

О.О. Литвиненко¹
 В.Ф. Коноваленко²
 Ю.В. Швець²
 Т.В. Борікун²
 Т.В. Задворний²
 Н.Ю. Лук'янова²

¹Національний інститут раку

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

Ключові слова: злоякісна фіброзна гістіоцитома, фази клітинного циклу, проліферативна активність, молекулярні маркери, Ki-67, мікроРНК, прогноз.

ПРОГНОСТИЧНІ МОЛЕКУЛЯРНО-БІОЛОГІЧНІ МАРКЕРИ ЗЛОЯКІСНОЇ ФІБРОЗНОЇ ГІСТІОЦИТОМИ

Злоякісна фіброзна гістіоцитома (ЗФГ) є однією з найбільш розповсюджених пухлин м'яких тканин у дорослих. Варіабельність перебігу ЗФГ потребує пошуку додаткових маркерів, асоційованих із розвитком рецидивів цієї нозологічної форми онкопатології. **Мета:** дослідити молекулярно-біологічні та епігенетичні особливості первинних та рецидивуючих ЗФГ. **Об'єкт і методи:** ретроспективне дослідження проведено на клінічному матеріалі 46 хворих на ЗФГ (T1bN0M0; II стадія) із верифікованим патоморфологічним діагнозом. Вміст ДНК в пухлинних клітинах визначали методом проточної цитометрії, вміст у пухлинних клітинах маркера проліферації Ki-67 — імуногістохімічним методом, вміст у клітинах мікроРНК-182, мікроРНК-199a та мікроРНК-34a — методом полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією. **Результати:** досліджено характерні молекулярно-біологічні ознаки та епігенетичні особливості первинних та рецидивуючих ЗФГ. Встановлено, що досліджені рецидивуючі ЗФГ є гетерогенною групою новоутворень, що містить як диплоїдні, так і анеуплоїдні типи пухлин і характеризуються високою проліферативною активністю. Доведено зв'язок показників експресії мікроРНК-34a, -182 та -199a зі ступенем диференціювання та проліферативною активністю ЗФГ. **Висновки:** отримані дані є важливими для розуміння злоякісного фенотипу ЗФГ, а також можуть бути використані для розробки панелі маркерів для прогнозування агресивності перебігу ЗФГ. На підставі отриманих даних розроблено алгоритм прогнозування агресивності перебігу ЗФГ.

Злоякісна фіброзна гістіоцитома (ЗФГ), вперше описана у 1964 р. O'Brien та Stout, є найбільш частою саркомою м'яких тканин людини. У більшості випадків пухлина локалізується у м'яких тканинах тулуба, кінцівок, а також голови і шиї. Зрідка первинна пухлина може навіть розвинути-ся у таких органах, як печінка, легені, селезінка, щитоподібна залоза, товстий кишечник [1–3]. ЗФГ гістологічно характеризується наявністю веретеноподібних фібробластів і гістіоцитів з атиповими плеоморфними гігантськими багатоядерними клітинами. Цей тип пухлин має багато гістопатологічних варіантів (сториформний-плеоморфний, міксоїдний, з гігантськими клітинами, запальний та ангіоматоїдний) [4, 5].

Метою дослідження було визначення молекулярно-біологічних та епігенетичних особливостей первинних та рецидивуючих ЗФГ.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження проведено на операційному матеріалі 46 хворих на ЗФГ T1bN0M0 стадії, що проходили лікування протягом 2008–2018 рр. в Національному інституті раку МОЗ України. Усі пацієнти дали інформовану згоду на використання їх біологічних матеріалів для проведення дослідження. Залежно від клінічного перебігу ЗФГ хворих розподілено

на 2 групи. Першу групу сформували 24 хворих, що мали сприятливий перебіг захворювання, другу — 22 хворих, у яких протягом перших трьох років після верифікації діагнозу було діагностовано рецидив ЗФГ.

Вивчення вмісту ДНК та аналіз клітинного циклу ЗФГ здійснювали за загальноприйнятою методикою, розробленою для парафінових блоків. Спочатку депарафінізували зрізи пухлин з блоків в ксилолі та спирті. Потім додавали 2 мл трипсину та витримували 2 год при 37 °С. Двічі відмивали проби центрифугуванням (1500 об./хв, 5 хв) у 2 мл фізіологічного розчину. В усі проби додавали по 150 мкл бичачого сироваткового альбуміну та по краплинах, з постійним перемішуванням, 4 мл 70% етанолу, інкубували 1 год при 4 °С. Двічі відмивали проби центрифугуванням (1500 об./хв, 5 хв). Додавали 10 мкл РНК-ази, інкубували 40 хв за 37 °С. Далі додавали 30 мкл пропідію йодиду та інкубували ще 30 хв за 37 °С, потім ще 30 хв за кімнатної температури в темряві. Додавали 2 мл фізіологічного розчину, осаджували (5 хв, 1500 об./хв). Надосадову рідину видаляли. Готові проби фіксували 0,1% розчином параформальдегіду та аналізували за допомогою проточного цитофлуориметра Beckman Coulter EPICS® XL (США). Розподіл клітин за фазами клітинного циклу здійснювали за допомогою програми для обробки цитометричних даних ModFit V3.2. Зазначена програма дозволяє

