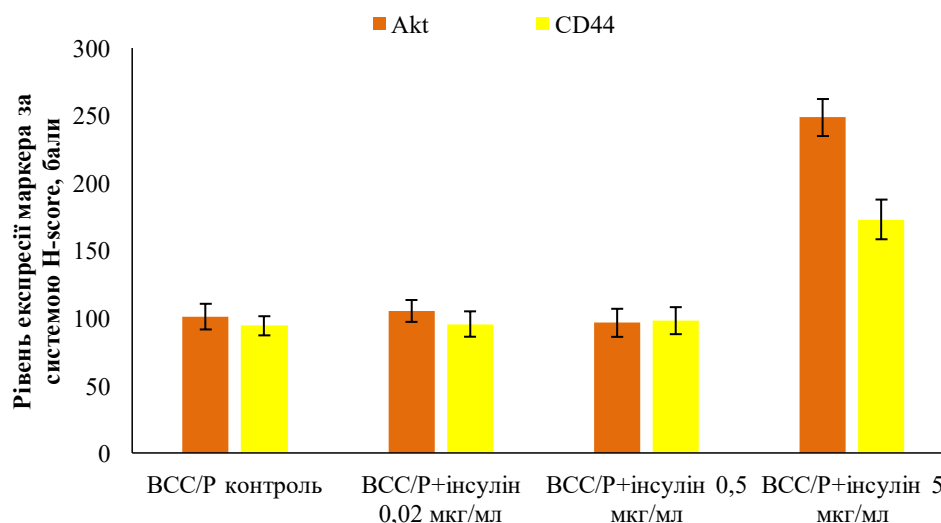


Рис. 10 Рівень експресії Akt і CD44 в клітинах лінії ВСС/Р після їх культивування в присутності ІНС.

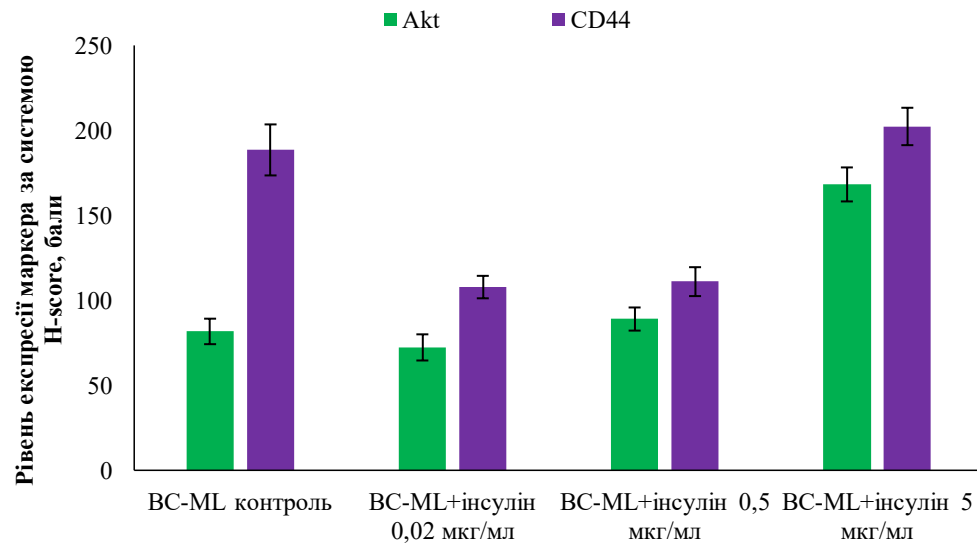


Рис. 11 Рівень експресії Akt і CD44 в клітинах лінії BC-ML після їх культивування в присутності ІНС.

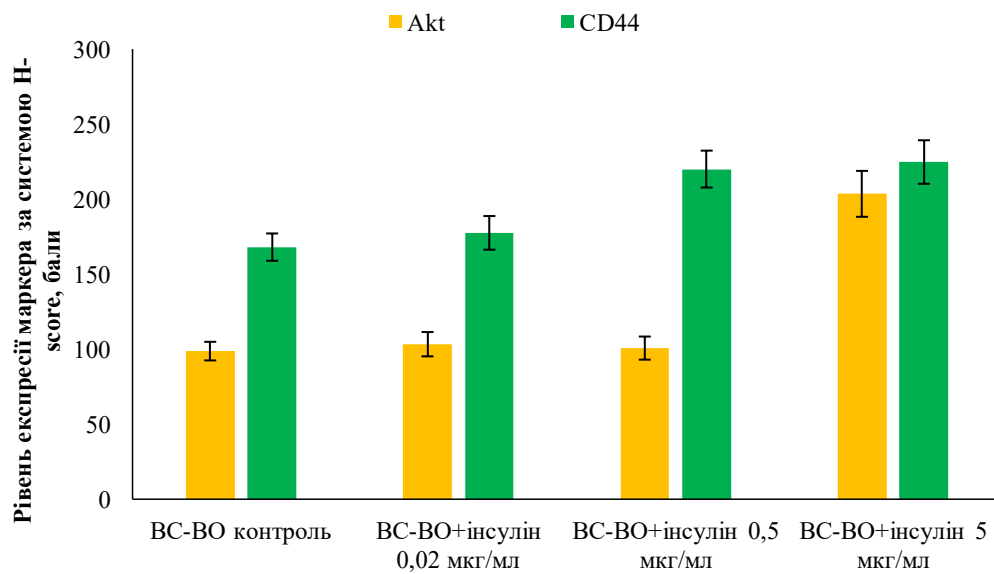


Рис. 12 Рівень експресії Akt і CD44 в клітинах лінії BC-BO після їх культивування в присутності ІНС.

