

**Н. А. Шуканова¹, М. А. Мартынова¹, И. М. Бушмакина¹, М. М. Молчан¹,
М. А. Брич², Н. А. Козловская³, Е. В. Шаповал³**

¹*Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь*

²*Институт тепло- и массообмена НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь*

³*Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии
им. Н. Н. Александрова, Минск, Республика Беларусь*

АХЭ ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ИНДИВИДУАЛИЗАЦИИ НЕОАДЬЮВАНТНОЙ ПОЛИХИМИОТЕРАПИИ

Аннотация. Проведен сравнительный анализ влияния химиопрепаратов на ферментативную активность клеток в первичной культуре из злокачественной ткани молочной железы пациентки и клинического ответа раковой опухоли на неoadъювантную полихимиотерапию (НПХТ) теми же препаратами. В исследованиях использован тест по оценке чувствительности рака молочной железы (РМЖ) к химиопрепаратам на основе определения активности клеточной ацетилхолинэстеразы (АХЭ). Сопоставлены результаты влияния химиопрепаратов в культуре и клинического обследования пациенток с РМЖ различных молекулярно-генетических подтипов: люминального А, люминального В, Her2-позитивного и трижды негативного, или базальноподобного. Установлено, что совпадение результатов по ингибированию активности АХЭ раковых клеток препаратами в условиях *in vitro* и степени регрессии опухоли пациентки после НПХТ (*in vivo*) при маммографии составляет 69 %, при мануальном обследовании – 77, при ультразвуковом (УЗИ) – 62 %. Наибольшее совпадение исследуемых показателей получено для самых агрессивных молекулярно-генетических подтипов РМЖ.

Разработанные нами молекулярные критерии оценки влияния химиопрепаратов на клетки опухоли в условиях *in vitro* являются дополнительным прогностическим фактором и доступны к применению в клинических лабораториях при оптимизации тактики лечения пациенток.

Ключевые слова: рак молочной железы, первичная культура злокачественной ткани молочной железы, ацетилхолинэстераза опухолевых клеток, ответ опухоли на неoadъювантную полихимиотерапию

Для цитирования: АХЭ тест-система для индивидуализации неoadъювантной полихимиотерапии / Н. А. Шуканова [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. мед. наук. – 2017. – № 3. – С. 100–106.

**N. A. Shukanova¹, M. A. Martynova¹, I. M. Bushmakina¹, M. M. Molchan¹, M. A. Britch²,
N. A. Kazlouskaya³, E. V. Shapova³**

¹*Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus*

²*Heat and Mass Transfer Institute of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus*

³*N. N. Alexandrov National Cancer Center of Belarus, Minsk, Republic of Belarus*

ACHE TEST-SYSTEM FOR INDIVIDUALIZATION OF NEOADJUVANT POLYCHEMOTHERAPY

Abstract. A comparative analysis of the chemotherapy drug effects on the enzymatic activity of breast cancer (BC) cells in a tumor primary culture of BC patients and a clinical response of a cancer tumor to neoadjuvant polychemotherapy (NPHT) with the use of the same drugs were performed. We used our developed test to assess the sensitivity of BC cells to chemotherapy drugs by determining the cell activity of acetylcholinesterase (AChE). The effect of chemotherapeutic drugs in culture and the clinical examination of BC patients of various molecular-genetic subtypes (Luminal A, Luminal B, Her2-positiv and Tripl-negativ or Basal-like) were compared.

It is found that the coincidence of the results on the sensitivity of tumor cells *in vitro* and the degree of the patient's tumor regression after NPHT averaged for X-ray examination is 69 %, manual – 77 % and US – 62 %. The biggest coincidence of the studied parameters was obtained for the most aggressive molecular-genetic subtypes of BC.

Our developed test of assessment of the molecular chemotherapy effect on cells *in vitro* is the prognostic factor inexpensive and affordable for use in clinical laboratories when optimizing the patient treatment strategy.

Keywords: breast cancer, acetylcholinesterase activity, breast cancer primary culture, tumor response to neoadjuvant polychemotherapy

For citation: Shukanova N. A., Martynova M. A., Bushmakina I. M., Molchan M. M., Britch M. A., Kazlouskaya N. A., Shapova E. V. AChE test-system for individualization of neoadjuvant polychemotherapy. *Vestsi Natsyonal'noi akademii navuk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2017, no. 3, pp. 100–106 (in Russian).