аналізувати плоїдність та розподілення клітин пухлини за фазами клітинного циклу і деталізувати кількість клітин у фазах G0/G1, S та G2 + M. Частку клітин з певним вмістом ДНК на гістограмі обчислювали як відсоток від загальної кількості досліджуваних клітин. Індекс проліферації обчислювали як сумарне число клітин пухлини, які знаходяться у S- і G2 + M-фазах клітинного циклу.

Для імуногістохімічного дослідження ЗФГ застосовували стандартний стрептавідин-біотин-пероксидазний метод та відповідні моноклональні антитіла проти маркера проліферації Ki-67 (клон MIB-1, DakoCytomation, Данія). Імуногістохімічне дослідження проліферативної активності клітин у пухлинах ЗФГ проводили на парафінових зрізах (4–5 мікронів) операційного матеріалу. Для візуалізації результатів реакції застосовували набір реактивів EnVision System (Dako LSAB2 System, Данія) відповідно до рекомендацій виробника, зрізи забарвлювали гематоксиліном Мейера. Пухлини вважали Ki-67-позитивними, якщо кількість клітин, у ядрах яких виявлявся білок Ki-67, становила > 10%. Підраховували кількість клітин з різною інтенсивністю забарвлення на 1000 пухлинних клітин при збільшенні світлооптичного мікроскопа Primo Star (Zeiss, Germany) × 200, × 400. Результати імуногістохімічної реакції оцінювали за наступними критеріями: низька експресія — 10–30% позитивних клітин; середня експресія — 30–60% позитивних клітин; висока експресія — > 60% позитивних клітин.

Метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) зі зворотною транскрипцією використовували для визначення мікроРНК. Виділення тотальної РНК з клітин проводили за допомогою комерційного набору NucleoSpin[®]mRNA FFPE (Macherey-Nagel, Німеччина) за протоколом виробника. Кількість виділеної РНК визначали на спектрофотометрі NanoDrop 2000c Spectrophotometer (ThermoScientific, США). Чистоту виділеної РНК контролювали, використовуючи співвідношення величин оптичного поглинання при довжині хвиль 260 та 280 нм. РНК розчиняли у Tris-EDTA (TE) буфері та зберігали при –20 °С до проведення ПЛР. Зворотню транскрипцію проводили, використовуючи набір Реверта-Л (Амплісенс, Росія) за рекомендаціями виробника. Після проведення реакції вимірювали концентрацію кДНК на спектрофотометрі NanoDrop 2000c Spectrophotometer (ThermoScientific, США). Рівень експресії мікроРНК визначали методом ПЛР у реальному часі на системі виявлення AppliedBiosystems 7500 HT Fast Real-Time PCR System з використанням праймерів, зазначених у табл. 1.

Таблиця 1

Праймери мікроРНК

мікроРНК	Послідовність
RNU48	5'-CTGCGGTGATGGCATCAG-3'
мікроРНК-182	5'-GTTGTTGGCAATGGTAGAACT-3'
мікроРНК-199a	5'-GGGACAGTAGTCTGCACAT-3'
мікроРНК-34a	5'-GTGTGGCAGTGTCTTAGCT-3'
Universal reverse primer	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'

Для приготування реакційної суміші для ПЛР використовували набір Maxima[™] SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (ThermoScientific, США). Склад реакційної суміші представлено в табл. 2, умови проведення реакції описано в табл. 3.

Таблиця 2

Склад реакційної суміші для ПЛР

Компонент реакційної суміші	Кількість на 20 мкл реакційної суміші, мкл
Maxima [™] SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X)	10,00
Вода, очищена від нуклеаз	4,00
Universal reverse primer	0,5
Forward primer (RNU48, мікроРНК-182, -199a, -34a)	0,5
кДНК	5

Таблиця 3

Умови ПЛР (20 мкл зразка)

Крок	Активация білка AmpliTaq Gold	ПЛР	
	HOLD	Цикл (40 циклів)	
		Денатурація	Подовження ланцюга
Час	10 хв	15 с	60 с
Температура (°С)	95	95	60

Відносну експресію досліджуваних мікроРНК обчислювали за методикою K.J. Livak [6]. Для нормалізації результатів було обрано рівень експресії мікроРНК «домашнього господарства» RNU48. Середнє для триплікатів граничне значення циклу (Ct) досліджуваної мікроРНК нормалізували відносно Ct ендогенного контролю. Зміну експресії мікроРНК обчислювали за формулою $2^{-\Delta Ct}$. Результати обробляли в програмі Microsoft Excel і представляли у графічному вигляді.

