

Л.М. Шлапацька
О.О. Лихова
В.М. Щербіна
І.М. Гордієнко

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

Ключові слова: проліферативна активність, IPO-38, Ki-67, інсулін, рак молочної залози, рак передміхурової залози, лінії клітин.

ВПЛИВ ІНСУЛІНУ НА ПРОЛІФЕРАТИВНУ АКТИВНІСТЬ КЛІТИН РАКУ МОЛОЧНОЇ ТА ПЕРЕДМІХУРОВОЇ ЗАЛОЗИ ЛЮДИНИ РІЗНОГО СТУПЕНЯ ЗЛОЯКІСНОСТІ *IN VITRO*

Мета: з'ясувати вплив інсуліну на проліферативну активність клітин ліній раку молочної залози (PM3) та раку передміхурової залози (ППЗ) людини різного ступеня злоякісності в експериментальній системі *in vitro*. **Об'єкт і методи:** у дослідженнях використані клітини ліній PM3 (T47D, MDA-MB-231, BCC/P, BC/ML) та ППЗ людини (LNCaP, Du-145, PC-3) різного ступеня злоякісності. Визначення показників експресії ядерних антигенів проліферуючих клітин IPO-38 та Ki-67 проводили за допомогою непрямого варіанта імунофлуоресцентного методу на проточному цитофлуориметрі Beckman Coulter DxFLEx із наступною обробкою результатів за допомогою програми CytExpert for DxFLEx. Вплив інсуліну на проліферативну активність клітин ліній PM3 та ППЗ оцінювали за показником рівня експресії IPO-38 після 72 год культивування клітин із інсуліном у концентрації 0,02 мкг/мл, яка відповідає його фізіологічній концентрації, та 0,5, 2 і 5 мкг/мл, за яких у середовищі культивування клітин створювали умови гіперінсулінемії. **Результати:** встановлено, що інсулін у концентрації 0,02 мкг/мл підвищує проліферативну активність клітин ліній низького ступеня злоякісності T47D люмінального А підтипу PM3 і чутливої до дії андрогену лінії ППЗ LNCaP у 1,5 та 2,6 разів відповідно. Не виявлено достовірних змін проліферативного потенціалу клітин ліній високого ступеня злоякісності PM3 (MDA-MB-231, BCC/P, BC/ML) і ППЗ (Du-145). За умов гіперінсулінемії у клітинах ППЗ ліній низького ступеня злоякісності LNCaP достовірно зростає рівень експресії IPO-38, тоді як у клітинах високого ступеня злоякісності Du-145 і PC-3 показники експресії IPO-38 достовірно не відрізнялися від таких у групі контролю. Відмічено зниження проліферативної активності клітин PM3 люмінального А підтипу T47D, тоді як клітини базального підтипу мали тенденцію до її зростання лише при культивуванні з інсуліном у концентрації 5 мкг/л. **Висновок:** проліферативна активність клітин PM3 та ППЗ за умов дії інсуліну залежить від ступеня їх злоякісності та концентрації інсуліну в середовищі культивування.

Відомо, що інсулін є головним анаболічним гормоном, який сприяє проліферації пухлинних клітин. До мітогенних відносять довгострокові ефекти гормону, які реалізуються на генетичному рівні за рахунок індукції експресії ряду специфічних генів, стимуляції синтезу ДНК і білків, що призводять до посилення клітинного росту [1]. Окрім того, інсулін здатний посилювати дію деяких факторів росту. Мітогенна дія інсуліну реалізується через складний ланцюг сигнальних подій: активацію протеїнкінази, залежної від циклічного аденозинмонофосфату (цАМФ), фосфорилування і активування фактора транскрипції в ядрі, індукцію ек-

спресії цАМФ-залежних генів, що в підсумку призводить до стимуляції клітинної проліферації [2].