Слід зазначити, що в клітинах лінії BC-LV гормон не впливав на експресію Akt (Рис.14), на відміну від клітин лінії BC-KS, де обробка клітин всіма дослідженими концентраціями ІНС, призводила до статистично достовірного підвищення базового рівня експресії фермента на 27,2-98,2%, в порівнянні з контролем. (Рис. 13)

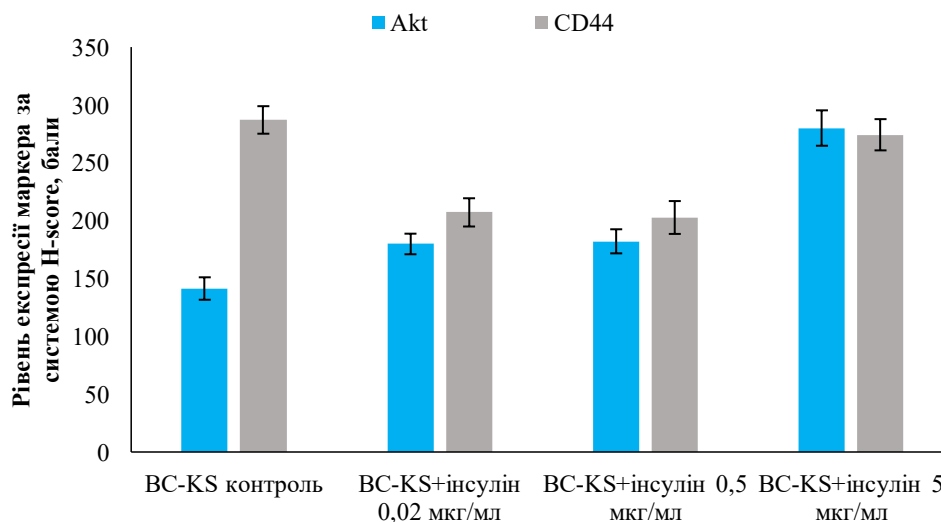


Рис. 13 Рівень експресії Akt і CD44 в клітинах лінії BC-KS після їх культивування в присутності ІНС.

У досліджених клітинних ліній BCC/P і BC-BO спостерігали статистично значуще підвищення експресії маркера диференціації CD44 на 83,7% і 106,2%, відповідно, після обробки клітин інсуліном у найвищій концентрації, що може свідчити про зниження ступеня їх диференціювання і підвищення рівня їх злоякісності (Рис.10, Рис. 12).

Цікаво, що в клітинах 2-х нових ліній (BC-ML і BC-KS) спостерігали статистично достовірне зниження рівня експресії CD44 на 27,8-42,8 % після їх обробки інсуліном в концентрації 0,5 і 0,02 мкг/мл (Рис. 11, Рис. 13). Отримані результати дозволяють припустити, що в цих клітинах інсулін ініціює процеси диференціювання.

Варто зазначити, що жодна з досліджених концентрацій інсуліну не вплинула на рівень експресії маркерів Akt та CD44 в клітинах лінії BC-LV (Рис. 12).

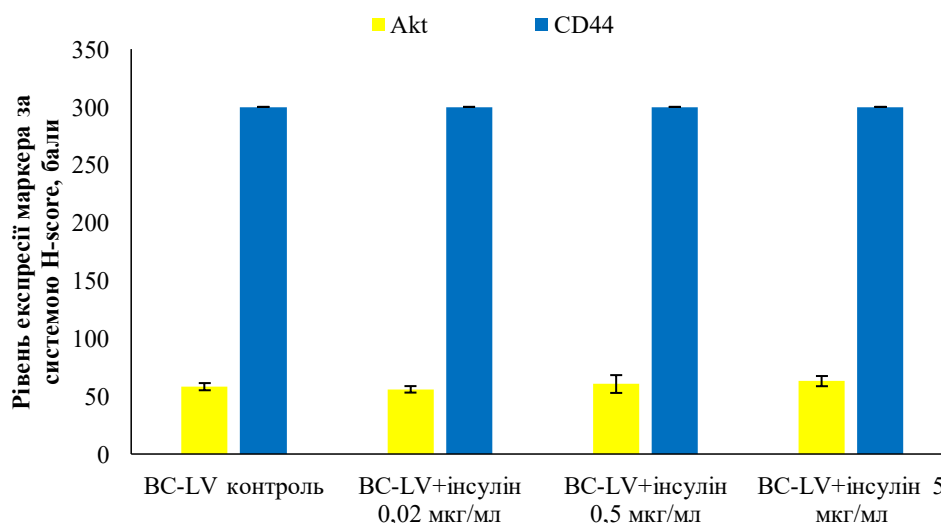


Рис. 14 Рівень експресії Akt і CD44 в клітинах лінії BC-KS після їх культивування в присутності ІНС.

Таблиця 3.4

Експресія білків, асоційованих з метаболізмом глюкози, клітинами РМЗ перинних ліній після їх культивування в присутності різних концентрацій інсуліну

Клітинна лінія	Концентрація інсуліну, мкг/мл	Експресія маркерів, H-score, бали (M±m)	
		Akt	CD44
BCC/P	Контроль (0,0)	101,0±9,5	94,2±7,1
	5,0	248,5±13,7*	173,0±14,7*
	0,5	96,4±10,4	98,0±10,0