Статистичну обробку одержаних результатів проводили за допомогою математичної програми медико-біологічної статистики STATISTICA 6.0. Обчислення і порівняння достовірності відмінностей середніх величин здійснювали з використанням t-критерію Стьюдента; достовірними вважали відмінності з вірогідністю не менше 95% ($p < 0,05$). Кореляційний аналіз проводили за допомогою розрахунку коефіцієнта кореляції Пірсона.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

ДНК-цитометрія займає особливе місце серед методів проточної цитометрії. Своєрідність цього підходу полягає в тому, що вміст досліджуваної ДНК у нормальній життєздатній клітині не є постійним, а залежить від фази її життєвого циклу. На різних стадіях клітинного циклу (G0, G1, S, G2 і M) в ядрах клітин міститься різна кількість ДНК, характерна для кожної стадії проліферації. Як правило, більшість нормальних клітин у стані спокою є диплоїдними. За різних форм патології кількість ДНК у клітині, що не ділиться, не завжди буває однаковою (диплоїдною), але може відхилятися від нормального вмісту (анеуплоїдія) у бік зменшення (гіпоплоїдія) або частіше — у бік збільшення (гіперплоїдія). Останнє (гіпердиплоїдія, триплоїдія, тетраплоїдія та ін.) часто виявляють при канцерогенезі [7, 8]. При проведенні

ДНК-аналізу методом проточної цитометрії визначають плідність досліджуваних клітин пухлини та кількість клітин у різних фазах клітинного циклу [9]. В аналізі розподілу нормальних клітин за вмістом ДНК враховується як кількість ДНК у клітинах, що не діляться (плідність), так і зміни кількості ДНК (аж до подвоєння) в клітинах, що діляться [10]. Оскільки пухлини часто є гетерогенними за біологічними властивостями клітин, що їх формують, існує висока ймовірність одночасної присутності в популяції нормальних (диплоїдних) і патологічно змінених (анеуплоїдних) клітин, а також нормальних і змінених клітин, що синтезують ДНК. Очевидно, що аналіз суміші таких субпопуляцій є складним завданням, що здійснюється за допомогою спеціально розроблених методів обчислення.

Анеуплоїдію розглядають як показник біологічної поведінки пухлини, що асоційований з агресивними властивостями пухлини, такими як здатність до інвазивного росту та метастазування.

Вивчення ДНК-цитометричних параметрів показало, що досліджені групи хворих відрізняються значною гетерогенністю за показниками плідності ЗФГ. Як видно з даних, наведених у табл. 4, серед випадків ЗФГ у хворих групи 1 всі досліджені пухлини (100%) були диплоїдними, в той час як хворих групи 2 визначалися як диплоїдні (68%), так і анеуплоїдні (32%) новоутворення.

Аналіз розподілу клітин за фазами клітинного циклу в середньому у групі хворих зі сприятливим перебігом захворювання показав, що основна маса клітин диплоїдних пухлин знаходилася в G0/G1 фазі клітинного циклу, що відповідає 83,7 ± 18,4%. Вміст клітин в G2 + M фазі становив 10,2 ± 12,3%. Важливим показником, який характеризує біологічну поведінку пухлини, є швидкість проліферації клітин, що визначається за вмістом клітин у S-фазі клітинного циклу. У середньому в групі вміст клітин в S-фазі у пацієнтів зі сприятливим перебігом ЗФГ був невисоким і становив 6,1 ± 6,2%.

Аналіз розподілення за фазами клітинного циклу у групі хворих із несприятливим перебігом ЗФГ показав, що кількість клітин диплоїдних пухлин у G0/G1 фазі клітинного циклу була меншою, ніж у пухлинах хворих групи 1 (69,7 ± 6,2%). Вміст клітин у G2 + M фазі у групі хворих із несприятливим перебігом ЗФГ практично не відрізнявся від показника у групі пацієнтів зі сприятливим перебігом захворювання і становив 12,1 ± 5,5%. Водночас встановлено, що кількість клітин в S-фазі клітинного циклу у пухлинах хворих із несприятливим перебігом ЗФГ була у 3 рази більшою у порівнянні з пухлинами хворих групи 1 (див. табл. 4).