Проліферативна активність злоякісно трансформованих клітин — одна з ключових характеристик біологічних властивостей пухлин, що зумовлює активний пошук маркерів, які можуть бути використані для об'єктивізації проліферативного потенціалу клітин. Для цих цілей в онкології широко застосовуються моноклональні антитіла (МкАт) Ki-67 і MIB-1, які виявляють різні епітопи одного антигену — Ki-67. Ki-67 широко використовується як маркер проліферації клітин і його експресію визначають у злоякісно трансформованих клітинах майже

всіх локалізацій та при деяких гематологічних злоякісних новоутвореннях [3, 4]. Оскільки Ki-67 експресований в клітинах на всіх стадіях клітинного циклу, окрім G₀ та ранньої G₁, позитивна реакція на цей антиген, як правило, корелює з агресивністю пухлин. Ki-67 розглядається як потенційний прогностичний маркер для пухлин молочної залози [5], раку передміхурової залози [6], нирки [7], сечового міхура [8], легені [9], а також для астроцитом [10], лімфом з клітин мантійної зони [11], та багатьох інших злоякісних новоутворень. Ядерний антиген проліферуючих клітин IPO-38 експресується в клітинах, що перебувають на тих же стадіях клітинного циклу, що і Ki-67 та, крім того, в ранній G₁-фазі клітинного циклу [12]. Наразі доведено значимість цього маркера не тільки для оцінки відсотка проліферуючих клітин, але і його прогностичну цінність при злоякісних лімфопроліферативних захворюваннях, злоякісних пухлинах молочної залози та раку шлунка [13–15].

Дослідження щодо залучення інсуліну до регуляції проліферативної активності пухлинних клітин були розпочаті у 70-х роках минулого століття на модельних системах *in vivo*. Ці дослідження показали, що фізіологічні концентрації інсуліну стимулюють проліферацію клітин раку молочної залози (PM3), а його депривація призводить до її інгібування [16]. У більш пізніх дослідженнях було доведено, що клітини лінії MCF-7 за умов дефіциту інсуліну не індукують ріст пухлини *in vivo* [17]. Сучасний стан проблеми щодо вирішення участі інсуліну в регуляції проліферативного потенціалу злоякісних клітин включає обов'язкове розуміння їх біологічних характеристик. Тому метою роботи було з'ясування впливу інсуліну на проліферативну активність клітин ліній PM3 та раку передміхурової залози (PP3) людини різного ступеня злоякісності в експериментальній системі *in vitro*.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

У дослідженнях використані клітини ліній PP3 — LNCap, Du-145, PC-3 — та PM3 людини (PM3) — T47D, MDA-MB-231, які внесені у реєстр Міжнародного банку клітинних ліній ATCC (American Type Culture Collection). Також об'єктами дослідження були клітини нових ліній PM3 людини — BCC/P і BC/ML, отримані і охарактеризовані в Інституті експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького Національної академії наук (НАН) України, а згодом паспортизовані та депоновані в банку клітинних ліній з тканин людини та тварин Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України. Загальна характеристика зазначених клітинних ліній представлена в табл. 1. Усі клітинні лінії культивували у середовищі IMDM (BioWest, France) з 20% ембріональної сироватки телят (FBS) (BioWest, France) та 100 мкг/мл суміші антибіотиків

(пеніцилін/стрептоміцин) (BioWest, France) за 37 °С в атмосфері 5% CO₂.

Для з'ясування можливого впливу інсуліну на експресію ядерного антигена проліферуючих клітин IPO-38 клітини ліній PP3 та PM3, за винятком BCC/P і BC/ML, інкубували з інсуліном (Lilly, France) у концентрації 0,02 та 2,0 мкг/мл. Для клітин BCC/P і BC/ML використовували наступні концентрації інсуліну — 0,02, 0,5 та 5,0 мкг/мл. Попередньо клітини в концентрації 0,4 • 10⁶/лунку висаджували у лунки 6-лункового планшета в 5 мл поживного середовища, після 24 год культивування середовище заміщували на 5 мл IMDM з 1% FBS та 100 мкг/мл суміші антибіотиків (пеніцилін/стрептоміцин), до якого додавали необхідну кількість інсуліну. Після 72 год культивування проводили цитофлуориметричне дослідження експресії IPO-38.