Закінчення табл. 3.4

	0,02	105,2±8,1	96,5±9,4
BC-ML	Контроль (0,0)	81,7±7,5	188,5±15,0
	5,0	168,2±10,0*	202,3±11,0
	0,5	89,0±6,8	111,0±8,5*
	0,02	72,3±7,7	107,8±6,6*
BC-BO	Контроль (0,0)	98,7±6,2	168,0±9,1
	5,0	203,5±15,3*	224,7±14,5*
	0,5	100,7±7,7	220,0±12,3*
	0,02	103,3±8,1	177,5±11,2
BC-LV	Контроль (0,0)	58,2±3,1	300,0±0,0
	5,0	63,0±4,4	300,0±0,0
	0,5	60,5±5,7	300,0±0,0
	0,02	55,9±2,8	300,0±0,0
BC-KS	Контроль (0,0)	141,3±9,7	287,0±11,9
	5,0	280,0±15,3*	274,2±13,5
	0,5	182,1±10,4*	202,7±14,2*
	0,02	179,8±8,9*	207,1±12,2*

3.9. Вплив інсуліну на чутливість клітин РМЗ людини ліній ВСС/Р та ВС-МL до дії доксорубіцину

Проблема медикаментозної резистентності пухлинних клітин до дії цитостатиків досі не вирішена. Вагомим фактором, який впливає на злоякісність та чутливість до хіміопрепаратів пухлинних клітин виступає їх метаболічна активність. Саме ця їх характеристика забезпечує гетерогенність популяції злоякісних клітин, і як наслідок, появу в пухлині резистентних до медикаментозної терапії субклонів. Надзвичайно важливим учасником метаболічних процесів в клітині є ІНС. Відомо, що пацієнти з цукровим діабетом, головним клінічним проявом якого є інсулінорезистентність та, як наслідок, розвиток компенсаторної гіперінсулінемії, є більш схильними до розвитку злоякісних новоутворень ніж популяція в цілому. Окрім того, у пацієнтів з цукровим діабетом під час терапії протипухлинними засобами були зафіксовані випадки тяжкої гіперглікемії, що істотно знижували ефективність лікування [82].

Оцінка чутливості клітин ВСС/Р до дії протипухлинних препаратів свідчить, що IC50 для камптотецину на моделі клітин лінії ВСС/Р становить 28 мкг/мл, IC50 для препаратів платини становить 10 мкг/мл, а IC50 для доксорубіцину – 8 мкг/мл [75]. Оскільки клітини ВСС/Р виявились найбільш чутливими до дії доксорубіцину, саме цей цитостатик було обрано для подальшого вивчення впливу інсуліну на чутливість пухлинних клітин до дій протипухлинних препаратів.

З огляду на це, метою нашого подальшого дослідження став аналіз впливу ІНС в комплексі з ДНК-пошкоджуючим агентом доксорубіцином на життєздатність та проліферацію клітин РМЗ людини нових клітинних ліній ВСС/Р та ВС-МL *in vitro*.

Клітини лінії ВСС/Р культивували в присутності різних концентрацій інсуліну та доксорубіцину в монорежимі та за умов дії препаратів в комплексі. При одночасному культивуванні клітин ВСС/Р в присутності 8 мкг/мл доксорубіцину з інсуліном в найвищій з досліджених концентрацій чутливість клітин до цитотоксичної дії доксорубіцину знизилась і IC50 становило >8 мкг/мл, а при комплексному культивуванні з найнижчою з досліджених концентрацій ІНС (125 нг/мл) антипроліферативний ефект доксорубіцину не виявлено.

Таблиця 3.5

Життєздатність і проліферативна активність клітин РМЗ людини лінії ВСС/Р після їх культивування в присутності інсуліну і доксорубіцину в комплексі

Культивування за умови дії доксорубіцину в монорежимі	Назва сублінії	Культивування за умови дії препаратів в комплексі	Назва сублінії	Культивування за умови дії препаратів в комплексі	Назва сублінії
Концентрація доксорубіцину, мкг/мл	ВСС/Р	Концентрація інсуліну, нг/мл	Концентрація доксорубіцину, мкг/мл	ВСС/Р	Концентрація інсуліну, нг/мл
	Кількість живих клітин, %			Кількість живих клітин, %	
8	46,4 ± 4,2	4000,0	8	70,8 ± 1,7	125,0
4	63,1 ± 3,3	2000,0	4	81,3 ± 8,3	250,0
2	77,4 ± 3,3	1000,0	2	90 ± 2,5	500,0
1	86,1 ± 2,1	500,0	1	102,3 ± 3,8	1000,0
0,5	90,2 ± 4,0	250,0	0,5	105,8 ± 2,8	2000,0
0,25	93,4 ± 2,0	125,0	0,25	105,9 ± 0,2	4000,0

Встановлено, що культивування клітин ВСС/Р в присутності комплексу препаратів з доксорубіцину та високих концентрацій інсуліну призводить до суттєвого зниження антипроліферативної активності доксорубіцину.

В ході подальших досліджень було показано, що культивування клітин BC-ML в присутності доксорубіцину в концентраціях 8-0,5 мкг/мл призводило до пригнічення їх життєздатності та проліферації на 98-34%, в порівнянні з контрольними клітинами, і IC50 для доксорубіцину в монорежимі становило 0,6 мкг/мл. Комплексний вплив високих концентрацій ІНС та доксорубіцину в концентраціях IC80 і нижче на клітини BC-ML супроводжувався пригніченням цитотоксичного/цитостатичного ефектів протипухлинного препарату. Так, обробка клітин доксорубіцином в концентрації 0,5 мкг/мл в монорежимі призводила до загибелі 35% клітин BC-ML, однак в присутності великої кількості ІНС (250-500 нг/мл) цитостатик в такій самій концентрації не впливав на життєздатність пухлинних клітин. Також було показано, що показник IC50 за умов комплексної дії доксорубіцину та ІНС на клітинах BC-ML збільшувався в 1,8 разів і становив 0,9 мкг/мл.