Таблиця 4

Розподіл диплоїдних та анеуплоїдних клітин за фазами клітинного циклу та індекс проліферації ЗФГ пацієнтів із різним перебігом захворювання

Групи хворих		G0/G1 (%)	G2 + M (%)	S-фаза (%)	Індекс
1	Диплоїдні (24/100)	83,7 ± 18,4	10,2 ± 12,3	6,1 ± 6,2	16,2 ± 18,4
2	Диплоїдні (15/68)	69,7 ± 6,2	12,1 ± 5,6	18,2 ± 2,3*	30,3 ± 10,2*
		100	0	0	0

*p < 0,05 порівняно з пацієнтами зі сприятливим перебігом ЗФГ.

При аналізі цитометричних показників анеуплоїдних пухлин у групі хворих із несприятливим перебігом захворювання визначено, що середній вміст анеуплоїдних клітин у пухлинах становив 21,1 ± 8,0%.

Певну гетерогенність нами також визначено щодо індексу проліферації пухлин серед хворих досліджених груп. Як видно з даних, наведених у табл. 4, найвищі показники індексу проліферації встановлено у групі хворих на ЗФГ із несприятливим перебігом захворювання у диплоїдних новоутвореннях (30,3 ± 10,2), в той час як у пацієнтів групи 1 ці показники були нижчими і становили 16,2 ± 18,4.

Відомо, що універсальним маркером для оцінки клітинного циклу є білок Ki-67. Ki-67 — ядерний білок, який експресується в усіх фазах клітинного циклу (G1, G2, S та M), за винятком G0. Антитіла до Ki-67 виявляють клітини, які проліферують і знаходяться в різних фазах циклу (окрім G0). Ki-67 являє собою протеїн, який має короткий термін напівжиття і руйнується протягом 1,5–2 год. Тому антитіла до Ki-67 виявляють тільки клітини, що діляться, оскільки Ki-67 не встигає накопичуватися і не залишається у клітинах у стані спокою. Ki-67 представлений двома різними формами з молекулярною масою 320 і 359 кДа. Білок Ki-67 в основному пов'язаний з хромосомами, виявляється в ділянці теломер, центромер, в ядерцях. Функція цього білка важлива для транскрипції рибосомальної РНК. Інактивація функції Ki-67 призводить до блокування синтезу рибосомальної РНК у клітині. У точці G0 клітинного циклу білок не виявляється, як і на початку G1-фази клітинного циклу. Поява Ki-67 відбувається в кінці фази G1, його рівень поступово наростає протягом S-фази і досягає максимуму до мітозу. Тому Ki-67 є надійним індикатором проліферації практично у всіх новоутвореннях людини [11, 12].

Враховуючи зазначене, на наступному етапі нами проведено порівняльне дослідження проліферативної активності ЗФГ пацієнтів із різним перебігом захворювання. Аналіз отриманих даних дозволив встановити, що досліджені групи хворих відрізняються за проліферативною активністю ЗФГ.

Показано, що проліферативна активність диплоїдних ЗФГ хворих зі сприятливим перебігом патологічного процесу була низькою — 25,0 ± 2,1% (табл. 5, рис. 1, а, б). У клітинах анеуплоїдних ЗФГ пацієнтів з несприятливим перебігом захворювання цей показник був низьким і становив 2,6 ± 1,4% (див.

табл. 5; рис. 1, *в, г*), в той час як у клітинах більшості диплоїдних ЗФГ визначався високий рівень експресії білка Ki-67 — $68,9 \pm 3,3\%$ (див. табл. 5; рис. 1, *г, д*).

Таблиця 5

Проліферативна активність ЗФГ хворих із різним перебігом пухлинного процесу

Групи хворих	Тип пухлини	Експресія Ki-67 (%)
1	Диплоїдні	$25,0 \pm 2,1$
2	Анеуплоїдні	$2,6 \pm 1,4$
	Диплоїдні	$68,9 \pm 3,3^*$

* $p < 0,05$ порівняно з пацієнтами зі сприятливим перебігом ЗФГ.

Для з'ясування епігенетичної складової у формуванні ступеня злоякісності ЗФГ на наступному етапі нами проаналізовано рівень експресії мікроРНК, що беруть участь у регуляції клітинного циклу та проліферативної активності зазначених новоутворень.