Введение. Среди онкологических заболеваний у женщин рак молочной железы (РМЖ) занимает лидирующее место (16 % от всех случаев рака) и является самой распространенной причиной смерти пациенток в возрасте от 45 до 55 лет. Мировая статистика свидетельствует о неизменном увеличении числа новых фиксируемых случаев РМЖ. Ежегодно только в Беларуси первично верифицированная злокачественная опухоль молочной железы определяется более чем у 3,5 тыс. женщин, при этом в 25 % случаев диагностируется последняя стадия. Клеточная гетерогенность РМЖ затрудняет выбор адекватной индивидуальной терапии заболевания.

В результате изучения молекулярно-биологических особенностей все опухоли РМЖ разделены на две большие группы – базальные и люминальные, происходящие соответственно из базального и люминального эпителия и отличающиеся друг от друга по экспрессии специфических кератинов. Более детальное исследование различных вариантов РМЖ позволило создать классификацию на основе наличия и/или отсутствия рецепторов эстрогенов (ER), прогестерона (PR) и рецептора человеческого эпидермального фактора роста второго типа (Her2/neu) в злокачественной ткани. При использовании методов генного анализа выделены следующие молекулярно-генетические подтипы РМЖ: люминальный А (ER+ и/или PR+/Her-2/neu–), люминальный Б (ER+ и/или PR+/Her-2/neu+), Her2-позитивный (ER–/PR–/Her-2/neu+), базальноподобный (тройной негативный) (ER–/PR–/Her-2/neu–) [1], различающиеся по прогнозу и чувствительности к противоопухолевым лекарственным средствам. Внутри подгруппы базальноподобного рака недавно выделен вариант claudin-low, отличающийся высокой экспрессией стволовых клеток с антигенами CD44⁺CD24[–] [2].

Наряду с молекулярно-генетическими известны биохимические маркеры степени злокачественности раковых клеток солидных опухолей, среди которых следует выделить активность холинэстераз, принадлежащих к классу гидролаз карбоновых кислот. Эти ферменты условно можно разделить на два типа: ацетилхолин-ацетилгидролазу (КФ 3.1.1.7), которая гидролизует преимущественно ацетилхолин и чаще всего называется ацетилхолинэстеразой (АХЭ), и ацилхолин-ацилгидролазу (КФ 3.1.1.8), гидролизующую такие сложные эфиры холина, как бутирилхолин и пропионилхолин [3]. Известно, что основной функцией АХЭ в возбудимых тканях является терминация синаптической трансдукции. Однако в последние годы накоплен большой экспериментальный материал, свидетельствующий о том, что этот фермент экспрессируется во многих типах невозбудимых тканей, является белком адгезии или ускоряет сборку бета-амилоидов в фибриллы [4], а также принимает участие в процессах пролиферации, дифференцировки и миграции клеток [5]. Активность АХЭ в раковых клетках солидных опухолей нередко коррелирует со степенью злокачественности новообразований. Показано, что ее активность в клетках менингиомы и глиомы в несколько раз выше, чем в клетках соседней здоровой ткани мозга [6]. Похожие аномальные свойства фермент проявляет в карциномах почки [7], легкого [8] и молочной железы [9]. Например, в клетках РМЖ активность АХЭ в 2 раза выше, чем в клетках соседней здоровой ткани, что позволяет положить в основу разработки одного из прогностических методов оценки эффективности лечения пациенток изменение активности АХЭ под действием химиотерапевтических препаратов в условиях *in vitro* [10].

Цель настоящей работы – сравнительный анализ влияния химиопрепаратов на активность ацетилхолинэстеразы в злокачественно трансформированных клетках первичной культуры из ткани молочной железы и персонализированного ответа раковой опухоли на неoadьювантную полихимиотерапию с использованием этих же лекарственных средств.