Таблиця 3.6

Проліферативна активність клітин РМЗ людини ліній BC-ML після їх культивування в присутності доксорубіцину в монорежимі та за умови дії препаратів в комплексі

Культивування за умови дії доксорубіцину в монорежимі	Назва сублінії	Культивування за умови дії препаратів в комплексі		Назва сублінії	Культивування за умови дії препаратів в комплексі		Назва сублінії
Концентрація доксорубіцину, мкг/мл	BCC/P	Концентрація інсуліну, нг/мл	Концентрація доксорубіцину, мкг/мл	BCC/P	Концентрація інсуліну, нг/мл	Концентрація доксорубіцину, мкг/мл	BCC/P
	Кількість живих клітин, %			Кількість живих клітин, %			Кількість живих клітин, %
8	15,7 ± 2,4	4000,0	8	22,7 ± 3,2	31,25	8	17,2 ± 4,5
4	10,4 ± 1,6	2000,0	4	7,0 ± 1,8	62,5	4	5,3 ± 4,2

2	2,8 ± 1,3	1000,0	2	2,3 ± 0,5	125,0	2	3,0 ± 1,2
1	8,8 ± 1,3	500,0	1	37,6 ± 2,3	250,0	1	38,2 ± 11,8
0,5	65,7 ± 3,0	250,0	0,5	108,5 ± 2,3	500,0	0,5	98,0 ± 24,5
0,25	90,9 ± 5,0	125,0	0,25	128,8 ± 5,9	1000,0	0,25	91,2 ± 22,55
0,125	96,0 ± 4,0	62,5	0,125	82,8 ± 14,2	2000,0	0,125	79,7 ± 3,2
0,0625	69,1 ± 5,0	31,25	0,0625	86,4 ± 3,2	4000,0	0,0625	87,6 ± 10,6

Отримані результати свідчать, що в умовах гіперінсулінемії суттєво знижується чутливість клітин РМЗ лінії BC-ML до цитотоксичної/цитостатичної дії доксорубіцину.

ВИСНОВКИ

1. Показано, що клітини РМЗ людини нових ліній ВСС/Р та ВС-МЛ можна віднести до базального підтипу (тричі негативні); клітини лінії ВС-ВО можна віднести до HER2-позитивного молекулярного підтипу, а клітин лінії ВС-LV та ВС-KS – люмінального підтипу.
2. Культивування клітин лінії ВСС/Р в умовах гіперінсулінемії (5 мкг/мл ІНС) призводило до підвищення їх злоякісності: збільшення міграційної активності та підвищення посадочної ефективності на 56%, що корелює з підвищенням експресії маркера мезенхімальних клітин - α -актину на 90,3%.
3. За результатами досліджень показано, що клітини РМЗ людини нових ліній (ВСС/Р, ВС-МЛ, ВС-ВО, ВС-LV та ВС-KS) характеризуються зниженою чутливістю до мітогенної активності ІНС і лише надмірна кількість гормону стимулює їх проліферацію.
4. Спостерігалось підвищення експресії фермента Акт у 1,5-2,5 рази, після обробки клітин РМЗ інсуліном в найвищій концентрації, що корелювало з підвищенням проліферації пухлинних клітин.
5. Встановлено, що клітини РМЗ ліній ВСС/Р, ВС-МЛ, ВС-ВО, ВС-LV та ВС-KS характеризуються зниженою чутливістю до мітогенної активності інсуліну і лише надмірна кількість гормону (5 мкг/мл) стимулює їх проліферацію. Інсулін в найвищій з досліджених концентрацій (5 мкг/мл) стимулює підвищення експресії фермента Акт у 1,5-2,5 рази, що корелює з підвищенням проліферації пухлинних клітин. Разом з тим інсулін впливає на зниження ступеня диференціювання та підвищення злоякісності клітин ліній ВСС/Р і ВС-ВО оскільки після їх обробки інсуліном в концентрації 5 мкг/мл спостеріголось підвищення

експресії маркера диференціації CD44 на 83,7% і 106,2%, відповідно. Показано, що інсулін впливає на зниження ступеня диференціювання та на підвищення злоякісності клітин ліній ВСС/Р і ВС-ВО оскільки після їх обробки інсуліном в концентрації 5 мкг/мл спостеріголось підвищення експресії маркера диференціації CD44 на 83,7% і 106,2%, відповідно.

6. Показано, що в умовах гіперінсулінемії суттєво знижується чутливість клітин ліній ВСС/Р та ВС-ML до цитотоксичної/цитостатичної дії доксорубіцину.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Рак грудей в Україні: статистика захворювання [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://moz.gov.ua/article/health/chomu-vinikae-rak-grudej-i-jak-jogo-vijaviti>
2. Hanahan, D. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 2011, 5 (144): 646-674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
3. Newsholme EA, Dimitriadis G. Integration of biochemical and physiologic effects of insulin on glucose metabolism. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2001; 2(109): 122-34. doi: 10.1055/s-2001-18575.
4. Termini J. How diabetes can increase cancer risk: DNA damaged by high blood sugar. *ScienceDaily*. 2019: <https://www.sciencedaily.com/releases/2019/08/190825075932.htm>
5. Ariaans G, de Jong S, Gietema JA, Lefrandt JD, de Vries EGE, Jalving M. Cancer-drug induced insulin resistance: innocent bystander or unusual suspect. *Cancer Treat. Rev*. 2015, 41(4): 376-384. doi: 10.1016/j.ctrv.2015.02.007.
6. Barone BB, Yeh H-C, Snyder CF, Peairs KS, Stein KB, Derr RL. Long-term all-cause mortality in cancer patients with preexisting diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *JAMA*. 2008, 300(23): 2754-2764. doi: 10.1001/jama.2008.824.
7. Marik PE, Bellomo R. Stress hyperglycemia: an essential survival response! *Crit. Care*. 2013, 17:305. <https://doi.org/10.1186/cc12514>
8. Обмін вуглеводів. Ч. 1: методичний посібник з дисципліни «Біологічна хімія» для викладачів / К. В. Александрова, О. С. Шкода, О. Б. Макоїд [та ін.]. – Запоріжжя : [ЗДМУ], 2015. – 99 с
9. Демидова Т. Ю., Галиева О. Р. Профилактика и управление предиабетическими нарушениями углеводного обмена у больных с

метаболическим синдромом. *Ожирение и метаболизм*. 2007; 4(13): 19–24.

URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/profilaktika-i-upravlenie-prediabeticheskimi-narusheniyami-uglevodnogo-obmena-u-bolnyhs-metabolicheskim-sindromom>

10. Obunai K, Jani S, Dangas GD. Cardiovascular morbidity and mortality of the metabolic syndrome. *Med Clin North Am*. 2007, 91(6): 1169-1184. doi: 10.1016/j.mcna.2007.06.003.

11. National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation*. 2002, 106(25): 3143-421. PMID: 12485966.

12. Reaven GM. Banting lecture 1988: role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*. 1988, 37(12): 1595-1607. doi: 10.2337/diab.37.12.1595.

13. Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2003, 1: 5-20. PMID: 12502614.

14. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2010, 1: 62-69. doi: [10.2337/dc10-S062](https://doi.org/10.2337/dc10-S062)

15. Olokoba AB, Obateru OA, Olokoba LB. Type 2 diabetes mellitus: a review of current trends. *Oman Med J*. 2012, 27(4): 269-273. doi: [10.5001/omj.2012.68](https://doi.org/10.5001/omj.2012.68)

16. Щепотин И.Б., Зотов А.С., Любота Р.В., Аникусько Н.Ф., Любота И.И. Метаболический синдром как фактор прогноза течения рака грудной железы *Клин. онкология*. 2013, 2(10) <https://www.clinicaloncology.com.ua/article/8900/metabolicheskij-sindrom-kak-faktor-prognoza-techeniya-raka-grudnoj-zhelezy>

17. Щепотин И.Б., Зотов А.С., Любота И.И., Любота Р.В. Особенности течения инвазивного рака грудной железы у больных с метаболическим синдромом. *Клин. онкология*. 2011, 1(1): 50-54 <https://www.clinicaloncology.com.ua/article/424/osobennosti-techeniya-invazivnogo-raka-grudnoj-zhelezy-u-bolnyx-s-metabolicheskim-sindromom>
18. Щепотин И.Б., Зотов О.С., Любота И.И., Любота Р.В. Молекулярні механізми негативного впливу метаболічного синдрому на виникнення та прогноз перебігу РМЗ у жінок у постменопаузі. *Клінічна ендокринологія та ендокринна хірургія*. 2012, 3: 9-17 http://nbuv.gov.ua/UJRN/kee_2012_3_4
19. Kahn BB, Alquier T, Carling D, Hardie DG. AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab*. 2005; 1(1): 15-25. PMID: 16054041.
20. Любота Р.В., Чешук В.Є., Верещако Р.І., Зотов О.С., Анікусько М.Ф., Любота І.І. Ефективність застосування метформіну у хворих на рак грудної залози з метаболічним синдромом. *Клин. онкология*. 2016; 22(16) <https://www.clinicaloncology.com.ua/article/16328/efektivnist-zastosuvannya-metforminu-u-xvorix-na-rak-grudnoi-zalozi-z-metabolichnim-sindromom>
21. Janket S.J., Manson J.E., Sesso H. et al. A prospective study of sugar intake and risk of type 2 diabetes in women. *Diabetes Care*. 2003, 26(4): 1008–1015. <https://doi.org/10.2337/diacare.26.4.1008>
22. Gadi Shlomai, Brian Neel, Derek LeRoith, and Emily Jane Gallagher Type 2 Diabetes Mellitus and Cancer: The Role of Pharmacotherapy *J Clin Oncol*. 2016, 34(35): 4261-4269. doi: [10.1200/JCO.2016.67.4044](https://doi.org/10.1200/JCO.2016.67.4044)
23. Tsilidis KK, Kasimis JC, Lopez DS, et al. Type 2 diabetes and cancer: Umbrella review of meta-analyses of observational studies. *BMJ*. 2015, 350:g7607. doi: [10.1136/bmj.g7607](https://doi.org/10.1136/bmj.g7607)

24. Campbell PT, Newton CC, Patel AV, et al. Diabetes and cause-specific mortality in a prospective cohort of one million U.S. adults. *Diabetes Care*. 2012, 35(9):1835–1844. doi: 10.2337/dc12-0002
25. Harding JL, Shaw JE, Peeters A, et al. Cancer risk among people with type 1 and type 2 diabetes: Disentangling true associations, detection bias, and reverse causation. *Diabetes Care*. 2015, 38: 264-270. doi: 10.2337/dc14-1996.
26. Giovannucci E, Harlan DM, Archer MC, et al. Diabetes and cancer: A consensus report. *Diabetes Care*. 2010, 33(7): 1674–1685. doi: 10.2337/dc10-0666
27. Шепіль О.В., Висоцький А.Г., Сивак Л.А. Протипухлинна терапія хворих на цукровий діабет. *Клин. онкологія*. 2017, 4(28) <https://www.clinicaloncology.com.ua/article/19918/protipuxlinna-terapiya-xvorix-na-cukrovij-diabet>
28. Termini J. How diabetes can increase cancer risk: DNA damaged by high blood sugar. *ScienceDaily*. 2019, <https://www.sciencedaily.com/releases/2019/08/190825075932.htm>
29. Ройтберг Г.Е. Метаболический синдром. *МЕД-пресс-информ*. 2007: 224.
30. Ben Sahra I, Le Marchand-Brustel Y, Tanti JF, Bost F. Metformin in cancer therapy: a new perspective for an old antidiabetic drug? *Mol Cancer Ther*. 2010, 9(5):1092-9. doi: 10.1158/1535-7163.
31. Porta C., Paglino C., Mosca A. Targeting PI3K/Akt/mTOR Signaling in Cancer. *Fronti Oncol*. 2014, 4: 64. doi:10.3389/fonc.2014.00064.
32. Hattangady NG., Rajadhyaksha MS. A brief review of in vitro models of diabetic neuropathy. *Int J Diabetes Dev Ctries*. 2009, 29(4): 143-9. doi: [10.4103/0973-3930.57344](https://doi.org/10.4103/0973-3930.57344) PMID: [20336195](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20336195/)