Вивчення показників експресії пухлинних мікроРНК у пацієнтів із саркомами м'яких тканин та на-

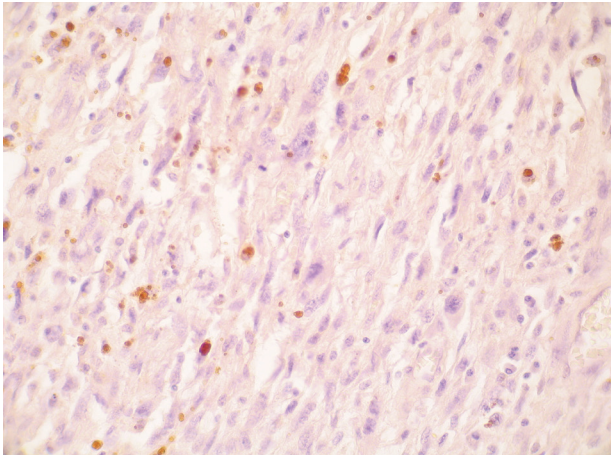
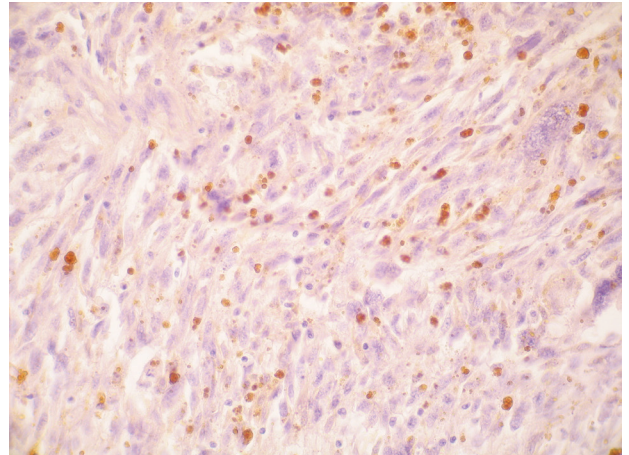
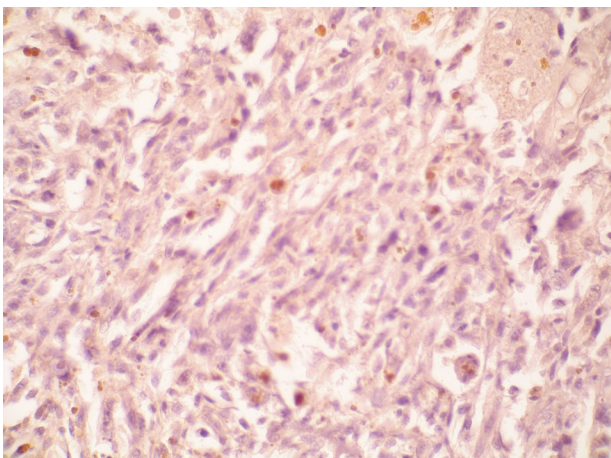
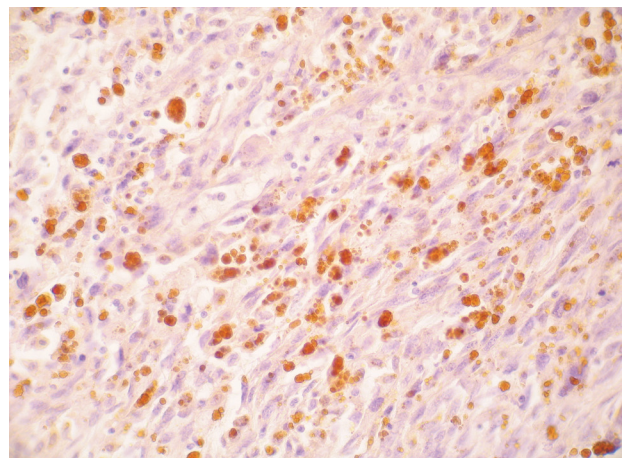
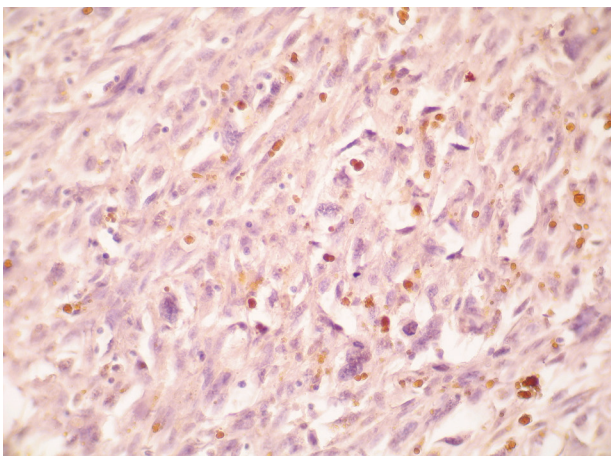
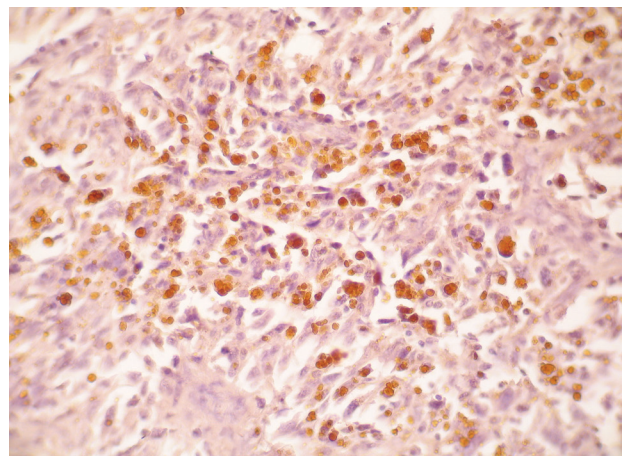
*а**б**в**г**е**д*

