

**В.І. Римар¹,
Е.О. Стаховський²,
О.А. Кононенко²,
В.І. Кашуба¹**

¹ Інститут молекулярної біології
і генетики НАН України,

² Державне некомерційне
підприємство “Національний
інститут раку”, Київ, Україна

Ключові слова: метаболічна
стратегія терапії, світло-
клітинна ниркова карцинома,
гени із зниженою експресією,
метаболічні ферменти, кро-
сплатформна нормалізація,
мікроареї.

DOI: <https://doi.org/10.15407/oncology.2024.04.275>

ПОШУК ТАРГЕТНИХ ГЕНІВ ДЛЯ НОВИХ МЕТАБОЛІЧНИХ СТРАТЕГІЙ ТЕРАПІЇ ПУХЛИН НИРКИ

Мета: пошук генів, що кодують метаболічні ферменти, зі зниженою експресією в різних типах пухлин нирки з метою розробки нових метаболічних стратегій терапії раку нирки. **Об'єкт і методи:** 20 пар зразків тканини світлоклітинних карцином нирки і нормальної прилеглої тканини. DataSet і Series файли результатів мікроареїв, що містять дані експресії генів в різних типах пухлин нирки та нормальній тканині. За допомогою методу порівняння результатів мікроареїв з використанням кросплатформної нормалізації по декількох референтних генах, проводився пошук генів, що кодують метаболічні ферменти, експресія яких знижується в різних типах пухлин нирки. Експресію деяких з цих генів (ALDOB, ASS1, DAO, HPD і PAH) в світлоклітинній карциномі нирок перевіряли методом ЗТ-ПЛР в реальному часі. **Результати:** використовуючи метод порівняння результатів мікроареїв із застосуванням кросплатформної нормалізації по декількох референтних генах, було знайдено 7 генів що знижують експресію в різних типах пухлин нирок і можуть бути використані для розробки нових метаболічних стратегій терапії раку нирки. Ферменти, що кодуються цими генами беруть участь в метаболізмі амінокислот (ACY1, ASS1, DAO, PAH, HPD, PIPOX) та гліколізі (ALDOB). Зниження експресії ASS1, ALDOB, DAO, HPD і PAH в тканині світлоклітинної карциноми нирки підтверджено методом ЗТ-ПЛР в реальному часі. **Висновок:** зважаючи на недостатню ефективність монотерапії, використання декількох метаболічних стратегій терапії пухлин нирки може дати набагато кращі результати, особливо в поєднанні з іншими традиційними методами лікування. Для збільшення кількості протипухлинних мішеней до знайдених генів можна додати і гени що збільшують експресію, а також гени, зміна експресії яких, характерна для конкретного типу пухлини. Створивши панель можливих мішеней і провівши аналіз експресії генів в конкретного пацієнта можна перейти до персоналізованої метаболічної стратегії терапії пухлин нирки.

Рак нирки є третьою найбільш поширеною урологічною пухлиною після раку простати і сечового міхура. Карцинома нирки (renal cell carcinoma, RCC) виникає з ниркового епітелію і становить понад 90% усіх злоякісних пухлин нирки [1]. Незважаючи на значне поширення пухлин нирки, на сьогодні не існує ефективних методів лікування. П'ятирічна виживаність пацієнтів, у яких пухлини нирки виявлені на ранній стадії (TNM стадія I), складає 96%. Однак, у пацієнтів, які звертаються з пізньою стадією захворювання (TNM стадія IV), п'ятирічна виживаність складає лише 26% [2]. Незважаючи на існування різних гістологічних підтипів, більшість форм RCC характеризуються спільними шляхами дерегуляції метаболізму. Залежність від аеробного гліколізу є спільною рисою спорадичних та спадкових форм раку нирки. Ця властивість може зробити їх уразливими до нових

метаболічних стратегій, включаючи інгібування гліколізу, глюкози і біосинтезу макромолекул [3].

Гліколіз є багатоступеневим процесом, в якому глюкоза перетворюється в піруват. В найбільш диференційованих тканинах людини за участю фермента піруватдегідрогенази (pyruvate dehydrogenase, PDH) відбувається окиснення пірувата до ацетил-КоА, який відіграє важливу роль в мітохондріальному циклі Кребса, що забезпечує виробництво АТФ через окисне фосфорилування. За відсутності кисню, клітини здатні генерувати АТФ, хоча і менш ефективно, шляхом перетворення пірувату в лактат за допомогою лактатдегідрогенази (lactate dehydrogenase, LDH). Отто Варбург вперше відзначив, що, в порівнянні з нормальними клітинами, ракові клітини споживають велику кількість глюкози і утворюють лактат навіть у присутності кисню (аеробний гліколіз). Це явище було

названо “ефектом Варбурга” [3]. Ефект Варбурга в світлоклітинній карциномі нирки (clear cell renal cell carcinoma, ccRCC) пов’язаний з активацією HIF1a (фактору, індукованого гіпоксією), що призводить до збільшення рівня гліколізу і зменшення мітохондріального дихання. HIF1a забезпечує аеробний гліколіз шляхом збільшення активності гліколітичних генів, включаючи *GLUT1*, *HK*, *PFK*, *ENO2*, *PKM2*, *LDHA* і *MCT4*. HIF1a блокує цикл трикарбонових кислот (ЦТК) шляхом активації кінази PDK1, яка фосфорилує та інгібує піруватдегідрогеназу PDH (ключовий фермент, що регулює перетворення пірувату в ацетил-КоА). HIF1a може також пригнічувати ЦТК і окисне фосфорилування шляхом активації мікроРНК-210. Ця мікро-РНК інгібує ISCU1 і ISCU2, білки, які синтезують залізо-сірчані кластери, що є ключовими простетичними групами в ферментних комплексах і мають вирішальне значення в ЦТК та окисному фосфорилуванні [4]. На основі цих даних були запропоновані, і в даний час оцінюються в доклінічних / клінічних дослідженнях, препарати, які впливають на важливі етапи аеробного гліколізу.

Клітинне поглинання глюкози регулюється трансмембранними рецепторами GLUT. Пухлинні клітини часто посилюють експресію *GLUT1* для збільшення поглинання глюкози, що є особливо важливим для клітин, які залежать від аеробного гліколізу. Інгібування цього процесу може перешкоджати проліферації клітин через недостатність глюкози. Недавні дослідження показали, що використання синтетичних препаратів (наприклад STF-31), які інгібують *GLUT1*, проти VHL-дефіцитних клітинних ліній ccRCC має значний терапевтичний потенціал. Інгібітори трансмембранних рецепторів глюкози знаходяться у стадії розробки [5].

LDH каталізує оборотне перетворення лактату до пірувату. LDH існує у двох основних ізоформах, одна з яких — LDH-A — сприяє перетворенню пірувату в лактат. При інгібуванні експресії лактатдегідрогенази LDH-A відбувається стимуляція мітохондріального дихання. Це обмежує здатність пухлинних клітин до проліферації при гіпоксії. Туморогенність LDH-A-дефіцитних клітин сильно зменшується. Інгібування LDH-A може бути використано для розробки засобів протипухлинної терапії [6].