Таблиця 1

Характеристика клітинних ліній PM3 та PP3

Назва лінії	Походження	Гістологічний тип	Молекулярно-біологічна характеристика
PM3			
T47D	Плевральний ексудат	Інфільтруюча протокова карцинома	Люмінальний А молекулярний підтип
MDA-MB-231	Плевральний ексудат	Аденокарцинома	Базальний молекулярний підтип
BCC/P	Плевральний ексудат	Аденокарцинома	Базальний молекулярний підтип
BC/ML	Плевральний ексудат	Аденокарцинома	Базальний молекулярний підтип
Рак передміхурової залози			
LNCap	Метастаз у лімфатичний вузол	Аденокарцинома	Андроген-чутлива, неметастазуюча
Du 145	Метастаз у головний мозок	Аденокарцинома	Андроген нечутлива, метастазуюча
PC-3	Метастаз у кістки	Дрібноклітинна нейроендокринна карцинома	Андроген-нечутлива, метастазуюча

Для визначення експресії IPO-38, а також ядерного антигену проліферуючих клітин Ki-67 клітини попередньо фіксували 2% розчином параформальдегіду з наступною пермеабілізацією клітин 0,2% Tween-20%. Експресію IPO-38 визначали з використанням первинних мишачих МкАт анти-IPO-38 (Інституті експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України) та F(ab)₂-фрагментів імуноглобулінів кози проти імуноглобулінів миші, мічених FITC (DAKOCytomation, USA). Експресію Ki-67 — за допомогою первинних МкАт кроля анти-Ki-67 (клон SP-6, BioSystem, Spain) та імуноглобулінів віслюка, мічених Alexa Fluor 488, проти імуноглобулінів кроля (TermoFisher, USA).

Рівень експресії та кількість клітин, що експресують IPO-38 та Ki-67, визначали на проточному цитофлуориметрі Beckman Coulter DxFLEX з наступною обробкою результатів за допомогою програми CytExpert for DxFLEX. Рівні експресії IPO-38 та Ki-67 оцінювали за показником індексу

GeoMFI — співвідношення середньої геометричної інтенсивності флуоресценції клітин (GeoMean), що взаємодіяли з антитілами до антигену із GeoMean флуоресценції клітин ізотипового контролю. Достовірність відмінностей оцінювали на підставі критерію Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Враховуючи, що експресія IPO-38, на відміну від Ki-67, виявляється в клітинах, що знаходяться в ранній G₁-фазі клітинного циклу, ми вважали за необхідне порівняти показники експресії цих маркерів в клітинах ліній РМЗ та РПЗ з урахуванням ступеня злоякісності досліджуваних клітин, який було визначено в попередніх дослідженнях [18–20].

Аналіз показників експресії IPO-38 в клітинах ліній РМЗ показав, що як рівень експресії, так і кількість IPO-38⁺-клітин були достовірно вищими у клітинах базального молекулярного підтипу — ВСС/Р, ВС/МЛ та МДА-МВ-231 порівняно з таким у клітинах люмінального А підтипу — Т49Д (р < 0,05) (табл. 2). Щодо Ki-67, то, подібно IPO-38, така закономірність також відслідковувалася, тобто у клітинах низького ступеня злоякісності рівень експресії та кількість Ki-67⁺-клітин були достовірно меншими, ніж у клітинах високого ступеня злоякісності (р < 0,05).

Серед досліджуваних клітин РПЗ найвищі показники експресії як IPO-38, так і Ki-67 виявлено у клітинах Du-145. Найменший проліферативний потенціал за показниками IPO-38 і Ki-67 виявлено у клітинах РС-3. Загалом, як у клітинах ліній РМЗ, так і РПЗ кількість IPO-38⁺-клітин та рівень експресії IPO-38 були вищими за показники Ki-67. Слід зазначити, що у клітинах ВСС/Р, ВС/МЛ та Du-145 досліджувані показники експресії IPO-38 вдвічі перевищували такі Ki-67, тоді як у інших клітинних лініях різниця була не на стільки вираженою (табл. 2). Таким чином, дослідження експресії IPO-38 дозволяє більш об'єктивно визначити пул проліферуючих клітин і тому наші дослідження щодо впливу інсуліну на проліферативну активність клітин надалі були зосереджені на оцінці показників IPO-38.