33. Кологривова И. В. Влияние инсулина и глюкозы *in vitro* на функциональную активность Т-хелперов-17 при сахарном диабете 2-го типа. *СМЖ*. 2013, 2: 99-103. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/vliyanie-insulina-i-glyukozy-in-vitro-na-funktsionalnuyu-aktivnost-t-helperov-17-pri-saharnom-diabete-2-go-tipa>
34. Кологривова И. В., Суслова Т. Е., Кошельская О. А., Винницкая И. В., Трубачева О. А. Влияние глюкозы и инсулина на секрецию цитокинов мононуклеарами периферической крови *in vitro*. *Иммунология*. 2013, 5: 267-270. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/vliyanie-glyukozy-i-insulina-na-sekretsiyu-tsitokinov-mononuklearami-perifericheskoy-krovi-in-vitro>
35. Okajima T, Nakamura K, Zhang H, Ling N, Tanabe T, Yasuda T, Rosenfeld RG. Sensitive colorimetric bioassays for insulin-like growth factor (IGF) stimulation of cell proliferation and glucose consumption: use in studies of IGF analogs. *Endocrinology*. 1992, 130(4): 2201-212. DOI: [10.1210/endo.130.4.1372238](https://doi.org/10.1210/endo.130.4.1372238)
36. Kappel C C, Velez-Yanguas M C, Hirschfeld S, Helman L J. Human osteosarcoma cell lines are dependent on insulin-like growth factor I for *in vitro* growth. *Cancer Research*. 1994, 54: 2803-2807. PMID: 8168113
37. Anders F, Karlsson C, Grunfeld C, Kahn R, Roth J. Regulation of insulin receptors and insulin responsiveness in 3T3-L1 fatty fibroblasts. *Endocrinology*. 1979, 104(5): 1383–1392. <https://doi.org/10.1210/endo-104-5-1383>
38. Assimacopoulos-Jeannet F, Brichard S, Rencurel F, Cusin I, Jeanrenaud B. *In vivo* effects of hyperinsulinemia on lipogenic enzymes and glucose transporter expression in rat liver and adipose tissues. *Metabolism: Clinical and Experimental*. 1995, 44(2): 228-233. DOI: [10.1016/0026-0495\(95\)90270-8](https://doi.org/10.1016/0026-0495(95)90270-8)
39. Okajima T, Nakamura K, Zhang H, Ling N, Tanabe T, Yasuda T, Rosenfeld RG. Sensitive colorimetric bioassays for insulin-like growth factor (IGF)

- stimulation of cell proliferation and glucose consumption: use in studies of IGF analogs. *Endocrinology*. 1992, 130(4): 2201-212. DOI: [10.1210/endo.130.4.1372238](https://doi.org/10.1210/endo.130.4.1372238)
40. Peairs KS, Barone BB, Snyder CF, et al. Diabetes mellitus and breast cancer outcomes: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Oncol*. 2011, 29(1): 40–46. DOI: [10.1200/JCO.2009.27.3011](https://doi.org/10.1200/JCO.2009.27.3011)
 41. Pandey A, Forte V, Abdallah M, et al. Diabetes mellitus and the risk of cancer. *Minerva Endocrinol*. 2011, 36(3): 187–209. doi:10.1001/archinte.166.17.1871
 42. Hou Y, Zhou M, Xie J, Chao P, Feng Q, Wu J. High glucose levels promote the proliferation of breast cancer cells through GTPases. *Breast Cancer*. 2017, 13(9): 429-436. doi: 10.2147/BCTT.S135665. PMID: 28670141;
 43. Normanno N, De Luca A, Bianco C, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene*. 2006, 366(1): 2–16. DOI: [10.1016/j.gene.2005.10.018](https://doi.org/10.1016/j.gene.2005.10.018)
 44. Sun XF, Shao YB, Liu MG, Chen Q, Liu ZJ, Xu B, Luo SX, Liu H. High-concentration glucose enhances invasion in invasive ductal breast carcinoma by promoting Glut1/MMP2/MMP9 axis expression. *Oncol Lett*. 2017, 13(5): 2989-2995. doi: 10.3892/ol.2017.5843. PMID: 28521406
 45. Chen Z, Meng Z, Jia L and Cui R: The tumor microenvironment and cancer. *Biomed Res Int* 2014: 573947. DOI: [10.1155/2014/573947](https://doi.org/10.1155/2014/573947)
 46. Adham SA, Al Rawahi H, Habib S, Al Moundhri MS, Vilorio-Petit A and Coomber BL: Modeling of hypo/hyperglycemia and their impact on breast cancer progression related molecules. *PLoS One*. 2014, 9(11): e113103.. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113103>
 47. Yang W and Lu Z: Nuclear PKM2 regulates the Warburg effect. *Cell Cycle* 2013; 12(19): 3154-3158. doi: [10.4161/cc.26182](https://doi.org/10.4161/cc.26182)