Гексокінази 1–3 (hexokinase, HK) — ферменти, що беруть участь у гліколізі і каталізують фосфорилування глюкози в глюкозо-6-фосфат. 2-дезоксид-глюкоза (2DG) є аналогом глюкози, поглинається клітинами за допомогою тих же механізмів, що і глюкоза. Потрапивши в клітину, 2DG фосфорилується гексокіназами, утворений метаболіт не є субстратом глюкозо-6-фосфат-ізомераз. Накопичення фосфорильованої 2DG призводить до інгібування гексокіназ. Застосування 2DG для

лікування вже давно відомо, проте не може бути ефективним в якості монотерапії [7].

Крім залежності від аеробного гліколізу, пухлинні клітини демонструють підвищене поглинання глутаміну в якості основного джерела азоту. Глутаміназа — метаболічний фермент, який каталізує гідроліз глутаміну до глутамату. В даний час досліджують терапевтичні стратегії, які спрямовані на блокування метаболізму глутаміну за допомогою інгібіторів глутамінази [8].

Різні підтипи раку нирки характеризуються порушенням регуляції метаболічних шляхів. Залежність деяких пухлин від аеробного гліколізу може бути використана з терапевтичною метою. Проте, ці методи не достатньо ефективні в якості монотерапії [7]. Для збільшення ефективності можна використовувати декілька мішеней в метаболізмі пухлинних клітин. В даному дослідженні ми застосували метод порівняння результатів мікроареїв з використанням кросплатформної нормалізації по декількох референтних генах, що кодують метаболічні ферменти, для пошуку генів зі зниженою експресією в різних типах пухлин нирки з метою розробки нових метаболічних стратегій терапії раку нирки.

ОБ’ЄКТ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Для дослідження використано 20 пар зразків пухлинної тканини і нормальної прилеглої до пухлини тканини. Зразки отримані з Національного Інституту Раку з дотриманням міжнародних етичних норм. Всі зразки пухлин відповідали одному гістологічному типу — світлоклітинній карциномі нирки і були класифіковані у відповідності з Американським об’єднаним комітетом з питань раку (TNM) і атипією ядер за Фурманом (табл. 1).

Аналіз результатів мікрочіпів і пошук генів із зниженою експресією. На сайті <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo> проводили пошук DataSet і Series файлів з результатами мікроареїв за ключовими словами: clear-cell renal carcinoma, normal human kidney, chromophil renal cell carcinoma, chromophobe renal cell carcinoma, oncocytoma. DataSet і Series файли містять сукупність записів зразків для яких проводилось дослідження на спільній платформі. Платформа є описом мікроарея. Запис зразка включає тип тканини; умови, при яких окремий зразок був оброблений; маніпуляції, яких він зазнав; результати вимірювань для цього зразка. Серія записів об’єднує групи пов’язаних зразків і забезпечує опис всього дослідження. Series файли надаються авторами дослідження і перетворюються персоналом GEO в DataSet (GDSxxx). DataSet файли містять інформацію про експериментальні результати визначення рівня експресії на мікроареях. В кожному DataSet файлі наявні дані для сукупності зразків, які біологічно і статистично можна порівнювати в межах одного файлу. Series

Таблиця 1

Зразки тканин ссРСС, класифіковані у відповідності з Американським об'єднаним комітетом з питань раку (TNM) і атипією ядер за Фурманом

№	Зразок	TNM	Атипія за Фурманом	№	Зразок	TNM	Атипія за Фурманом
1	100	T1bNxM0	I	11	128	T1aNxMo	I
2	103	T1bNxM0	I	12	129	T2aNxMo	II
3	104	T1aNxM0	I	13	131	T1aNxMo	I
4	105	T2aNxM0	II	14	135	T1aNxMo	I
5	107	T1aNxM0	I	15	136	T2aNxMo	II
6	109	T1aNxM0	I	16	142	T1bNxM0	I
7	119	T4NxMo	IV	17	143	T1aNxM0	I
8	121	T1bNxMo	I	18	144	T1bNxM0	I
9	124	T3NxMo	III	19	147	T1aNxMo	I
10	127	T1aNxMo	I	20	148	T2aNxM1	II

файли містять метадані і перетворювались в формат, подібний до DataSet файлів з використанням пакету GEOquery (<https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/GEOquery.html>) для програмного середовища R (<https://www.r-project.org>). Так як окремі DataSet файли створені різними авторами на різних мікроареях і обладнанні, порівнювати дані з різних файлів без нормалізації не можна. Для порівняння різних файлів проводили нормалізацію по двох референтних генах. Для цього значення експресії гена в кожному зразку ділили на середнє геометричне значення експресії *PPIA* і *TBP* в цьому ж зразку [9]. Під час аналізу за допомогою скрипта, написаного на мові програмування Perl, проводили розрахунок середнього значення експресії кожного гена в зразках пухлинної і нормальної тканини.

Виділення тотальної РНК. Тотальну РНК виділяли з використанням RNeasy Mini Kit (Qiagen, Германия) відповідно до інструкції. Якість виділеної РНК перевіряли методом електрофорезу в 1% агарозному гелі.

Синтез кДНК. 1 мкг тотальної РНК обробляли ДНКазою протягом 30 хв при 37°C, після чого реакцію інгібували 25 мМ EDTA (Thermo Scientific, США). Синтез кДНК проводили з використанням Oligo(dT)-праймерів в кінцевому об'ємі реакції

20 мкл за допомогою First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, США) відповідно до інструкції.

ПЛР в реальному часі. Реакція ПЛР в реальному часі проводилася в суміші, що містила 1х реакційну суміш SYBR Green (Thermo Scientific, США), полімерази, набір трифосфатів (дНТФ), 0,4 мкМ кожного праймеру та 500 нг кДНК. Умови реакції були наступними: 95°C — 10 хв, 40 циклів: 95°C — 15 с, 60°C — 20 с, 72°C — 30 с. Об'єм реакції складав 25 мкл. Реакцію проводили на приладі CFX96 (BioRad, США). Якість ПЛР продукту перевіряли за допомогою аналізу кривих плавлення. Нормалізації рівня внесеної кДНК в реакції для різних зразків обраховували за допомогою ампліфікації референтного гена TATA box binding protein (TBP), експресія якого є незмінною між зразками нормальної тканини та пухлин. Зміну експресії розраховували за $\Delta\Delta C_t$ методом. Ефективності ампліфікації було розраховано за допомогою програмного середовища R 2.12.1. (R-package, 2.12.1. version) з використанням пакету qpcR 1.4-1 (<https://cran.r-project.org/web/packages/qpcR/index.html>) як описано Spiess [10]. Підбір праймерів проводився з використанням OligoAnalyzer 3.1 (<https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>). Послідовності праймерів наведені в табл. 2.

Таблиця 2

Послідовності праймерів для ПЛР в реальному часі

Ген	Прямий праймер	Зворотний праймер	Продукт
<i>ALDOB</i>	5'-GGAATCAAGTTAGACCAAGGAGG-3'	5'-TACCAAGTCCATTCTGCTGACAG-3'	237
<i>ASS1</i>	5'-AATGAAGTCCCAGGTATCTACG-3'	5'-CTCCTCATTGTAGAGAGACAGTGG-3'	295
<i>DAO</i>	5'-CAGATTACGGCTATGGCTGG-3'	5'-TTCTCTTGCCACCTCCTCAA-3'	143
<i>HPD</i>	5'-CTTCCTAAAGTCCCAATGCG-3'	5'-ATAGTCCACATATTCCTGGATCTG-3'	267
<i>PAH</i>	5'-GTGCCATATCACTGATCTTCTCA-3'	5'-CTGTGTCTTTCTTCTATCTCGTGAA-3'	255
<i>TBP</i>	5'-TGCACAGGAGCCAAGAGTGAA-3'	5'-CACATCACAGCTCCCCACCA-3'	132

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

В результаті пошуку DataSet і Series файлів на сайті <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo> за ключовими словами було знайдено 7 файлів, які містять дані експресії генів в пухлинах нирок і нормальній тканині. Кількість зразків і тип пухлин в кожному файлі наведені в табл. 3.