Рис. 1. Проліферативна активність пухлин хворих на ЗФГ зі сприятливим (*а, б*) та несприятливим (*в, г, г, д*) перебігом захворювання. Імуногістохімія, дофарбовування гематоксиліном. $36. \times 400$

копичений досвід визначення мікроРНК як прогностичних маркерів для пухлин інших локалізацій розкривають їхній потенціал для клінічного застосування. До того ж, уже існують дані щодо прогностичної значущості мікроРНК, що свідчить про їх потенціал як нових біомаркерів сарком м'яких тканин.

Зокрема, M. Guled та співавтори провели профілювання мікроРНК на серії зразків ЗФГ для ідентифікації конкретних мікроРНК, функціонування яких може мати значення для розвитку пухлин. Як наслідок, виявлено 38 мікроРНК, експресія яких суттєво відрізнялася порівняно з контрольними зразками. Зокрема, рівні мікроРНК-126, -223, -451, та -1274b були значно підвищені ($y \geq 2$ разів), а рівні мікроРНК-100, -886-3p, -1260 та -1274a — суттєво знижені ($y \geq 3$ разів) у порівнянні з контрольними зразками [13]. Висока експресія мікроРНК-182 у пухлинній тканині асоціюється з розвитком віддалених метастазів [14].

МікроРНК — це одноланцюгові некодуєчі РНК довжиною 21–24 нуклеотиди. Вони здатні зв'язуватися з 3'-нетрансльованою ділянкою (3' UTR) багатьох РНК-мішеней, що робить їх важливою ланкою онкогенезу. Доведено, що численні мікроРНК кодуються геномними ділянками, пов'язаними з розвитком пухлин, зокрема, онкогенні властивості мікроРНК-182 на сьогодні вивчено в пухлинах різного генезу. Відомо, що мікроРНК-182 регулює безліч онкосупресорних генів, включаючи *BRCA1*, *RECK*, *PFN1*, *FOXO1*, *ZEB1* та ін. [14]. МікроРНК-199a відіграє важливу роль у проліферації та диференціюванні м'яких тканин, зокрема гладких м'язів. Її мішенями є такі гени, як *LIN7C*, *ARHGAP12*, *PALSI*, *RND1* та *PVRL1*, а порушення експресії мікроРНК-199a асоційовані з патологічними змінами клітинного поділу, розбалансуванням сигнальних каскадів, зокрема SMAD- та WNT-опосередкованих [15]. На відміну від мікроРНК-182 та -199a, мікроРНК-34a є онкосупресорною. Вона є одним з регуляторів клітинного циклу і бере участь у передачі сигналів р53-опосередкованого каскаду. Зниження її рівнів асоціюється з дедиференціюванням пухлинних клітин, оскільки її мішенями є такі онкогени, як *NANOG*, *CD44* та *NOTCH* [16, 17].

Для визначення експресії використовували 3 мікроРНК, які, за даними літератури, потенційно могли бути асоційовані з прогресією ЗФГ. Попри те що рівень мікроРНК у досліджених групах пацієнтів був достатньо гетерогенним, а характер експресії різноманітним та індивідуальним для кожного пацієнта, в нашому дослідженні вдалося встановити низку закономірностей.

Зокрема, у 90,0% усіх досліджених пацієнтів рівень експресії мікроРНК-182 був підвищеним і становив 3 ум. од. (мінімальне значення — 1,8 ум. од., максимальне — 4,4 ум. од.); у 78,0% — рівень мікроРНК-199a перевищував 3 ум. од. (середній показник — 4,6 ум. од. при мінімальному значенні 2,1 ум. од.,

максимальному — 5,9 ум. од.) При цьому рівні мікроРНК-34a становили < 1 ум. од. у 95% зразків (середнє значення — 0,6 ум. од., мінімальне — 0,02 ум. од., максимальне — 1,1 ум. од.) (рис. 2).