48. Govers R: Cellular regulation of glucose uptake by glucose transporter GLUT4. *Adv Clin Chem.* 2014, 66: 173-240. DOI: [10.1016/b978-0-12-801401-1.00006-2](https://doi.org/10.1016/b978-0-12-801401-1.00006-2)
49. McKinnon B, Bertschi D, Wotzkow C, Bersinger NA, Evers J and Mueller MD: Glucose transporter expression in eutopic endometrial tissue and ectopic endometriotic lesions. *J Mol Endocrinol.* 2014, 52: 169-179. <https://doi.org/10.1530/JME-13-0194>
50. Osugi J, Yamaura T, Muto S, Okabe N, Matsumura Y, Hoshino M, Higuchi M, Suzuki H and Gotoh M: Prognostic impact of the combination of glucose transporter 1 and ATP citrate lyase in node-negative patients with non-small lung cancer. *Lung cancer.* 2015; 88: 310-318. DOI: [10.1016/j.lungcan.2015.03.004](https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2015.03.004)
51. Nam SO, Yotsumoto F, Miyata K, Fukagawa S, Yamada H, Kuroki M and Miyamoto S: Warburg effect regulated by amphiregulin in the development of colorectal cancer. *Cancer Med.* 2015, 4(4): 575-587. doi: [10.1002/cam4.416](https://doi.org/10.1002/cam4.416)
52. Wenjie L, Xuehui Z, Hui S. Effects of hyperglycemia on the progression of tumor diseases *J Exp Clin Cancer Res.* 2019, 38: 327. doi: [10.1186/s13046-019-1309-6](https://doi.org/10.1186/s13046-019-1309-6) PMID: [31337431](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31337431/)
53. Marusyk A., Polyak K. Tumor heterogeneity: causes and consequences. *Biochim Biophys Acta.* 2010, 1805(1): 105–117, <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2009.11.002>.
54. Masson N., Ratcliffe P.J. Hypoxia signaling pathways in cancer metabolism: the importance of co-selecting interconnected physiological pathways. *Cancer Metab.* 2014, 2(1): 3. <https://doi.org/10.1186/2049-3002-2-3>.
55. Solaini G., Baracca A., Lenaz G., Sgarbi G. Hypoxia and mitochondrial oxidative metabolism. *Biochim Biophys Acta.* 2010, 1797(6–7): 1171–1177, <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2010.02.011>.

56. Warburg O., Wind F., Negelein E. The metabolism of tumors in the body. *J Gen Physiol* 1927, 8(6): 519–530, <https://doi.org/10.1085/jgp.8.6.519>.
57. Zheng J. Energy metabolism of cancer: glycolysis versus oxidative phosphorylation (review). *Oncol Lett* 2012, 4(6): 1151–1157, <https://doi.org/10.3892/ol.2012.928>.
58. Diaz-Ruiz R., Rigoulet M., Devin A. The Warburg and Crabtree effects: on the origin of cancer cell energy metabolism and of yeast glucose repression. *Biochim Biophys Acta*. 2011, 1807(6): 568–576, <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.08.010>.
59. Cairns R.A., Harris I.S., Mak T.W. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer* 2011, 11(2): 85–95, <https://doi.org/10.1038/nrc2981>.
60. Georgakoudi I., Quinn K.P. Optical imaging using endogenous contrast to assess metabolic state. *Annu Rev Biomed Eng* 2012, 14: 351–367, <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071811-150108>.
61. Lunt S.Y., Vander Heiden M.G. Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2011, 27: 441–464, <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154237>.
62. Cantor J.R., Sabatini D.M. Cancer cell metabolism: one hallmark, many faces. *Cancer Discov*. 2012, 2(10): 881–898, <https://doi.org/10.1158/2159-8290.cd-12-0345>.
63. Fogal V., Richardson A.D., Karmali P.P., Scheffler I.E., Smith J.W., Ruoslahti E. Mitochondrial p32 protein is a critical regulator of tumor metabolism via maintenance of oxidative phosphorylation. *Mol Cell Biol*. 2010, 30(6): 1303–1318, <https://doi.org/10.1128/MCB.01101-09>.
64. Berridge M.V., Herst P.M., Tan A.S. Metabolic flexibility and cell hierarchy in metastatic cancer. *Mitochondrion*. 2010, 10(6): 584–588, <https://doi.org/10.1016/j.mito.2010.08.002>.

65. Sengupta D., Pratz G. Imaging metabolic heterogeneity in cancer. *Mol Cancer* 2016, 15: 4, <https://doi.org/10.1186/s12943-015-0481-3>.
66. Hanahan D., Weinberg R.A. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000, 100: 57–70. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)
67. Yip CH, Rhodes A. Estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Future Oncol*. 2014, 10(14) :2293-301. doi: 10.2217/fon.14.110
68. Metabolic Syndrome Ups Colorectal Cancer Risk. [Электронный ресурс] : Режим доступа: <http://www.sciencedaily.com/releases/2008/10/081006092654.htm>
69. Pelucchi C, Negri E, Talamini R. Metabolic syndrome is associated with colorectal cancer in men. *Eur J Cancer*. 2010, 46(10): 1866-1872. doi:10.1016/j.ejca.2010.03.010
70. Rosato V, Tavani A, Bosetti C [et al.] Metabolic syndrome and pancreatic cancer risk: a case-control study in Italy and meta-analysis. *Metabolism*. 2011; 60(10): 1372-1378. doi: 10.1016/j.metabol.2011.03.005.
71. Ma J., Li H., Giovannucci E. [et al.] Prediagnostic body-mass index, plasma C-peptide concentration, and prostate cancer-specific mortality in men with prostate cancer: a long-term survival analysis. *The Lancet Oncology*. 2008, 9(11): 1039-1047. doi: 10.1016/S1470-2045(08)70235-3.
72. Vona-Davis L., Howard-McNatt M., Rose Vona-Davis D.P. Adiposity, type 2 diabetes and the metabolic syndrome in breast cancer. *Obes Rev*. 2007, 8(5): 395-408.
73. Zhang D., Fei Q., Li J. and other. 2-Deoxyglucose Reverses the Promoting Effect of Insulin on Colorectal Cancer Cells *In Vitro*. *PLoS One*. 2016; 11(3) doi:10.1371/journal.pone.0151115