Нормалізовані значення експресії генів для всіх зразків були об'єднані в один файл. Таким чином було збільшено кількість зразків у вибірці і стало можливо порівнювати експресію генів в зразках, що знаходяться в різних файлах. Це дало можливість розрахувати середнє значення експресії кожного гена для кожного типу пухлини і нормальної тканини. Для пошуку генів із зміненою експресією середнє значення експресії гена в пухлині ділилось на середнє значення в нормальній тканині.

Відбирали гени, експресія яких знижувалась більш ніж в 5 разів ($p < 0,05$) в порівнянні з нормою. Було знайдено 236 генів для ccRCC Fuhrman Grade 1, 1532 — для ccRCC Fuhrman Grade 2, 894 — для ccRCC Fuhrman Grade 3, 107 — для Chromophil renal cell carcinoma, 210 — для Chromophobe renal cell carcinoma, 290 — для Oncocytoma. Серед цих генів проводили пошук таких, що знижують свою експресію більше ніж в 5 разів в усіх 6 пухлинах. Такий критерій застосовували для того, щоб знайдені гени були універсальними для всіх пухлин нирок. Було знайдено 42 таких гени. Після аналізу можливої участі цих генів в метаболізмі пухлин було відібрано 7 генів.

Аміноацилаза 1 (aminoacylase 1, ACY1). ACY1 кодує цитозольний фермент, який каталізує гідроліз ацильованих L-амінокислот до L-амінокислоти та ацильної групи. Цей ген розташований на хромосомі 3p21.1. В цьому регіоні спостерігається втрата гомозиготності при дрібноклітинному раку легені, експресія гену зменшується в відповідних клітинних лініях і тканині пухлин. Мутації в цьому гені є причиною порушення обміну

речовин, дефектів центральної нервової системи і підвищення екскреції з сечею N-ацетильованих амінокислот. Процес ацилювання білків являє собою ковалентне приєднання ацильної групи в альфа- і епсилон-положення аміногруп поліпептидних ланцюгів. N-кінцеве ацилювання білків відбувається в багатьох еукаріотичних клітинах, де може бути ацильовано більше 50% цитозольних білків. Ацилювання, яке відбувається під час або після біосинтезу поліпептидних ланцюгів, служить для захисту від внутрішньоклітинного протеолізу білків. N-блоковані пептиди, що утворюються при протеолізі можуть бути розщеплені N-ацилпептид гідролазою (acylpeptide hydrolase, APH), а утворені в результаті цього ацильовані L-амінокислоти розщеплюються до L-амінокислоти та ацильної групи ACY1. APH і ACY1 є цитоплазматичними ферментами, які були виділені з різних тканин ссавців [11].

Експресія ACY1 регулюється тканиноспецифічним фактором транскрипції HNF4alpha, що регулює велику кількість генів в гепатоцитах і клітинах підшлункової залози. HNF4alpha експресується на високому рівні в деяких частинах нирки, проте мало що відомо про його роль в цьому органі і про HNF4alpha-регульовані гени в клітинах нирок. Активність HNF4alpha часто зменшена в нирково-клітинній карциномі [12].

Так як ACY1 експресується в багатьох тканинах, то можна замість звичайних амінокислот в раціон включити ацильовані L-амінокислоти. В нормальних клітинах вони будуть розщеплюватись до L-амінокислот і ацильних залишків, а в пухлинних клітинах, із зменшеною експресією ACY1, буде дефіцит вільних амінокислот.

За результатами аналізу мікроареїв середнє значення зниження експресії ACY1 в ccRCC Fuhrman Grade 1 в порівнянні з нормальною тканиною становить 12,7 ($p < 0,05$), в ccRCC Fuhrman Grade 2 — 31,2 ($p < 0,05$), в ccRCC Fuhrman Grade 3 — 45,5 разів ($p < 0,05$).

Таблиця 3

Кількість зразків в файлах з бази даних GEO, які містять інформацію про експресію генів в пухлинах нирки і нормальній тканині

Тип тканини	GEO accession							Загальна кількість
	GDS505	GDS1344	GDS2880	GDS3274	GSE6280	GSE11151	GSE11904	
ccRCC Fuhrman Grade 3	3						11	14
ccRCC Fuhrman Grade 2	2						9	11
ccRCC Fuhrman Grade 1	4		5					9
Normal Human Kidney	8		10		2	3		23
Chromophil renal cell carcinoma		34			2	19		55
Oncocytoma				9	1	4		14
Chromophobe renal cell carcinoma				9	1	4		14

Аргінінсуццинат синтетаза 1 (argininosuccinate synthase 1, ASS1). Білок, що кодується *ASS1* каталізує передостанню реакцію на шляху біосинтезу аргініну. Аргінін, напівнезамінна амінокислота в організмі людини, має вирішальне значення для росту злоякісних пухлин. На додаток до синтезу білка, аргінін бере участь в різних аспектах метаболізму пухлини, зокрема в синтезі оксиду азоту, поліамінів, нуклеотидів, проліну і глутамату. Пухлинне зниження експресії ферменту *ASS1*, що є лімітуючою стадією синтезу аргініну, призводить до внутрішньої залежності від позаклітинного аргініну у зв'язку з нездатністю його синтезувати. Ця залежність від позаклітинного аргініну відома як аргінін ауксотрофія. Деякі пухлини є аргінін ауксотрофними у зв'язку з втратою *ASS1*, зокрема гепатоцелюлярні карциноми, меланоми, злоякісні мезотеліоми плеври, пухлини передміхурової залози і нирки. Відсутність позаклітинного аргініну при інактивації *ASS1* викликає апоптоз у аргінін ауксотрофів [13]. *ASS1* є біомаркером відповіді на аргінін-знижуючий агент ПЕГ-аргінін деаміназу (ADI-PEG20) в лімфоїдних злоякісних новоутвореннях, при яких спостерігається часте гіперметилування промотора *ASS1*. Спостерігається значна кореляція між *ASS1* метилуванням, низьким рівнем мРНК *ASS1*, відсутністю експресії білка і чутливістю до ADI-PEG20 в злоякісних лімфоїдних клітинних лініях [14].

У цитоплазмі клітини *ASS1* каталізує взаємодію цитруліну з аспаратом, продуктом якої є аргінінсуццинат, який розщеплюється аргінінсуццинатліазою (ASL) до аргініну та фумарату. *ASS1* та *ASL* експресуються у більшості тканин. Таким чином, виключивши з раціону аргінін та замінивши його цитруліном і аспаратом (глутамат чи орнітин, з яких утворюється цитрулін), які є попередниками синтезу аргініну, можна залишити аргінін-ауксотрофів без аргініну. Нормальні клітини, які мають *ASS1* та *ASL*, будуть синтезувати аргінін з цитруліну і аспартату, а пухлинні клітини, в яких експресія *ASS1* знижена, цього зробити не зможуть. Також можна замінити аргінін на ацильований L-аргінін. В нормальних клітинах він буде розщеплюватись до L-аргініну і ацильних залишків, а в пухлинних клітинах із зменшеною експресією *ACY1*, буде дефіцит аргініну.