ної відповіді як на фізіологічну концентрацію інсуліну (0,02 мкг/мл), так і концентрацію, яка відповідає стану гіперінсулінемії (2,0 мкг/мл). Найбільш чутливими до модуляції проліферативної активності інсуліном виявилися клітини лінії LNCap низького ступеня злоякісності. Уже за концентрації інсуліну 0,02 мкг/мл рівень експресії IPO-38 зростав у 2,6 разу (р < 0,05) у порівнянні з контролем. Зауважимо, що це значення експресії IPO-38 є вищим, ніж відповідне за умов гіперінсулінемії (4,9 та 4,6 відповідно) (рис. 1).

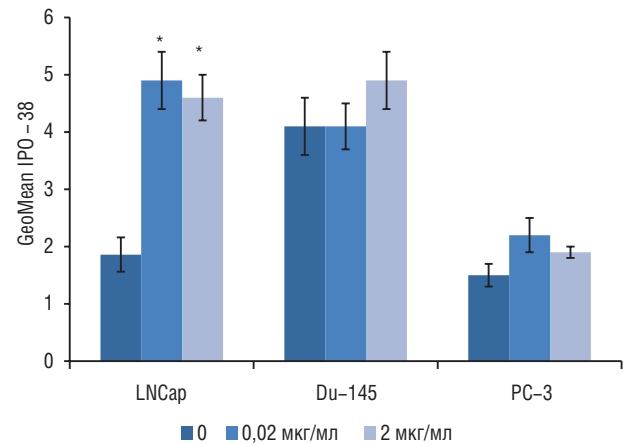


Рис. 1. Рівень експресії IPO-38 в клітинах РПЗ після культивування з інсуліном. *р < 0,05 порівняно з контролем

У клітинах РПЗ лінії РС-3 високого ступеня злоякісності нам вдалося відстежити подібну тенденцію в зміні показників проліферативної активності, як і у клітинах LNCap, проте після культивування з інсуліном у концентрації 0,02 мкг/мл рівень експресії IPO-38 в клітинах РС-3 зростав лише на 46%, відносно контролю, що у 5,7 разів менше за відповідний показник клітин LNCap (див. рис. 1). Високі концентрації інсуліну достовірно не впливали на зміну показника проліферативної активності клітин РС-3 порівняно з таким за фізіологічної концентрації інсуліну, проте прослідковувалася тенденція до зниження рівня експресії IPO-38 (р > 0,05).

Культивування клітин лінії Du-145 високого ступеня злоякісності з інсуліном у концентрації 0,02 мкг/мл не змінювало їх проліферативної активності. Лише за умов гіперінсулінемії рівень експресії IPO-38 зростав на 12% у порівнянні з контролем.

У серії відповідних експериментів з клітинами ліній РМЗ вдалося встановити ряд закономірностей. За умов культивування клітинних ліній із фізіологічною концентрацією інсуліну рівень експресії IPO-38 достовірно зростав лише в клітинах люмінального підтипу Т49Д (із 1,7 до 2,6), тоді як клітини базального підтипу достовірно не змінювали свій проліферативний потенціал (рис. 2, 3). У разі культивування клітин РМЗ за наявності інсуліну в концентраціях, які перевищують нормальні фізіологічні — 2,0 та 5,0 мкг/мл, виявлено тенденцію до зростання рівня експресії IPO-38 у клітинах РМЗ найбільш високого ступеня злоякісності — ВСС/Р,

Таблиця 2
Рівень експресії та кількість клітин, що експресують IPO-38 та Ki-67, в клітинах ліній РМЗ та РПЗ

Лінія клітин	Кількість позитивних клітин (%)		GeoMFI антигена (у.о.)	
	IPO38	Ki-67	IPO38	Ki-67
РМЗ				
T49D	31,0 ± 2,2	21,0 ± 2,7	1,9 ± 0,2	1,4 ± 0,1
MDA-MB-231	54,1 ± 3,2	50,0 ± 3,3	2,5 ± 0,2	1,8 ± 0,1
ВСС/Р	83,1 ± 4,2	42,0 ± 4,3	6,2 ± 0,2	3,1 ± 0,1
ВС/МЛ	88,4 ± 4,2	37,0 ± 4,3	4,7 ± 0,5	1,9 ± 0,3
РПЗ				
LNCap	37,0 ± 3,2	31,0 ± 2,2	2,1 ± 0,4	1,5 ± 0,2
Du-145	85,0 ± 4,2	45,0 ± 3,2	4,4 ± 0,3	2,4 ± 0,4
PC-3	18,1 ± 1,2	15,0 ± 1,3	1,7 ± 0,1	1,3 ± 0,2

Згідно з отриманими результатами, клітини ліній РПЗ відрізнялися за характером проліфератив-

BC/ML та MDA-MB-231 у порівнянні з контролем. Лише у клітинах люмінального підтипу T49D експресія IPO-38 зменшувалася і становила 1,4 порівняно з 1,7 у контрольних клітинах.