Материалы и методы исследования. Исследуемый материал получали из трепан-биоптатов опухоли пациенток с цитологически верифицированным диагнозом РМЖ. Во всех случаях выполнено стандартное гистологическое исследование и определен уровень экспрессии гормональных рецепторов ER, PR и показатель Her-2/neu. Рецепторный статус оценивали методом иммуногистохимии с применением антител к ER, PR и рецепторам Her-2/neu фирмы DAKO по стандартным инструкциям, рекомендованным фирмой-производителем. Первичную культуру из трепан-биоптатов опухолевой ткани получали, гомогенизируя ее в слабо притертом стеклянном гомогенизаторе в среде RPMI-1640, содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, 1 % L-глутамина и 40 мг/л гентамицина. Полученный гомогенат пропускали через капроновый фильтр и разлива-

ли в стерильные стеклянные флаконы объемом 10 мл. Образцы культивировали в суховоздушном CO_2 -инкубаторе HERAcCell 150 во влажной атмосфере при постоянном давлении 5 % CO_2 и 37 °C в течение 48 ч в отсутствие и в присутствии противоопухолевых лекарственных средств групп AC (доксорубин + циклофосфан) или AT (доксорубин + паклитаксел), в зависимости от того, какая группа лекарств была впоследствии назначена для неoadъювантной полихимиотерапии (НПХТ). Лекарственные средства вносили в первичную культуру в концентрациях, соответствующих клинически значимым дозам, применяемым в онкологической практике. В условиях *in vitro* для доксорубина концентрация составляла 20 мг/л, для циклофосфана – 240, для паклитаксела – 70 мг/л [11, 12].

После культивирования клетки трижды отмывали в забуференном фосфатами физиологическом растворе (ЗФР, pH 7,4). Активность АХЭ определяли стандартным методом с использованием реактива Элмана и выражали в относительных единицах увеличения оптической плотности раствора (ΔD) в минуту (t) в пересчете на 1 мг белка клеточной суспензии ($[c_6]$): $\Delta D/t \cdot [c_6]$ [13]. Концентрацию белка оценивали по стандартному методу Лоури [14]. Фотометрические измерения выполняли на спектрофотометре СРЕКОЛ 11. Статистическую обработку результатов осуществляли методами вариационной статистики с использованием критерия Стьюдента.

Результаты и их обсуждение. АХЭ в первичной культуре злокачественно трансформированных клеток нелеченого РМЖ различных молекулярно-генетических подтипов была определена у 73 пациенток. Данные, представленные на рис. 1, свидетельствуют о том, что после культивирования без химиопрепаратов активность АХЭ в клетках люминального А подтипа составила $34,0 \pm 6,3$ ($n = 10$), в клетках люминального Б подтипа – $78,1 \pm 16,3$ ($n = 12$), Her2-позитивного подтипа – $95,68 \pm 19,04$ ($n = 18$), базальноподобного подтипа – $77,62 \pm 21,31$ ($n = 33$). Известно, что опухоли люминального А подтипа наименее агрессивны и характеризуются лучшим прогнозом по сравнению с рецептор-негативными злокачественными новообразованиями. Агрессивные опухоли люминального Б подтипа имеют значительно худший прогноз и большую вероятность рецидивов, чем люминального А подтипа. Базальноподобные опухоли отличаются высоким пролиферативным индексом, значительной агрессивностью и большой вероятностью развития метастатических форм. Выживаемость пациенток в этих группах ниже, чем в группах люминальных подтипов. Представленные на рис. 1 результаты свидетельствуют о том, что среднее значение