Для перевірки зміни експресії *ASS1* була використана ЗТ-ПЛР в реальному часі. Пухлинні та контрольні зразки були парні для кожного пацієнта. Прилеглі до пухлини тканини, що не зазнали злоякісних перетворень, використовувались, як парні контрольні норми до зразків пухлин. Для дослідження експресії генів було використано 20 пар зразків (пухлина/норма) ссRCC різного ступеня злоякісності.

Незважаючи на те, що ми аналізували експресію генів в тканинах різних типів пухлин, на рисунках представлені дані щодо ссRCC, так як для оцінки експресії генів методом ПЛР в реальному часі використовували тканину цієї пухлини. При аналізі результатів мікроареїв використовували дані різних авторів, тому пухлинні і нормальні зразки не є парними, на відміну від наших зразків для ПЛР в реальному часі. Враховуючи це, на *рис. 1А* наведені відношення рівнів експресії гена *ASS1* в пухлині до його експресії в нормальній тканині парного зразка, на *рис. 1Б* зображені рівні експресії гену як в пухлинній, так і в нормальній тканині.

На *рис. 1А* наведені результати ПЛР в реальному часі для *ASS1* в 20 парах зразків (пухлина/норма) ссRCC різного ступеня злоякісності. *ASS1* знижує експресію ($p < 0,05$) більш ніж в 5 разів в 15 зразках. В 4 зразках зменшення експресії було незначне (менше ніж в 5 разів). І лише в одному зразку спостерігали незначне збільшення експресії (в 1,1 раза). Ці результати повністю підтверджують дані аналізу результатів мікроареїв інших авторів (див. *рис. 1Б*).

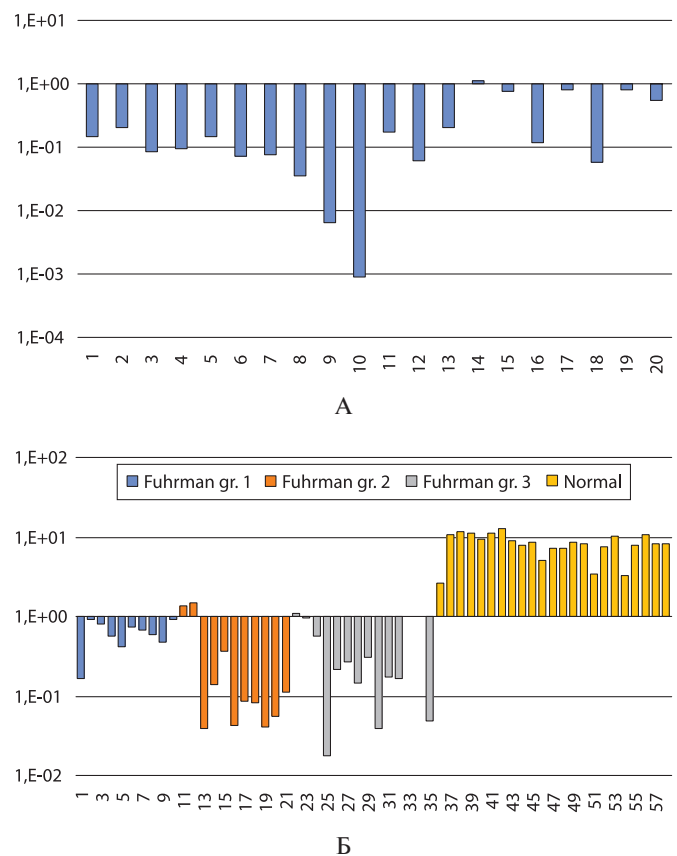


Рис. 1. Експресія *ASS1* в ссRCC в порівнянні з нормальною тканиною: А — експресія *ASS1* за результатами ПЛР в реальному часі; Б — експресія *ASS1* за результатами аналізу бази даних мікроареїв в ссRCC (Fuhrman Grade 1–3)

За результатами аналізу мікроареїв середнє значення зниження експресії *ASS1* в ccRCC Fuhrman Grade 1 в порівнянні з нормальною таниною становить 13 ($p < 0,05$) разів, в ccRCC Fuhrman Grade 2 — 23,9 ($p < 0,05$), в ccRCC Fuhrman Grade 3 — 19,3 ($p < 0,05$) раз. Ми не рахували середнє значення зниження експресії гена для кожного ступеня за Fuhrman, тому що кількість зразків, використаних для ПЛР в реальному часі для всіх чотирьох ступенів становить 20 пар. Але якщо порівнювати середнє значення для пухлин всіх ступенів і норм, то експресія *ASS1* знижується в 4,4 ($p < 0,05$) раза.

Фруктозо-1,6-бісфосфат альдолаза В (aldolase B, fructose-bisphosphate, ALDOB). ALDOB каталізує оборотне перетворення фруктози-1,6-бісфосфата в гліцеральдегід-3-фосфат і дигідроксиацетон фосфат. Хребетні мають 3 ізоферменти альдолази. Ембріон під час розвитку виробляє альдолазу А. В дорослому організмі (в печінці, нирках і кишечнику) експресія альдолази А репресована і відбувається експресія альдолази В. У головному мозку і інших нервових тканинах, альдолази А та С експресуються приблизно однаково. Існує висока ступінь гомології між альдолазами А і С. Дефекти в *ALDOB* призводять до спадкової непереносимості фруктози.

Пухлини з високою швидкістю гліколізу мають перевагу в рості. Гепатоцелюлярна карцинома часто проявляє аномальну експресією ферментів гліколізу, зокрема, гексокінази 2 (hexokinase, HK2) і ALDOB. Три чинники (зниження експресії *ALDOB*, надекспресія *HK2* і мутації p53) не тільки пов'язані з пухлинною прогресією, але і взаємодіють один з одним, що призводить до збільшення агресивності пухлини і виникнення внутрішньопечінкових метастазів. Аномальна експресія *ALDOB* і *HK2* пов'язана з прогресуванням захворювання і поганим прогнозом [15]. Заміна глюкози на піруват в культуральному середовищі клітинної лінії гепатоми щура FTO2B знижує активність гліколітичних ферментів і запобігає проліферації [16].

Дефект альдолази призводить до порушення реакцій гліколізу і глюконеогенезу. Так як в процесі гліколізу до розщеплення ALDOB фруктозо-1,6-бісфосфата в гліцеральдегід-3-фосфат і дигідроксиацетон фосфат не відбувається синтез АТФ, а навпаки, на фосфорилування однієї молекули глюкози витрачається дві молекули АТФ, то збільшення експресії *HK2* може компенсувати зниження експресії *ALDOB*. За результатами аналізу мікроареїв збільшення експресії *HK2* в ccRCC Fuhrman Grade 1 в порівнянні з нормальною таниною відсутнє, в ccRCC Fuhrman Grade 2 середнє значення збільшення експресії складає

19,4 ($p < 0,05$), в ccRCC Fuhrman Grade 3 — 15,6 ($p < 0,05$). Це свідчить про важливість гліколізу для ccRCC, тому для інгібування *HK2* можна використати 2-дезоксид-Д-глюкозу (2DG) [7]. Крім того заміна в раціоні вуглеводів на жири, які розщеплюються із синтезом АТФ оминаючи гліколіз, не впливає на процеси в нормальних клітинах, на відміну від пухлинних клітин, що активно використовують аеробний гліколіз.