Отже, за умови фізіологічного вмісту інсуліну в поживному середовищі достовірно зростає проліферативна активність клітин ліній РМЗ та РПЗ низького ступеня злоякісності, тоді як у клітинах високого ступеня злоякісності достовірних змін у проліферативному потенціалі клітин не виявлено. Проте при культивуванні клітин ліній РМЗ та РПЗ із інсуліном у концентраціях, які зумовлюють гіперінсулінемію, рівень експресії IPO-38 статистично достовірно зростає у клітинах ліній і низького, і високого ступеня злоякісності РПЗ та має тенденцію до зростання у клітинах ліній РМЗ базального молекулярного підтипу, тоді як у клітинах люмінального А молекулярного підтипу відмічено зниження проліферативного потенціалу.

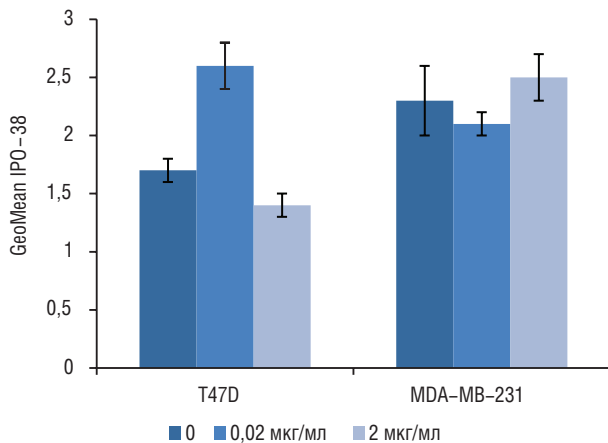


Рис. 2. Рівень експресії IPO-38 в клітинах РМЗ після культивування з інсуліном. * $p < 0,05$ порівняно з контролем

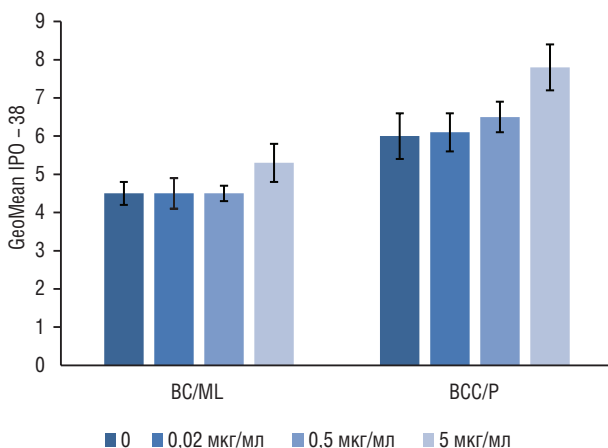


Рис. 3. Рівень експресії IPO-38 в клітинах РМЗ базального молекулярного підтипу після культивування з інсуліном. * $p < 0,05$ порівняно з контролем

Таким чином, в експериментальних дослідженнях *in vitro* показано, що інсулін-опосередковані відмінності у проліферативній активності клітин ліній РПЗ та РМЗ різного ступеня злоякісності є дозозалежними. Отримані дані підтверджують, що баланс

інсуліну є вкрай важливим для попередження розвитку і прогресії захворювання.

ВИСНОВКИ

1. У клітинах ліній РМЗ (T47D, MDA-MB-231, BCC/P та BC/ML) та РПЗ (LNCap, Du-145, PC-3) рівень експресії IPO-38 вищий, ніж рівень експресії Ki-67, що може бути пояснено експресією IPO-38 впродовж усіх стадій клітинного циклу, окрім G_0 , а також ранній G_1 -фазі клітинного циклу.