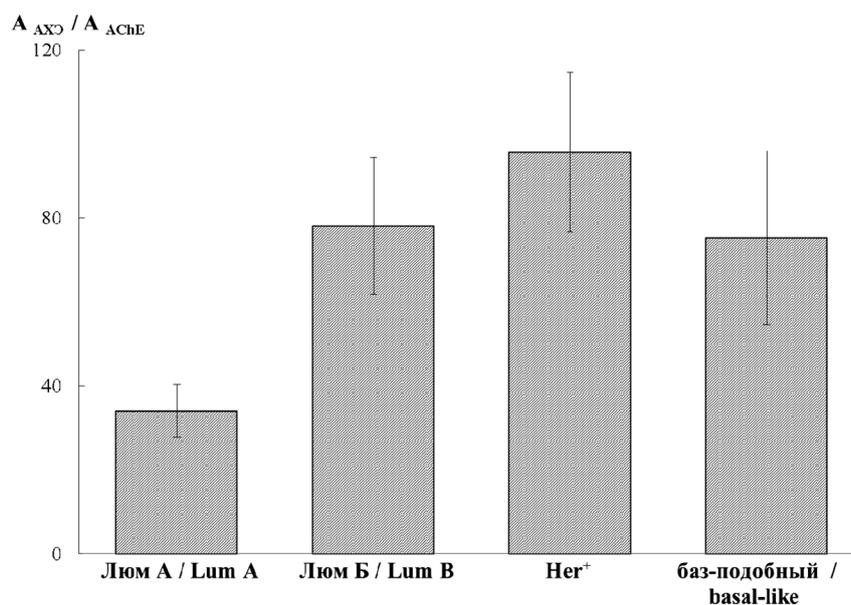


Рис. 1. Активность АХЭ (отн. ед.) в клетках РМЖ различных молекулярно-генетических подтипов. Уровень значимости различий активности АХЭ люминального А подтипа и более агрессивных подтипов люминального Б, трижды негативного и базальноподобного составляет $p \leq 0,05$

Fig. 1. AChE activity (relative units) in the cells of different molecular-genetic subtypes of BC. The level of difference significance of luminal A and more aggressive subtypes of luminal B, Her2-positiv, basal-like AChE activity is $p \leq 0.05$

активности АХЭ в клетках наименее агрессивного люминального А подтипа приблизительно в 2 раза меньше, чем в клетках остальных, более агрессивных подтипов рака ($p \leq 0,05$).

Большой разброс величин активности фермента в клетках базальноподобного рака можно объяснить гетерогенными молекулярными особенностями этих опухолей. Le Du с сопр. [15] проанализировали этот подтип с использованием геномных и транскриптомных технологий и выделили в нем еще 5 различных подгрупп:

- 1) базальноподобный с дефицитом репарации ДНК или сигнальных путей фактора роста;
- 2) мезенхимальноподобный с эпителиально-мезенхимальным переходом и свойствами раковых стволовых клеток;
- 3) иммунносвязанный трижды негативный подтип;
- 4) люминально-апокринный трижды негативный с гиперэкспрессией андрогенных рецепторов;
- 5) Her2-обогащенный трижды негативный подтип.

Опухоли этих подгрупп различаются по сигнатуре экспрессии генов, биологическим функциям клеток и клиническому исходу заболевания, при котором особое значение приобретает целевая терапия. Нами установлено, что именно в первичной культуре из биоптатов опухоли базальноподобного подтипа активность АХЭ имела наибольшие различия.

Таким образом, полученные нами экспериментальные данные свидетельствуют о корреляции между активностью АХЭ в клетках злокачественной опухоли молочной железы и степенью агрессивности, пролиферативной активностью и вероятностью метастазирования.

Основной задачей исследования являлось сопоставление чувствительности злокачественных клеток в первичной культуре из ткани нелеченого РМЖ к химиопрепаратам с данными клинического обследования пациентки после НПХТ с использованием тех же лекарств. В качестве критерия оценки чувствительности клеток РМЖ к противоопухолевым препаратам в условиях *in vitro* выбрана активность АХЭ. Степень регрессии опухоли после НПХТ оценивали методами мануального обследования, маммографии и ультразвукового исследования (УЗИ) и выражали в процентах.

Чувствительность или резистентность опухоли РМЖ *in vitro* к используемым химиопрепаратам оценивали путем сравнения активности АХЭ опухолевых клеток после культивирования в присутствии химиопрепаратов (A_x) с активностью АХЭ таких же клеток после культивирования без препаратов (A_k – контроль). Так как в области измерения активности АХЭ оптическая плотность суспензии клеток линейно зависела от количества гидролизованного субстрата, процедуру пересчета активности фермента в общепринятых единицах (нмоль/мг белка в минуту) упростили до оценки величин $N_k = \Delta D_k / t \cdot [c_0]$ и $N_x = \Delta D_x / t \cdot [c_0]$, т. е. определяли увеличение оптической плотности ΔD в минуту, пересчитанное на концентрацию белка в суспензии клеток, культивированных без (N_k) или в присутствии (N_x) химиопрепаратов. При $N_x / N_k < 1$ наблюдалось ингибирование активности АХЭ при действии химиопрепаратов на опухолевые клетки в культуре, и чем ближе была эта величина к нулю, тем более выраженными были положительные эффекты лечения [10]. При $N_x / N_k \geq 1$ химиопрепараты в первичной культуре или не влияли на опухолевые клетки, или усиливали их пролиферативную активность [10].