На рис. 2А наведені результати ПЛР в реальному часі для *ALDOB* в 20 парах зразків (пухлина/норма) ccRCC різного ступеня злоякісності. Рівень експресії *ALDOB* знижувався ($p < 0,05$) в 18 зразках більш ніж в 5 разів. В одному зразку зменшення експресії було незначним (менше ніж в 5 разів). І лише в зразку № 14 спостерігали незначне збільшення експресії (в 3,2 раза). Ці результати повністю підтверджують дані аналізу результатів мікроареїв інших авторів (рис. 2Б).

За результатами аналізу мікроареїв середнє значення зниження експресії *ALDOB* в ccRCC Fuhrman Grade 1 в порівнянні з нормальною таниною становить 5,9 ($p < 0,05$), в ccRCC Fuhrman Grade 2 — 11,7 ($p < 0,05$), в ccRCC Fuhrman Grade 3 — 22,8 раз ($p < 0,05$). Якщо порівнювати

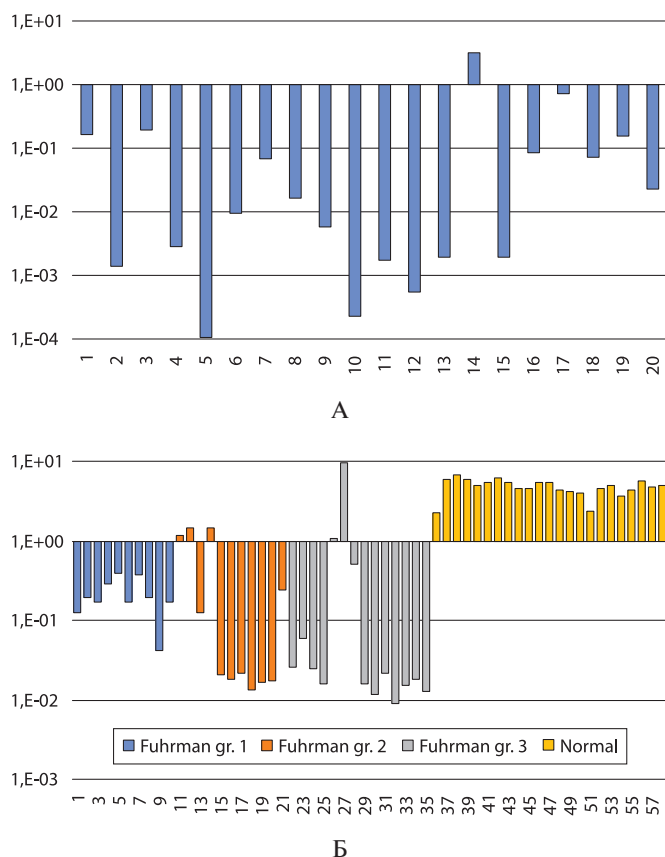


Рис. 2. Експресія *ALDOB* в ccRCC в порівнянні з нормальною тканиною: А — за результатами ПЛР в реальному часі; Б — за результатами аналізу бази даних мікроареїв в ccRCC (Fuhrman Grade 1–3)

середнє значення для пухлин всіх ступенів і норм за даними ПЛР в реальному часі, то експресія *ALDOB* знижується в 7,4 раза ($p < 0,05$).

Оксидаза D-амінокислот (D-amino-acid oxidase, DAO). DAO кодує фермент пероксисомальної оксидази D-амінокислот. Його біологічна функція не відома, він може виступати в якості агента детоксикації, який видаляє D-амінокислоти, що накопичуються в процесі старіння.

DAO може каталізувати дегідровання D-амінокислот, таких як D-аланін, з отриманням перекису водню, активної форми кисню, яка взаємодіє з ДНК, ліпідами і білками, що викликає загибель клітин. При інфікуванні клітинної лінії гліоми 9L пацієнтів рекомбінантним ретровірусом, який містить кДНК DAO, може бути викликаний цитотоксичний окисний стрес D-аланіном. Заражені клітини гліоми 9L менш життєздатні після контакту з D-аланіном в порівнянні з контрольною групою [17].

DAO, зв'язана з поліетиленгліколем (PEG-DAO), при внутрішньовенному введенні вибірково накопичується в пухлинній тканині та характеризується незначним накопиченням в нормальних органах і тканинах. Введення D-проліну для генерації цитотоксичного перекису водню у місці накопичення PEG-DAO в пухлині призводило до значного пригнічення її росту порівняно з групою контрольних тварин [18].

Крім окисного стресу, який створюється трансфекцією DAO чи ін'єкцією PEG-DAO і D-амінокислотами, зниження експресії DAO можна використати для терапії іншим чином. При дослідженні харчових ефектів парентерального введення D-амінокислот (D-феніланін (D-Phe), D-валін (D-Val), D-лейцин (D-Leu), D-метіонін (D-Met)) на ріст гепатоми шурів був проведений аналіз розміру пухлини і ваги тіла. Спостерігали значне інгібування росту пухлини при вживанні D-Val в порівнянні з контрольною групою. При вживанні D-Val зменшувалася кількість ДНК і білка в пухлинних тканинах. При вживанні D-Leu і D-Met спостерігали тенденцію до гальмування росту пухлини. Вміст білка в тканинах печінки тварин цих двох груп значно перевищував показники контрольної групи. Вага пухлини була значно нижча в групі тварин, що вживали D-Val, порівняно з контрольною групою. D-Val мав найсильніший інгібуючий ефект без негативного впливу на господаря. Поліпшення стану також спостерігали у шурів, які отримували D-Leu або D-Met [19].

Наявність DAO в нормальних клітинах свідчить про необхідність позбавлятися від D-амінокислот. Отже при вживанні надлишку D-амінокислот буде спостерігатись негативний

вплив на пухлини, в яких знижена експресія DAO, на відміну від нормальних тканин.

На рис. 3А наведені результати ПЛР в реальному часі для DAO в 20 парах зразків (пухлина/норма) ссRCC різного ступеня злоякісності. Експресія DAO знижувалася ($p < 0,05$) більше ніж в 5 разів в 17 зразках. В 2 зразках зменшення експресії було незначним (менше ніж в 5 разів). Лише у зразку № 14 спостерігали незначне збільшення експресії (в 4,7 раза). Ці результати повністю підтверджують дані аналізу результатів мікроареїв інших авторів (рис. 3Б). За результатами аналізу мікроареїв середнє значення зниження експресії DAO в ссRCC Fuhrman Grade 1 в порівнянні з нормальною тканиною становить 5,7 ($p < 0,05$), в ссRCC Fuhrman Grade 2 — 24,4 ($p < 0,05$), в ссRCC Fuhrman Grade 3 — 26,0 ($p < 0,05$). Якщо порівнювати середнє значення для пухлин всіх ступенів і норм за даними ПЛР в реальному часі, то експресія DAO знижувалася в 22,9 раза ($p < 0,05$).