2. Встановлено відмінності у проліферативній активності клітин ліній РПЗ *in vitro*, опосередкованій інсуліном, за показником експресії ядерного антигену проліферуючих клітин IPO-38. Найбільш чутливими до модуляції проліферативної активності під впливом фізіологічної концентрації інсуліну (0,02 мкг/мл) виявилися чутливі до дії андрогенів клітини лінії LNCap, у яких рівень експресії IPO-38 зростає у 2,6 раза ($p < 0,05$). У клітинах високого ступеня злоякісності лінії Du-145 не виявлено змін у експресії IPO-38, а у клітинах PC-3 — підвищення даного показника лише на 46%. Висока концентрація інсуліну (2,0 мкг/мл) опосередковувала достовірне зростання показника проліферуючих клітин IPO-38 лише у клітинах LNCap.

3. Виявлено статистично достовірне підвищення рівня експресії IPO-38 за умови фізіологічної концентрації інсуліну в клітинах РМЗ люмінального А молекулярного підтипу лінії T47D у 1,5 раза та відсутність достовірних змін у показниках експресії даного маркера у клітинах базального молекулярного підтипу — MDA-MB-231, BC/ML, BCC/P. Інсулін у концентраціях, які перевищують фізіологічні, достовірно не впливає на зміни рівня експресії IPO-38 у клітинах найбільш злоякісних із досліджуваних ліній BCC/P, BC/ML та MDA-MB-231, тоді як у клітинах T47D відмічено тенденцію до зниження рівня експресії IPO-38 по відношенню до даного показника у контрольних клітинах.

Робота виконувалася в рамках НДР «Молекулярно-біологічні фактори гетерогенності злоякісних клітин та варіабельність клінічного перебігу гормонозалежних пухлин» (0117U002034) за фінансової підтримки Цільової програми наукових досліджень Відділення біохімії, фізіології і молекулярної біології НАН України «Молекулярно-генетичні і біохімічні механізми регуляції клітинних та системних взаємодій за фізіологічних та патологічних станів» (2017–2021).

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

- Gupta BB. Mechanism of insulin action. *Curr Science* 1997; **73**: 993–1003.
- Wilcox G. Insulin and Insulin Resistance. *Clin Biochem Rev* 2005; **26** (2): 19–39.
- Gerdes J, Schwab U, Lemke H, *et al.* Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 1983; **31**(1): 13–20.
- Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 2000; **182** (3): 311–22.

5. Menon SS, Guruvayoorappan C, Sakthivel KM, *et al.* Ki-67 protein as a tumour proliferation marker. *Clin Chim Acta* 2019; 491: 39–45.

6. Van der Kwast TH. Prognostic prostate tissue biomarkers of potential clinical use. *Virchows Arch* 2014; 464(3): 293–300.

7. Xie Y, Chen L, Ma X, *et al.* Prognostic and clinicopathological role of high Ki-67 expression in patients with renal cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep* 2017; 7: 44281.

8. Tian Y, Ma Z, Chen Z, *et al.* Clinicopathological and prognostic value of Ki-67 Expression in bladder cancer: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2016; 11 (7): e0158891.

9. Yi ES, Lee GK. Updates on selected topics in lung cancers: air space invasion in adenocarcinoma and Ki-67 staining in carcinoid tumors. *Arch Pathol Lab Med* 2018; 142 (8): 947–951.

10. Chen YT, Tsai HP, Wu CC, *et al.* High-level sp1 is associated with proliferation, invasion, and poor prognosis in astrocytoma. *Pathol Oncol Res* 2019; 25 (3): 1003–13.

11. Hartmann E, Ott G, Rosenwald A. Molecular outcome prediction in mantle cell lymphoma. *Future Oncol* 2009; 5 (1): 63–73.

12. Mikhalap SV, Lopes F, Shlapatskaya LN *et al.* Monoclonal antibody IPO-38 recognizes a novel nuclear antigen of proliferating cells. In: *Leucocyte Typing VI*. New York: Garland Publishing Inc. 1997: 609–610.

13. Mikhalap SV, Shlapatskaya LN, Berdova AG, *et al.* Monoclonal antibody IPO-38 in evaluation of proliferative activity of tumor cells. *Exp Oncol* 2000; 22 (2): 36–38.