74. Lu C., Chu P., Hsia S., Wu C., Tung Y. Insulin induction instigates cell proliferation and metastasis in human colorectal cancer cell. *Internation. J. of Oncol.* 2017, 50(2): 736-744. <https://doi.org/10.3892/ijo.2017.3844>
75. Bezdieniezhnykh N., Lykhova A., Semesiuk N., Okhrimenko R., Kudryavets Yu. Establishment and characterization of new breast and ovarian cancer cell lines as a model for studying cellular plasticity *in vitro*. *Exp Oncol.* 2016, 38(2): 94–100.
76. Фрешни Р.Я. Культура животных клеток. *Практическое руководство*. 2010; Бином ЛЗ: 691 с.
77. Fedoroff S., Richardson A. Colony Cultures: Plating Efficiency Assay and Cloning. *Springer protocols*. 2001, 23: 307-315.
78. Liang C., Park A., Guan J. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc.* 2007, 2(2): 329-333. DOI: [10.1038/nprot.2007.30](https://doi.org/10.1038/nprot.2007.30)
79. Detre S. A "quickscore" method for immunohistochemical semiquantitation: validation for oestrogen receptor in breast carcinomas. *Clin Pathol.* 1995, 48: 876-878.
80. Tang P., Skinner K.A., Hicks D.G. Molecular classification of breast carcinomas by immunohistochemical analysis: are we ready? *Diagn Mol Pathol.* 2009, 18(3): 125-132. DOI: [10.1097/pdm.0b013e31818d107b](https://doi.org/10.1097/pdm.0b013e31818d107b)
81. McDermott M, Eustace AJ, Busschots S, Breen L, Crown J, Clynes M, O'Donovan N and Stordal B In vitro development of chemotherapy and targeted therapy drug-resistant cancer cell lines: a practical guide with case studies. *Frontiers in oncology*. 2014, 40(4): 2-16. DOI: [10.3389/fonc.2014.00040](https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00040)
82. DueC, LinnetK, Langeland Johansen N, Olsson L. Analysis of insulin receptors on heterogeneous eukaryotic cell populations with fluorochrome-conjugated insulin and fluorescence-activated cell sorter. Advantages and

- limitations to the 125I-labelled insulin methodology. *Diabetologia*. 1985, 28(10): 749-755. DOI: [10.1007/BF00265023](https://doi.org/10.1007/BF00265023)
83. Chigira M., Noda K., Watanabe H. Autonomy in tumor cell proliferation. *Medical Hypotheses*. 1990, 32(4): 249-254. [https://doi.org/10.1016/0306-9877\(90\)90101-J](https://doi.org/10.1016/0306-9877(90)90101-J)
84. Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC. PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell*. 1997, 88(4):435-7. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81883-8. PMID: 9038334.
85. Wielenga V., Van der Neut R., Offerhaus G. et al. (2000) CD44 glycoproteins in colorectal cancer: expression, function, and prognostic value. *Adv. Cancer Res.*, 77: 169–87. DOI: [10.1016/s0065-230x\(08\)60787-3](https://doi.org/10.1016/s0065-230x(08)60787-3)
86. J L Coloff, J C Rathmell. Metabolic regulation of Akt: roles reversed. *J Cell Biol*. 2006. 175(6): 845–847 PMID: 17158959
87. Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC. PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell*. 1997, 88(4): 435-7. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81883-8. PMID: 9038334.
88. Burgering BM, Coffey PJ. Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature*. 1995, 376(6541): 599-602. doi: 10.1038/376599a0. PMID: 7637810.
89. Zimmermann S, Moelling K. Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (protein kinase B). *Science*. 1999, 286(5445): 1741-4. doi: 10.1126/science.286.5445.1741. PMID: 10576742.
90. Hajduch E, Litherland GJ, Hundal HS. Protein kinase B (PKB/Akt)--a key regulator of glucose transport? *FEBS Lett*. 2001, 492(3): 199-203. doi: 10.1016/s0014-5793(01)02242-6. PMID: 11257494.

91. Cheng C., Sharp P. Regulation of CD44 alternative splicing by SRm160 and its potential role in tumor cell invasion. *Mol. Cell. Biol.* 2006, 26(1): 362–370. doi: [10.1128/MCB.26.1.362-370.2006](https://doi.org/10.1128/MCB.26.1.362-370.2006)
92. Nagano O., Saya H. Mechanism and biological significance of CD44 cleavage. *Cancer Sci.* 2004, 95(12): 930–5. DOI: [10.1111/j.1349-7006.2004.tb03179.x](https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2004.tb03179.x)
93. Aruffo A., Stamenkovic I., Melnick M. et al. CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell.* 1990, 61(7): 1303–1313. DOI: [10.1016/0092-8674\(90\)90694-a](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90694-a)
94. Gao A., Lou W., Dong J. et al. (1997) CD44 is a metastasis suppressor gene for prostatic cancer located on human chromosome 11p13. *Cancer Res.*, 57: 846–849. PMID: 9041184
95. Pang R., Law W., Chu A. et al. (2010) A subpopulation of CD26+ cancer stem cells with metastatic capacity in human colorectal cancer. *Cell. Stem. Cell.* 2010, 6(6): 603–15. DOI: [10.1016/j.stem.2010.04.001](https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.04.001)