Феніланін гідроксилаза (phenylalanine hydroxylase, PAH), 4-гідроксифенілпіруват диоксигеназа (4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase, HPD). Перетворення в організмі феніланіну в тирозин необхідно більшою мірою для видалення надлиш-

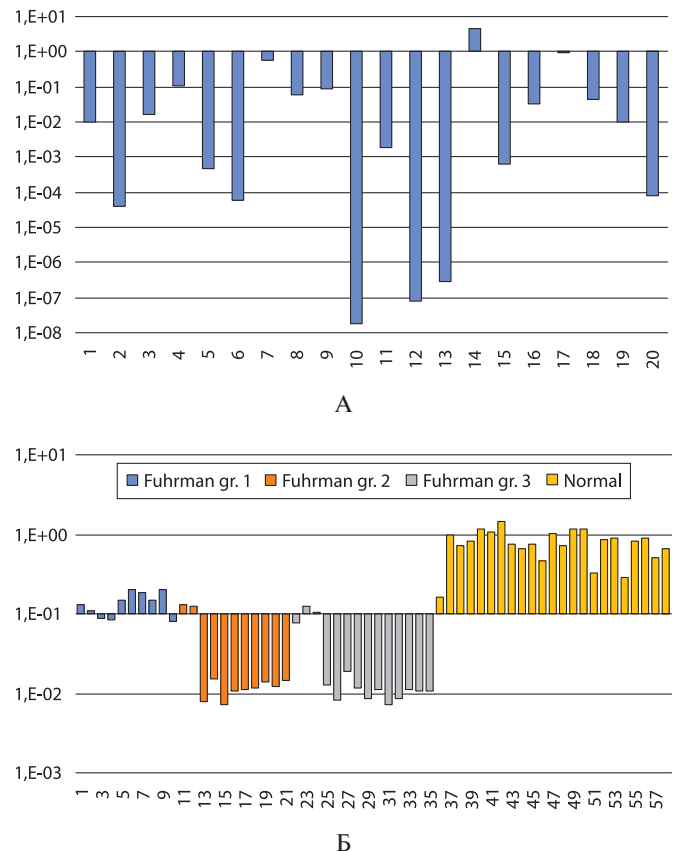


Рис. 3. Експресія DAO в ссRCC в порівнянні з нормальною тканиною: А — за результатами ПЛР в реальному часі; Б — за результатами аналізу бази даних мікроареїв в ссRCC (Fuhrman Grade 1–3)

ку фенілаланіну, ніж для синтезу тирозину. Тирозин в достатній кількості надходить з білками їжі. *PAH* кодує фермент, який є лімітуючим етапом катаболізму фенілаланіну. Дефіцит *PAH* є результатом аутосомно-рецесивного захворювання фенілкетонурії. *PAH* експресується переважно в печінці, проте його транскрипти виявлені в нирках, підшлунковій залозі і мозку. Первинна структура транскрипту нирки відповідає структурі транскрипту печінки [20]. При гідроксилюванні фенілаланіну утворюється тирозин. Надлишок тирозину утилізується шляхом переамінування з α -кетоглутарової кислоти і перетворюється на 4-гідроксифенілпіруват, який перетворюється в гомогентизат за допомогою *HPD*. Гомогентизат через проміжні стадії утворення 4-малеїлацетоацетата і 4-фумарилацетоацетата розпадається до фумарату і ацетоацетата, які остаточно розщеплюються в циклі Кребса. За нашими даними *HPD* і *PAH* знижує свою експресію в *ccRCC*. Тирозин відноситься до замінних амінокислот, так як може синтезуватись з фенілаланіну, проте зниження експресії *PAH* і *HPD* свідчить про порушення його метаболізму в *ccRCC* в порівнянні з нормою. При збільшенні в раціоні фенілаланіну і тирозину може

спостерігатись негативний вплив на пухлини, в яких знижена експресія *PAH* і *HPD*, на відміну від нормальних тканин.

На *рис. 4А* наведені результати ПЛР в реальному часі для *PAH* в 20 парах зразків (пухлина/норма) *ccRCC* різного ступеня злоякісності. Експресія *PAH* знижувалася ($p < 0,05$) в 17 зразках більш ніж в 5 разів. В 1 зразку зменшення експресії було незначним (менше ніж в 5 разів). В двох зразках спостерігали незначне збільшення експресії. Ці результати повністю підтверджують дані аналізу результатів мікроареїв (*рис. 4Б*).

За результатами аналізу мікроареїв середнє значення зниження експресії *PAH* в *ccRCC* Fuhrman Grade 1 в порівнянні з нормальною таниною становило 16 ($p < 0,05$), в *ccRCC* Fuhrman Grade 2 — 30,5 ($p < 0,05$), в *ccRCC* Fuhrman Grade 3 — 32,5 рази ($p < 0,05$). Якщо порівнювати середнє значення для *ccRCC* всіх ступенів і норм за даними ПЛР в реальному часі, то експресія *PAH* знижувалася в 6,8 рази ($p < 0,05$).

На *рис. 5А* наведені результати ПЛР в реальному часі для *HPD* в 20 парах зразків (пухлина/норма) *ccRCC* різного ступеня злоякісності. *HPD* знижує експресію ($p < 0,05$) в 17 зразках більше ніж в 5 разів. В 2 зразках зменшення експресії було незначним (менше ніж в 5 разів). В зразку № 14 спостерігали збільшення експресії (в 10,2 рази). Ці результати повністю підтверджують дані аналізу результатів мікроареїв інших авторів (*рис. 4Б*). За результатами аналізу мікроареїв середнє значення зниження експресії *HPD* в *ccRCC* Fuhrman Grade 1 в порівнянні з нормальною таниною становило 255 ($p < 0,05$), в *ccRCC* Fuhrman Grade 2 — 118 ($p < 0,05$), в *ccRCC* Fuhrman Grade 3 — 143 разів ($p < 0,05$). Якщо порівнювати середнє значення для пухлин всіх ступенів і норм за даними ПЛР в реальному часі, то експресія *HPD* знижувалася в 14,8 рази ($p < 0,05$).

Оксидаза піпеколінової кислоти (pipescolic acid oxidase, PIPOX). Саркозин, N-метил похідне амінокислоти гліцину, був ідентифікований як диференційний метаболіт, кількість якого значно збільшується при прогресуванні раку передміхурової залози, і який може бути виявлений неінвазивно в сечі. Рівень саркозину був також збільшений в інвазивних клітинних лініях порівняно з доброякісними епітеліальними клітинами передміхурової залози [21]. Експресія ферменту біосинтезу саркозина — гліцин-N-метилтрансферази (GNMT) є підвищеною в пухлинах передміхурової залози, в той час як експресія саркозин дегідрогенази (SARDH) і оксидази піпеколінової кислоти (PIPOX), які метаболізують саркозин, зменшується. Відповідно до цього, GNMT сприяє збільшенню онкогенного потенціалу клітин