Определяемая различными клиническими методами степень регрессии опухоли после НПХТ не всегда однозначна. Например, у одной пациентки с люминальным А подтипом опухоли мануальное обследование после лечения показало, что размеры опухоли не изменились, при маммографии обнаружено ее увеличение на 11 %, а по данным УЗИ регрессия составила 63 %. У другой пациентки с Her2-позитивным подтипом при мануальном обследовании обнаружена регрессия 50 %, данные маммографии свидетельствовали о росте опухоли на 59 %, а по данным УЗИ регрессия составила 58 %. Следует отметить, что при ответе опухоли на НПХТ с использованием лучевых методов, охарактеризованном как полная регрессия, при гистологическом анализе в операционном материале часто выявляются элементы злокачественных образований [16, 17].

Нам удалось сопоставить влияние химиопрепаратов на опухолевые клетки в первичной культуре и результаты клинического обследования после НПХТ 42 пациенток, из них у 8 была обнаружена опухоль люминального А подтипа, у 6 – люминального Б подтипа, у 10 – Her2-позитивного подтипа и у 20 – трижды негативного подтипа. Совпадение ингибирования химиопрепаратами активности АХЭ клеток в условиях *in vitro* и степени регрессии опухоли пациентки после НПХТ

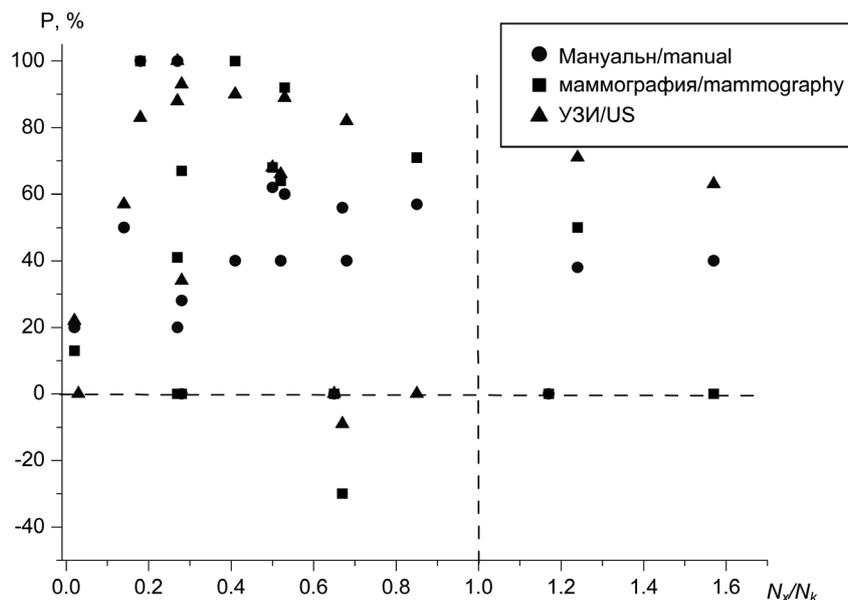


Рис. 2. Результаты сравнительного анализа действия химиопрепаратов на активность АХЭ в первичной культуре (N_x/N_k) и определяемая различными клиническими методами степень регрессии (P, %) опухоли трижды негативного подтипа после НПХТ

Fig. 2. Results of a comparative analysis of the chemotherapy action of the AChE activity in primary culture (N_x/N_k) and the regression degree (P, %) of the tumor of a triple negative subtype after NPHT defined by various clinical methods

при маммографии в среднем составило 69 %, при мануальном обследовании – 77, при УЗИ – 62 %. На рис. 2 представлены данные сравнительного анализа действия химиопрепаратов на активность АХЭ в первичной культуре и определяемые различными клиническими методами изменения после НПХТ размеров опухоли трижды негативного подтипа (20 пациенток). Видно, что основное количество точек находится в области $N_x/N_k < 1$ (ось абсцисс) и положительных величин регрессии (P, %, ось ординат), что подтверждает прогностическую значимость разработанной нами тест-системы.