Визначено, що пухлини хворих на ЗФГ зі сприятливим та несприятливим перебігом відрізняються за профілем експресії досліджених мікроРНК. Як видно з даних, наведених на рис. 3, характерною ознакою пухлин хворих на ЗФГ із несприятливим перебігом було підвищення рівня експресії мікроРНК-182 ($4,5 \pm 0,9$ ум. од.) та мікроРНК-199a ($5,0 \pm 0,6$ ум. од.) на тлі зниження рівня експресії мікроРНК-34a ($0,5 \pm 0,09$ ум. од.), тоді як аналогічні показники у хворих на ЗФГ, що мали сприятливий перебіг захворювання, були нижчими у 1,5 та 2 рази відповідно для мікроРНК-182 та -199a та вищими на 56% — для мікроРНК-34a.

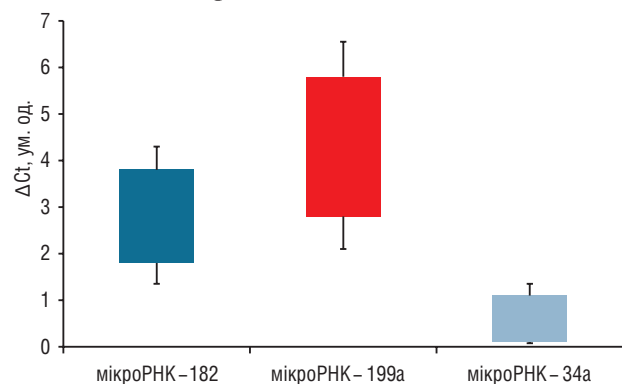


Рис. 2. Показники експресії мікроРНК у пухлинній тканині пацієнтів із ЗФГ

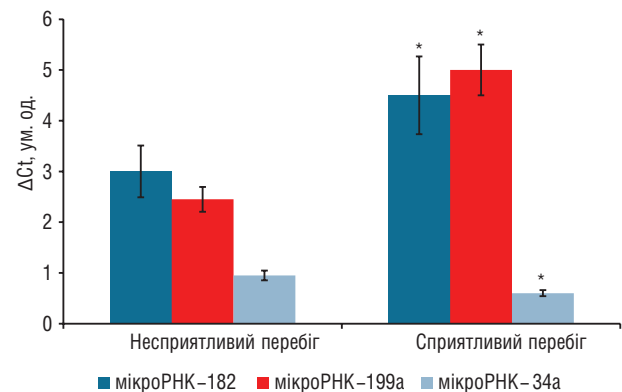


Рис. 3. Показники експресії мікроРНК у хворих на ЗФГ зі сприятливим та несприятливим перебігом захворювання. * $p < 0,05$ порівняно з пацієнтами зі сприятливим перебігом ЗФГ

Результати аналізу кореляційних зв'язків експресії мікроРНК-182, -199a та -34a із проліферативною активністю та ступенем диференціювання пухлин обох досліджених груп пацієнтів представлено в табл. 6. Як видно з наведених даних, експресія мікроРНК-199a та -182 прямо корелює із проліферативною активністю та ступенем диференціювання ЗФГ обох досліджених груп пацієнтів. В той час як рівень мікроРНК-34a, навпаки, зворотно корелює із зазначеними показниками.

Таблиця 6

Зв'язок експресії мікроРНК-182, -199а та -34а із проліферативною активністю та ступенем диференціювання ЗФГ (г)

МікроРНК	Сприятливий перебіг		Несприятливий перебіг	
		Ступінь		Ступінь
мікроРНК-182	0,58	0,56	0,57	0,59
мікроРНК-199а	0,45	0,54	0,58	0,54
мікроРНК-34а	-0,6	-0,55	-0,6	-0,58

При вивченні зв'язку експресії мікроРНК-199а, -182 і -34а з показниками безрецидивної виживаності хворих на ЗФГ також встановлено пряму кореляцію експресії мікроРНК-182, -199а та обернену кореляцію мікроРНК-34а із виникненням рецидивів захворювання у 3-річний термін ($r = 0,59$, $r = 0,68$, $r = -0,71$).

ВИСНОВКИ

1. Визначено характерні молекулярно-біологічні ознаки та епігенетичні особливості первинних та рецидивуючих ЗФГ.

2. Встановлено, що досліджені рецидивуючі ЗФГ є гетерогенною групою новоутворень з анеуплоїдними та диплоїдними пухлинами з високим індексом проліферації і експресією Ki-67.

3. Доведено зв'язок показників експресії мікроРНК-34а, -182 та -199а зі ступенем диференціювання та проліферативною активністю ЗФГ, а також із ризиком виникнення рецидиву захворювання.