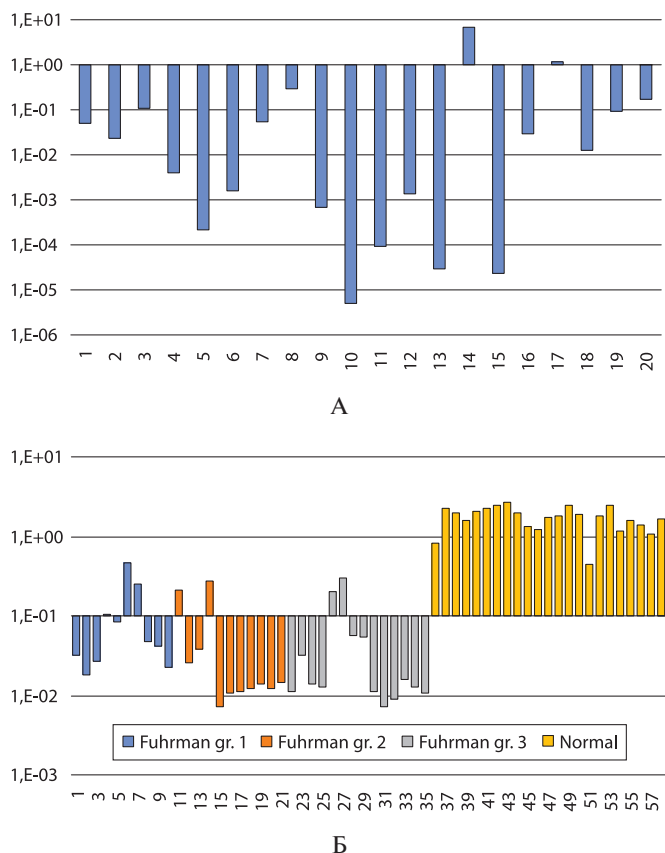


Рис. 4. Експресія *PAH* в *ccRCC* в порівнянні з нормальною тканиною: А — за результатами ПЛР в реальному часі; Б — за результатами аналізу бази даних мікроареїв в *ccRCC* (Fuhrman Grade 1–3)

передміхурової залози, в той час як *SARDH* і *PIPOX* знижують його за рахунок зменшення кількості саркозину. Стабільний нокдаун *GNMT* в інвазивних клітинах DU145 призводить до зниження проліферації клітин і збільшення апоптозу. Надлишкова експресія *SARDH* і *PIPOX* в клітинах DU145 помітно зменшує рівень саркозину і ослаблює їх інвазію. Надекспресія *SARDH* зменшує також і проліферацію. Нокдаун *SARDH* у доброякісних епітеліальних клітинах сприяє зростанню рівня їх проліферації та інвазії. Проте нокдаун *PIPOX* призводить лише до збільшення інвазивності [22]. Просте додавання екзогенного саркозину призводить до набуття інвазивного фенотипу доброякісними епітеліальними клітинами передміхурової залози. Гліцин, як попередник саркозину, також індукуює інвазивні властивості в цих клітинах, хоча і меншою мірою, ніж саркозин [21].

Зниження експресії *PIPOX* в клітинах пухлин нирок може свідчити про подібну функцію саркозину. Для зменшення індукування інвазивних властивостей саркозину можна зменшити надходження гліцину з їжею. Так як гліцин є замінною амінокислотою, утворюється з серину і треоніну, то можна зменшити і кількість цих амінокислот. Ще одним наслідком зменшення кількості гліцину буде обмеження синтезу пуринів і піримідинів, що активно використовуються пухлинними клітинами, які швидко діляться. Проте для пухлин нирок можлива і відмінна функція для *PIPOX*, на відміну від раку передміхурової залози, так як за даними аналізу результатів мікроареїв *GNMT* не збільшує свою експресію, а зниження експресії *SARDH* в світлоклітинних карциномах є незначним. Тому для пухлин нирок супресорні властивості *PIPOX* можуть полягати не в розщепленні саркозину, як в пухлинах передміхурової залози, а в зменшенні кількості перексиду водню, який утворюється при роботі цього ферменту.

За результатами аналізу мікроареїв середнє значення зниження експресії *PIPOX* в ccRCC Fuhrman Grade 1 в порівнянні з нормальною таниною становило 10,75 ($p < 0,05$), в ccRCC Fuhrman Grade 2 — 16,95 ($p < 0,05$), в ccRCC Fuhrman Grade 3 — 21,28 разів ($p < 0,05$).

ВИСНОВКИ

1. Для пухлин є характерним порушення регуляції метаболічних шляхів. Деякі етапи гліколізу та метаболізму амінокислот, оцінені як можливі протипухлинні мішені в доклінічних дослідженнях, є недостатньо ефективними в якості монотерапії; для збільшення ефективності можна використовувати декілька мішеней в метаболізмі пухлинних клітин.

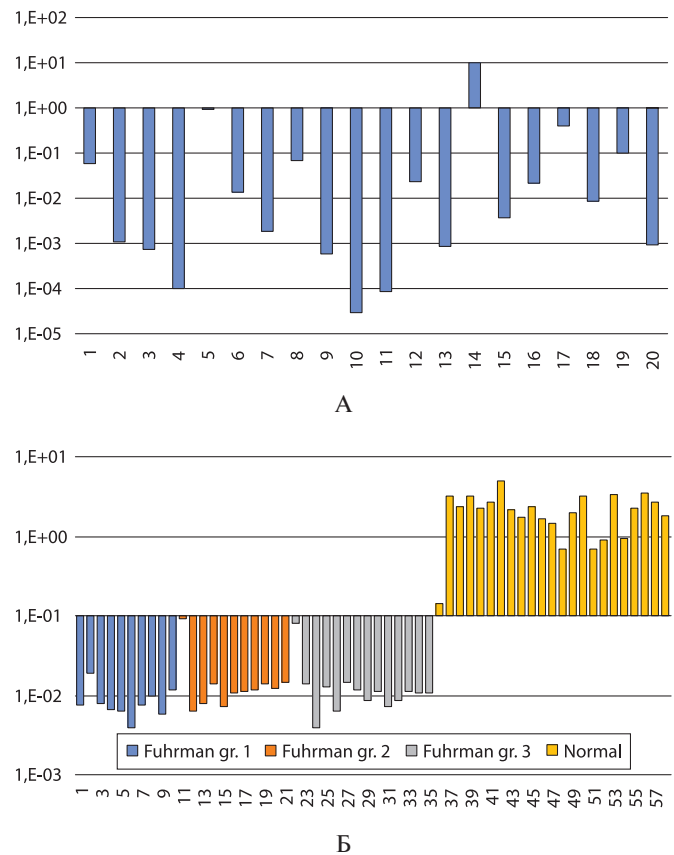


Рис. 5. Експресія *HPD* в ccRCC в порівнянні з нормальною тканиною: А — за результатами ПЛР в реальному часі; Б — за результатами аналізу бази даних мікроареїв в ccRCC (Fuhrman Grade 1–3)

2. Застосовуючи метод порівняння результатів мікроареїв з використанням кросплатформної нормалізації по декількох референтних генах було знайдено 7 генів із зниженою експресією в різних типах пухлин нирки, що можуть бути використані в метаболічній стратегії терапії. Ферменти, що кодуються цими генами беруть участь в метаболізмі амінокислот (*ACY1*, *ASS1*, *DAO*, *PAH*, *HPD*, *PIPOX*) та гліколізі (*ALDOB*).

3. Створивши панель можливих мішеней і провівши аналіз експресії генів в конкретного пацієнта, можна розробити метаболічну стратегію терапії, що в поєднанні із традиційними методами може підвищити ефективність лікування. Це дасть можливість перейти до персоналізованої метаболічної стратегії терапії пухлин нирки.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Sánchez Sánchez E, Castiñeiras Fernández J. New etiopathogenic findings in renal cell carcinoma: carcinogenesis and tumor development pathways. *Actas Urol Esp* 2009; **33** (5): 468–73. doi: 10.1016/s0210-4806(09)74179-8.
2. Linehan WM, Bratslavsky G, Pinto PA, et al. Molecular diagnosis and therapy of kidney cancer. *Annu Rev Med* 2010; **61**: 329–43. doi: 10.1146/annurev.med.042808.171650.