Заключение. Полученные нами результаты влияния противоопухолевых средств на активность АХЭ в первичной культуре клеток РМЖ различных молекулярно-генетических подтипов и их сопоставление с клиническими показателями регрессии опухоли после НПХТ свидетельствуют о высокой степени корреляции. Поскольку разработанный нами тест по оценке чувствительности РМЖ к химиопрепаратам на основе определения активности клеточной АХЭ (патент G01N 33/48 «Способ определения у больного чувствительности клеток рака молочной железы к химиопрепарату или к группе химиопрепаратов») является недорогим и доступным к применению в клинических лабораториях, его можно использовать как дополнительный метод, позволяющий более четко определить прогноз заболевания и выработать оптимальную тактику лечения.

Список использованных источников

1. Стенина, М. Б. Рак молочной железы: наиболее важные научные события и выводы последних лет / М. Б. Стенина, М. А. Фролова // *Практ. онкология*. – 2011. – Т. 12, № 1. – С. 6–11.
2. Perou, C. M. Molecular stratification of triple-negative breast cancers / C. M. Perou // *Oncologist*. – 2010. – Vol. 15, suppl. 5. – P. 39–48.
3. Enzyme Nomenclature. Recommendations (1972) of the commission on biochemical nomenclature of the nomenclature and classification of enzymes. – Amsterdam: Elsevier Publishing Company, 1973.
4. Beta-amyloid aggregation induced by human acetylcholinesterase: inhibition studies / M. Bartolini [et al.] // *Biochem. Pharmacol.* – 2003. – Vol. 65, N 3. – P. 407–416.
5. Silman, I. Acetylcholinesterase: «classical» and «non-classical» functions and pharmacology / I. Silman, J. L. Sussman // *Curr. Opin. in Pharmacol.* – 2005. – Vol. 5. – P. 293–302.
6. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase histochemical activities and tumor cell growth in several brain tumors / M. Barbosa [et al.] // *Surg. Neurol.* – 2001. – Vol. 55, N 2. – P. 106–112.

7. Expression of cholinesterases in human kidney and its variation in renal cell carcinoma types / E. Munoz-Delgado [et al.] // *FEBS J.* 2010. – Vol. 277, N 21. – P. 4519–4529.
8. Cholinesterase activity of human lung tumours varies according to their histological classification / P. Martinez-Moreno [et al.] // *Carcinogenesis.* – 2006. – Vol. 27, N 3. – P. 429–436.
9. Cholinesterase activity and acetylcholinesterase glycosylation are altered in human breast cancer / F. Ruiz-Espejo [et al.] // *Breast Cancer Res. Treat.* – 2002. – Vol. 72, N 1. – P. 11–22.
10. Сравнительный анализ реакции злокачественно трансформированных клеток на химиопрепараты в первичной культуре и посттерапевтических изменений опухоли пациенток с диагнозом рак молочной железы / Н. А. Шуканова [и др.] // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем: Междунар. науч. конф.; Десятый съезд Белорус. обществ. об-ния фотобиологов и биофизиков, 9–21 июня 2012 г., Минск, Беларусь: сб. ст.: в 2 ч. / М-во образования Респ. Беларусь, Белорус. гос. ун-т, Нац. акад. наук Беларуси, Ин-т биофизики и клеточ. инженерии; [редкол.: И. Д. Вологовский и др.]. – Минск, 2012. – Ч. I. – С. 405–408.
11. Furukawa, N. Clinical application of the histoculture drug response assay / N. Furukawa, T. Kubota, R. M. Hoffman // *Clin. Cancer Res.* – 1995. – Vol. 1. – P. 305–311.
12. Ищенко, Р. В. Методика капельно-плазменного культивирования опухолевой ткани для экспресс-определения индивидуальной чувствительности к химиопрепаратам / Р. В. Ищенко // *Онкология.* – 2002. – Т. 4, № 1. – С. 15–17.
13. Ellman, G. L. A new and rapid calorimetric determination of acetylcholinesterase activity / G. L. Ellman, K. Courtneuy, V. Andres // *Biochem. Pharmacol.* – 1961. – Vol. 7, N 2. – P. 88–93.
14. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O. H. Lowry [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1951. – Vol. 193, N 1. – P. 265–275.
15. Is the future of personalized therapy in triple-negative breast cancer based on molecular subtype? / F. Le Du [et al.] // *Oncotarget.* – 2015. – Vol. 6, N 15. – P. 12890–12908.
16. Prognostic significance of a combined clinicopathologic score for response to primary systemic therapy in locally advanced breast cancer / P. Bertheau [et al.] // *Oncol. Rep.* – 2005. – Vol. 14, N 2. – P. 513–520.
17. Clinical and radiologic assessments to predict breast cancer pathologic complete response to neoadjuvant chemotherapy / A. F. Schott [et al.] // *Breast Cancer Res. Treat.* – 2005. – Vol. 92, N 3. – P. 231–238.