4. Отримані дані свідчать про можливість використання розробленої панелі маркерів для прогнозування агресивності перебігу ЗФГ. На підставі отриманих даних розроблено алгоритм прогнозування агресивності перебігу ЗФГ.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

- Makis W, Samji K, Hung RW, Deschenes J. Pleomorphic spindle cell sarcoma (PSCS) (formerly known as malignant fibrous histiocytoma, MFH) of the spleen, mimics an atypical haemangioma on ^{99m}Tc -RBC, CT and Ultrasound: staging with ^{18}F -FDG PET/CT. *BJR Case Rep* 2017; 3 (3): 20150519.
- Wang Y, Huang L, Lv H, et al. Primary malignant fibrous histiocytoma of the thyroid: two case reports and review of the literature. *J Ultrasound Med* 2017; 36 (3): 665–9.
- Wuyang J, Miner Z, Yan Y, et al. Primary malignant fibrous histiocytoma of the colon: A case report and review of the literature. *Mol Clin Oncol* 2016; 4: 1006–8.
- Coşgun T, Tezel Y, Akyl M, et al. Primary pulmonary malignant fibrous histiocytoma. *Turk Thorac J* 2017; 18: 54–6.
- Xiongfei L, Renwang L, Tao S, et al. Primary pulmonary malignant fibrous histiocytoma: case report and literature review. *J Thorac Dis* 2017; 9 (8): 702–8.
- Livak KJ, Kenneth J, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ method. *Methods* 2008; 25 (4): 402–8.
- Chitturi RT, Nirmal RM, Sunil PM, et al. Evaluation of ploidy status using DNA-image cytometry of exfoliated mucosal cells in oral lichen planus. *J Cytol* 2014; 31 (3): 131–5.
- Kim Y, He YY. Ultraviolet radiation-induced non-melanoma skin cancer: Regulation of DNA damage repair and inflammation. *Genes Dis* 2014; 1 (2): 188–98.

33. Owens MA, Loken MR. Flow cytometry principles for clinical laboratory practice. Quality Assurance for Quantitative Immunophenotyping. Wiley-Liss: Inc, 1995. 120 p.

35. Michels J, Duigou F, Marnay J, et al. Flow cytometry in primary breast carcinomas: prognostic impact of multiploidy and hypodiploidy. *Cytometry Part B. Clinical Cytometry* 2003; 55B: 37–45.

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

53. Sobacki M, Mrouj K, Colinge J, et al. Cell-cycle regulation accounts for variability in Ki-67 expression levels. *Cancer Res* 2017; 77 (10): 2722–34.

61. Guled M, Pazzaglia L, Borze I, et al. Differentiating soft tissue leiomyosarcoma and undifferentiated pleomorphic sarcoma: A miRNA analysis. *Genes, Chromosomes Cancer* 2014; 53: 693–702.

71. Sachdeva M, Cardona DM, Kirsch DG. MicroRNA-182 drives metastasis of primary sarcomas by targeting multiple genes. *J Clin Invest* 2014; 124 (10): 4305–19.

75. Dhungel B, Ramlogan-Steel CA, Layton CJ, Steel JC. MicroRNA199a-based post-transcriptional detargeting of gene vectors for hepatocellular carcinoma. *Mol Ther Nucleic Acids* 2018; 13: 78–88.

84. Wang Y, Cheng Q, Liu J, Dong M. Leukemia stem cell-released microvesicles promote the survival and migration of myeloid leukemia cells and these effects can be inhibited by microRNA34a overexpression. *Stem Cells Int* 2016; 2016. Article ID 9313425.

103. Xie W, Wang L, Sheng H, et al. Metformin induces growth inhibition and cell cycle arrest by upregulating microRNA34a in renal cancer cells. *Med Sci Monit* 2017; 23: 29–37.

PROGNOSTIC MOLECULAR-BIOLOGICAL MARKERS OF MALIGNANT FIBROUS HISTIOCYTOMA

O.O. Litvinenko¹, V.F. Konovalenko², Yu.V. Shvets², T.V. Borikun², T.V. Zadvornyi², N.Yu. Lukianova²

¹National Cancer Institute

²R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology, NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

Summary. Malignant fibrous histiocytoma (MFH) is one of the most common tumors of soft tissues in adults. The variation in the course of MFH requires the search for additional markers associated with the development of relapses of this nosological entity of oncopathology. **Aim:** to investigate the molecular-biological and epigenetic features of primary and recurrent MFH. **Materials and methods:** a retrospective study was conducted on the clinical material of 46 patients with MFH (T1bN0M0; stage II) with a verified pathomorphological diagnosis of MFH. The content of DNA in tumor cells was determined by flow cytometry, the content in the tumor cells of the proliferation marker KI-67 was determined by immunohistochemical method, the content in the cells of miR-182, miR-199a and miR-34a was determined by reverse transcription polymerase chain reaction. **Results:** characteristic of molecular-biological signs and epigenetic features of primary and recurrent MFH were studied. It has been found that recurrent MFH is a heterogeneous neoplasm group that contains both diploid and aneuploid tumor types and is characterized by high proliferative activity. The association of the expressions of miR-34a, -182 and