3. Shuch B, Linehan WM, Srinivasan R. Aerobic glycolysis: a novel target in kidney cancer. *Expert Rev Anticancer Ther* 2013; **13** (6): 711–9. doi: 10.1586/era.13.57.
4. Yang OC, Maxwell PH, Pollard PJ. Renal cell carcinoma: translational aspects of metabolism and therapeutic consequences. *Kidney Int* 2013; **84** (4): 667–81. doi: 10.1038/ki.2013.245.
5. Chan DA, Sutphin PD, Nguyen P, *et al.* Targeting GLUT1 and the Warburg effect in renal cell carcinoma by chemical synthetic lethality. *Sci Transl Med* 2011; **3** (94): 94ra70. doi: 10.1126/scitranslmed.3002394.
6. Fantin VR, St-Pierre J, Leder P. Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. *Cancer Cell* 2006; **9** (6): 425–34. doi: 10.1016/j.ccr.2006.04.023.
7. Zhong D, Liu X, Schafer-Hales K, *et al.* 2-Deoxyglucose induces Akt phosphorylation via a mechanism independent of LKB1/AMP-activated protein kinase signaling activation or glycolysis inhibition. *Mol Cancer Ther* 2008; **7** (4): 809–17. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-07-0559.
8. Wang J B, Erickson J W, Fuji R, *et al.* Targeting mitochondrial glutaminase activity inhibits oncogenic transformation. *Cancer Cell* 2010; **18** (3): 207–19. doi: 10.1016/j.ccr.2010.08.009.
9. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002; **3** (7): RESEARCH0034. doi: 10.1186/gb-2002-3-7-research0034.
10. Spiess AN, Feig C, Ritz C. Highly accurate sigmoidal fitting of real-time PCR data by introducing a parameter for asymmetry. *BMC Bioinformatics* 2008; **9**: 221. doi: 10.1186/1471-2105-9-221.
11. Perrier J, Durand A, Giardina T, *et al.* Catabolism of intracellular N-terminal acetylated proteins: involvement of acylpeptide hydrolase and acylase. *Biochimie* 2005; **87** (8): 673–85. doi: 10.1016/j.biochi.2005.04.002.
12. Lucas B, Grigo K, Erdmann S, *et al.* HNF4 α reduces proliferation of kidney cells and affects genes deregulated in renal cell carcinoma. *Oncogene* 2005; **24** (42): 6418–31. doi: 10.1038/sj.onc.1208794.
13. Delage B, Fennell DA, Nicholson L, *et al.* Arginine deprivation and argininosuccinate synthetase expression in the treatment of cancer. *Int J Cancer* 2010; **126** (12): 2762–72. doi: 10.1002/ijc.25202.
14. Delage B, Luong P, Maharaj L, *et al.* Promoter methylation of argininosuccinate synthetase-1 sensitises lymphomas to arginine deiminase treatment, autophagy and caspase-dependent apoptosis. *Cell Death Dis* 2012; **3** (7): e342. doi: 10.1038/cddis.2012.83.
15. Peng S Y, Lai P L, Pan H W, *et al.* Aberrant expression of the glycolytic enzymes aldolase B and type II hexokinase in hepatocellular carcinoma are predictive markers for advanced stage, early recurrence and poor prognosis. *Oncol Rep* 2008; **19** (4): 1045–53. doi: 10.3892/or.19.4.1045.
16. Schäfer D, Hamm-Künzelmann B, Brand K. Glucose regulates the promoter activity of aldolase A and pyruvate kinase M2 via dephosphorylation of Sp1. *FEBS Lett* 1997; **417** (3): 325–8. doi: 10.1016/s0014-5793(97)01314-8.
17. Li J, Shen Y, Liu A, *et al.* Transfection of the DAAO gene and subsequent induction of cytotoxic oxidative stress by D-alanine in 9L cells. *Oncol Rep* 2008; **20** (2): 341–6. doi: 10.3892/or_00000012.
18. Fang J, Sawa T, Akaike T, *et al.* Tumor-targeted delivery of polyethylene glycol-conjugated D-amino acid oxidase for antitumor therapy via enzymatic generation of hydrogen peroxide. *Cancer Res* 2002; **62** (11): 3138–43.
19. Sasamura T, Matsuda A, Kokuba Y. Tumor growth inhibition and nutritional effect of D-amino acid solution in AH109A hepatoma-bearing rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 1998; **44** (1): 79–87. doi: 10.3177/jnsv.44.79.
20. Lichter-Konecki U, Hipke CM, Konecki DS. Human phenylalanine hydroxylase gene expression in kidney and other nonhepatic tissues. *Mol Genet Metab* 1999; **67** (4): 308–16. doi: 10.1006/mgme.1999.2880.
21. Sreekumar A, Poisson LM, Rajendiran TM, *et al.* Metabolomic profiles delineate potential role for sarcosine in prostate cancer progression. *Nature* 2009; **457** (7231): 910–4. doi: 10.1038/nature07762.
22. Khan AP, Rajendiran TM, Ateeq B, *et al.* The role of sarcosine metabolism in prostate cancer progression. *Neoplasia* 2013; **15** (5): 491–501. doi: 10.1593/neo.13314.

IDENTIFICATION OF TARGET GENES FOR NOVEL METABOLIC STRATEGIES IN THE TREATMENT OF RENAL TUMORS

V.I. Ryamar¹, E.O. Stakhovsky²,
O.A. Kononenko², V.I. Kashuba¹

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

² State non-profit enterprise
“National Cancer Institute”, Kyiv, Ukraine

Summary. Aim: to identify genes encoding metabolic enzymes downregulated in various types of renal tumors, aiming to develop novel metabolic therapeutic strategies for renal cancer treatment. **Object and methods:** twenty pairs of clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) samples and adjacent normal tissues were analyzed. **DataSet and Series files** containing microarray results with gene expression data from different types of renal tumors and normal tissues were compared. Using cross-platform normalization for several reference genes, we identified

downregulated genes encoding metabolic enzymes that could serve as potential targets for novel metabolic strategies in renal cancer treatment. Expression of selected genes (ALDOB, ASS1, DAO, HPD and PAH) in clear cell renal cell carcinoma was validated by real-time RT-PCR. **Results:** using comparative microarray analysis with cross-platform normalization across multiple reference genes, we identified seven downregulated genes in various types of renal tumors that may serve as potential targets for developing novel metabolic strategies for renal cancer treatment. The enzymes encoded by these genes are involved in amino acid metabolism (ACY1, ASS1, DAO, PAH, HPD, PIPOX) and glycolysis (ALDOB). Decreased expression of ASS1, ALDOB, DAO, HPD, and PAH in clear cell RCC was confirmed using real-time RT-PCR. **Conclusion:** although monotherapy has shown limited efficacy, employing diverse metabolic strategies in renal tumor treatment may yield significantly better results, particularly when combined with conventional therapies. To expand the range of antitumor targets, the

identified downregulated genes could be supplemented with upregulated genes, as well as those with expression changes specific to particular tumor types. Once a comprehensive panel of potential targets is established and gene expression profiles are analyzed for individual patients, personalized metabolic strategies for renal tumor treatment can be developed.

Keywords: metabolic therapy strategy, clear cell renal cell carcinoma (ccRCC), downregulated genes,

metabolic enzymes, cross-platform normalization, microarrays.

Адреса для листування:

В.І. Римар
03143, Київ, вул. Академіка Заболотного 150
Інститут молекулярної біології та генетики
НАН України
E-mail: rymarvi@gmail.com

Одержано: 28.11.2024