References

1. Stenina M. B., Frolova M. A. Breast cancer: the most important scientific events and conclusion of recent years. *Prakticheskaja onkologija* [Practical Oncology], 2011, vol. 12, no. 1, pp. 6–11. (in Russian).
2. Perou C. M. Molecular stratification of triple-negative breast cancers. *Oncologist*, 2010, vol. 15, suppl. 5, pp. 39–48.
3. Enzyme Nomenclature. Recommendations (1972) of the commission on biochemical nomenclature of the nomenclature and classification of enzymes, Amsterdam, Elsevier Publishing Company, 1973.
4. Bartolini M., Bertucci C., Cavrini V., Andrisano V. Beta-amyloid aggregation induced by human acetylcholinesterase: inhibition studies. *Biochemical Pharmacology*, 2003, vol. 65, no. 3, pp. 407–416.
5. Silman I., Sussman J. L. Acetylcholinesterase: «classical» and «non-classical» functions and pharmacology. *Current Opinion in Pharmacology*, 2005, vol. 5, pp. 293–302.
6. Barbosa M., Rios O., Velasques M., Villalobos J., Ehrmanns J. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase histochemical activities and tumor cell growth in several brain tumors. *Surgical Neurology*, 2001, vol. 55, no. 2, pp. 106–112.
7. Mucoz-Delgado E., Montenegro M. F., Campoy F. J., Moral-Naranjo M. T., Cabezas-Herrera J., Kovacs G., Vidal C. J. Expression of cholinesterases in human kidney and its variation in renal cell carcinoma types. *FEBS Journal*, 2010, vol. 277, no. 21, pp. 4519–4529.
8. Martinez-Moreno P., Nieto-Ceron S., Torres-Lanzas J., Ruiz-Espejo F., Tovar-Zapato I., Martinez-Hernandez P., Rodriguez-Lopez J. N., Vidal C. J., Cabezas-Herrera J. Cholinesterase activity of human lung tumours varies according to their histological classification. *Carcinogenesis*, 2006, vol. 27, no. 3, pp. 429–436.
9. Ruiz-Espejo F., Cabezas-Herrera J., Illana J., Campoy F. J., Vidal C. J. Cholinesterase activity and acetylcholinesterase glycosylation are altered in human breast cancer. *Breast Cancer Research Treatment*, 2002, vol. 72, no. 1, pp. 11–22.
10. Shukanova N. A., Martynova M. A., Putyrsky L. A., Putyrsky Iu. L., Kazlouskaia N. A., Bushmakina I. M., Molchan M. M. Comparative analysis of the reaction of malignantly transformed cells to chemotherapy in primary culture and post-therapeutic changes in the tumor of patients diagnosed with breast cancer. *Molekuliarnye, membrannye i kletochnye osnovy funkcionirovaniia biosistem: Mezhdunarodnaia nauchnaia konferentsiia; Desiatyi s'ezd Belorusskogo obshchestvennogo ob'edineniia fotobiologov* [Molecular, membrane and cellular bases of biosystem functioning: International scientific conference; The Tenth congress of the Belarusian public association of photobiologists and biophysicists]. Minsk, 2012, part 1, pp. 405–408. (in Russian).
11. Furukawa N., Kubota T., Hoffman R. M. Clinical application of the histoculture drug response assay. *Clinical Cancer Research*, 1995, vol. 1, pp. 305–311.
12. Ischenko R. V. Technique of drop/plasma culturation of tumor tissues for snap analysis of individual susceptibility to chemodrugs. *Onkologija* [Oncology], 2002, vol. 4, no. 1, pp. 15–17. (in Russian).
13. Ellman G. L., Courtneuy K., Andres V. A new and rapid calorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 1961, vol. 7, no. 2, pp. 88–93.
14. Lowry O. H., Rosebrough H. L., Farr A. L., Randall P. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal Biological Chemistry*, 1951, vol. 193, no. 1, pp. 265–275.