14. Shlapatska LM, Zakharova IA, Mikhalap SV, *et al.* Expression of protein kinases D1 and D 2 in tumor cells of breast cancer. *Oncology* 2008; 10 (3): 316–21 (in Ukrainian).

15. Hao Y, Yu Y, Wang L, *et al.* IPO-38 is identified as a novel serum biomarker of gastric cancer based on clinical proteomics technology. *J Proteome Res* 2008; 7 (9): 3668–77.

16. Heuson JC, Legros N. Influence of insulin deprivation on growth of the 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary carcinoma in rats subjected to alloxan diabetes and food restriction. *Cancer Res* 1972; 32 (2): 226–32.

17. Nandi S, Guzman RC, Yang J. Hormones and mammary carcinogenesis in mice, rats, and humans: a unifying hypothesis. *PNAS* 1995; 92 (9): 3650

18. Zadvornyi TV, Lukianova NY, Borikun TV, *et al.* Effects of exogenous lactoferrin on phenotypic profile and invasiveness of human prostate cancer cells (DU-145 and LNCAP) *in vitro*. *Exp Oncol* 2018; 40 (3): 184–6.

19. Lukianova NY, Andriiv AV, Chekhun VF. Correlation of iodine symporter expression in highly and low malignant cell lines of human breast cancer differed in their sensitivity to doxorubicin. *Exp Oncol* 2016; 38 (3): 169–71.

20. Bezdienieznykh N, Lykhova A, Semesiuk N, *et al.* 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.

THE INSULIN EFFECT ON THE PROLIFERATIVE ACTIVITY OF HUMAN BREAST AND PROSTATE CANCER CELLS VARYING IN MALIGNANCY DEGREES IN VITRO

L.M. Shlapatska, O.U. Lykhova, V.M. Shcherbina,
I.M. Gordiienko

R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology,
Oncology and Radiobiology, National Academy
of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

Summary. Aim: to determine the effect of insulin on the proliferative activity of human breast and prostate cancer cells varying in malignancy degrees in an experimental system *in vitro*. **Object and methods:** the study was performed on human breast cancer (BC) T47D, MDA-MB-231, BCC/P and BC/ML and human prostate cancer (PC) LNCap, Du-145, PC-3 cell lines different in malignancy degree. Determination of the IPO-38 and Ki-67 nuclear antigens of proliferating cells expression was performed using an indirect variant of the immunofluorescence method. Results were examined Beckman Coulter DxFLEx fluorescence flow cytometer, followed by processing the results using the program CytExpert for DxFLEx. The effect of insulin on the proliferative activity of BC and PC cell lines was evaluated by the determining expression level of IPO-38 after 72 h of culturing cells with insulin at a concentration of 0.02 µg/ml (corresponds to its physiological concentration), and 0.5, 2 and 5 µg/ml (correspond the conditions of hyperinsulinemia). **Results:** It was found that insulin at the concentration 0.02 µg/ml stimulate the proliferative activity of low-grade BC cell lines T47D (luminal A subtype) and the androgen-sensitive PC cell line LNCap in 1.5 and 2.6 times respectively. At the same time, insulin's physiological concentration did not influence on proliferative potential of high-grade BC cell lines — MDA-MB-231, BCC/P, BC/ML, and PC Du-145. Under conditions of hyperinsulinemia, the level of IPO-38 expression significantly increases in the low malignancy degree PC cell line LNCap, whereas in cells lines of high malignancy degree Du-145 and PC-3, the expression of IPO-38 did not differ significantly from those in the control. There was detected a decrease in luminal A subtype BC cell line T47D proliferative activity under hyperinsulinemia, while cells of the basal subtype tended to increase their proliferation only when cultured with insulin at a concentration of 5 µg/ml. **Conclusions:** proliferative activity of BC and PC cell lines under the action of insulin depends on their malignancy degree and the insulin concentration in the culture medium

Key Words: proliferative activity, IPO-38, Ki-67, insulin, breast cancer, prostate cancer, cell lines.

Адреса для листування:

Шлапацька Л.М.

03022, Київ, вул. Васильківська, 45

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

E-mail: larisash70@ukr.net

Одержано: 27.09.2021