15. Le Du F., Eckhardt B. L., Lim B., Litton J. K., Moulder S., Meric-Bernstam F., Gonzalez-Angulo A. M., Ueno N. T. Is the future of personalized therapy in triple-negative breast cancer based on molecular subtype? *Oncotarget*, 2015, vol. 6, no. 15, pp. 12890–12908.

16. Bertheau P., Lerebours F., Nicolas Mounier N., de Roquancourt A., Espiй M., Clot P., Servant J.-M., Misset J.-L., Marty M., Janin F. Prognostic significance of a combined clinicopathologic score for response to primary systemic therapy in locally advanced breast cancer. *Oncology Report*, 2005, vol. 14, no. 2, pp. 513–520.

17. Schott A. F., Roubidoux M. A., Helvie M. A., Hayes D. F., Kleer C. G., Newman L. A., Pierce L. J., Griffith K. A., Murray S., Hunt K., Paramagul C., Baker L. H. Clinical and radiologic assessments to predict breast cancer pathologic complete response to neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Research Treatment*, 2005, vol. 92, no. 3, pp. 231–231. doi: 10.1007/s10549-005-2510-1.

Информация об авторах

Шуканова Наталья Андреевна – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: natashu2006@yandex.ru.

Мартынова Мария Алексеевна – канд. хим. наук, заведующий лабораторией. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: martynova@ibp.org.by.

Бушмакина Ирина Михайловна – канд. биол. наук, науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: bushm-im@yandex.by.

Молчан Михаил Михайлович – мл. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: molchanmisha@mail.ru.

Брич Михаил Арсеньевич – канд. физ.-мат. наук, ст. науч. сотрудник. Институт тепло- и массообмена НАН Беларуси (ул. П. Бровки, 15, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: mabritch@hmit.ac.by.

Козловская Наталья Александровна – науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова (агр. Лесной, 223040, Минский район, Республика Беларусь). E-mail: oncomammolog@tut.by.

Шаповал Евгения Викторовна – д-р мед. наук, заведующий лабораторией. Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова (агр. Лесной, 223040, Минский район, Республика Беларусь). E-mail: jaklin60@rambler.ru.

Information about authors

Natalia A. Shukanova – Ph. D. (Biol.), Senior researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: natashu2006@yandex.ru.

Maria A. Martynova – Ph. D. (Chem.), Head of the Laboratory. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: martynova@ibp.org.by.

Irina M. Bushmakina – Ph. D. (Biol.), Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: bushm-im@yandex.by.

Mikhail M. Molchan – Junior researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: molchanmisha@mail.ru.

Mikhail A. Britch – Ph. D. (Phys.-math.), Senior researcher. Heat and Mass Transfer Institute of the National Academy of Sciences of Belarus (15, Brovka Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: mabritch@hmit.ac.by.

Natalya A. Kazlouskaya – Researcher. N. N. Alexandrov National Cancer Center of Belarus (Forestry Agrotown, 223040, Region of Minsk, Republic of Belarus). E-mail: oncomammolog@tut.by.

Eugeniya V. Shapoval – D. Sc. (Med.), Head of the Laboratory. N. N. Alexandrov National Cancer Center of Belarus (Forestry Agrotown, 223040, Region of Minsk, Republic of Belarus). E-mail: jaklin60@rambler.ru.