

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ

ГЕРАЩЕНКО ГАННА ВОЛОДИМИРІВНА



УДК 577.218+616-006.6+616.65

ГЕНЕТИЧНІ, ЕПІГЕНЕТИЧНІ ТА ЕКСПРЕСІЙНІ ПОРУШЕННЯ У НИЗЦІ
ЕПІТЕЛІЙНИХ ПУХЛИН

03.00.03 «Молекулярна біологія»,

03.00.22 «Молекулярна генетика»,

091 – Біологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня

доктора біологічних наук

Київ -2019

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано у відділі молекулярної онкогенетики Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (м.Київ).

Науковий консультант:

доктор біологічних наук, професор
Кашуба Володимир Іванович,
Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,
завідувач відділу молекулярної онкогенетики.

Офіційні опоненти:

доктор біологічних наук, професор,
член-кореспондент НАН України
Мінченко Олександр Григорович
Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України,
завідувач відділу молекулярної біології;

доктор біологічних наук
Ольхович Наталія Вікторівна
Національна дитяча спеціалізована лікарня "ОХМАТДИТ"
МОЗ України,
завідуюча лабораторією медичної генетики СМГЦ;

доктор медичних наук, професор
Досенко Віктор Євгенович
Інститут фізіології імені О.О. Богомольця НАН України,
завідувач відділу загальної та молекулярної патофізіології.

Захист дисертації відбудеться 22 жовтня 2019 року о 10.30 годині на засіданні Спеціалізованої вченої ради Д.26.237.01 Інституту молекулярної біології і генетики НАН України за адресою: 03143 м.Київ, вул. Заболотного, 150.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту молекулярної біології і генетики НАН України.

Автореферат розіслано 17 вересня 2019 року.

Вчений секретар
Спеціалізованої вченої ради,
кандидат біологічних наук, с.н.с.



І.В.Крупська

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. У процесі злоякісної трансформації та прогресування злоякісних новоутворень клітини пухлин набувають певних онкогенних властивостей, що супроводжується змінами на молекулярному рівні організації (генетичному, епігенетичному, транскриптомному, протеомному, метаболомному) [Smith *et al.*, 2016, Weinberg *et al.*, 2008]. Ці порушення мають як пухлино-специфічний характер, так і загальний, притаманний багатьом видам епітелійних пухлин [Chakraborty *et al.*, 2018]. Основні канцерогенні характеристики набуваються клітинами пухлин завдяки певним механізмам у різному порядку їхньої появи [Hanahan *et al.*, 2011].

Канцерогенез є багатостадійним процесом, який має наступні етапи розвитку: ініціація пухлин, промоція, прогресія та метастазування [Siddiqui *et al.*, 2015]. Дотепер достеменно невідомо, які зміни є високо-специфічними для кожного етапу, але з'ясовано, що як генетичні, епігенетичні зміни, так і порушення експресії багатьох генів відбуваються протягом усіх етапів захворювання [Vogelstein *et al.*, 2013, Luzzatto *et al.*, 2011]. Але саме ця різноманітність молекулярних аберацій становить проблеми при діагностиці, лікуванні та прогнозі перебігу хвороби. Останніми роками завдяки розвитку сучасних методів молекулярно-біологічних досліджень (мікропанелі, FISH-аналіз, секвенування нового покоління) виявлено дуже багато порушень, які асоційовані з розвитком пухлин [McCombie *et al.*, 2018, Sharma *et al.*, 2017]. Серед них - хромосомні перебудови, делеції, ампліфікації хромосом, локусів хромосом та генів, тисячі соматичних мутацій у генах, гіперметилування та гіпометилування промоторів генів, модифікації гістонів та зміна профілів експресії некодувальних РНК. Всі ці порушення впливають на експресію генів, що призводить до патологічних змін у тканинах та провокують набуття клітинами злоякісних властивостей [Hanahan *et al.* 2000, 2011]. Згідно до сучасних уявлень у процесі канцерогенезу беруть участь сотні генів [Vogelstein *et al.* 2013]. За їхніми властивостями активізувати чи інгібувати ріст пухлин, їх умовно поділяють на онкогени та гени-супресори росту пухлин [Iurlaro *et al.*, 2014]. До того ж, як онкогени, так і гени-супресори, відносяться до певних сигнальних шляхів клітини, що беруть участь у канцерогенезі [Lee *et al.*, 2004]. Серед пухлино-асоційованих клітинних шляхів, як дуже важливі, слід відмітити наступні: p53, Rb, TGF- β , VEGF, HIF1, PI3K-Akt, Jak-STAT, mTOR, cAMP, MAPK, PPAR, Notch, Wnt-b-catenin, Hedgehog, шляхи взаємодії з екстрацелюлярним матриксом та адгезії, апоптоз, шляхи андрогенового та естрогенового рецепторів, простагландинів, цитокінових рецепторів, кальцієвий сигнальний шлях та ін. [Vogelstein *et al.*, 2004, Xu *et al.*, 2016, Moghadam *et al.*, 2017, Krishnamurthy *et al.*, 2018, Mabuchi *et al.*, 2015]. Ці шляхи перетинаються, утворюючи складну біологічну мережу взаємодій. Причому у кожному типі пухлин, як і в індивідуальних пухлинах одного типу, комбінації активованих онкогенних шляхів та інактивованих генів-супресорів росту пухлин відрізняються [Creighton *et al.*, 2008, Bild *et al.*, 2006]. Це віддзеркалюється на чутливості пухлин до різних видів

лікування, швидкості прогресії та метастазування, що нагально потребує визначення молекулярних особливостей пухлин у клініці.

3-я хромосома людини є однією з найбільш широко досліджуваних за різних видах раку. Завдяки методам каріотипування, аналізу втрати алелей, методам порівняльної гібридизації ДНК встановлено втрату частин 3-ої хромосоми людини у низці спорадичних злоякісних пухлин [Clifford *et al.*, 1998, van den Berg *et al.*, 1997, Braga *et al.*, 1999]. Делеції, що відбуваються у геномі пухлинних клітин, вважаються першою ознакою можливого розташування генів-супресорів пухлин у цих ділянках хромосом [Kok *et al.*, 1997]. Ідентифікувати потенційні гени-супресори росту пухлин вдалося після успішного фізичного картування 3-ої хромосоми людини за допомогою технології NotI-пов'язаних та стрибаючих клонів [Zabarovsky *et al.*, 1991, Kashuba *et al.*, 1995, 1997, Allikmets *et al.*, 1994, 1996, Wei *et al.*, 1996]. Встановлено, що гени 3-ої хромосоми людини грають важливу роль у канцерогенезі епітелійних пухлин різних локалізацій [Dmitriev *et al.*, 2014, Senchenko *et al.*, 2013, Haraldson *et al.*, 2012, Grigorieva *et al.*, 2011]. Тому, виявлення молекулярних змін в структурі та функції цих генів за умов канцерогенезу вкрай важливе для більш глибокого розкриття механізмів пухлинного росту і пошуку мішеней для терапії.

Сучасні дані свідчать про важливість пухлино-стромальних взаємодій, які представляють собою взаємний вплив ракових та супутніх стромальних клітин та їхню взаємодію з позаклітинним матриксом, що є атрибутом взаємодій пухлина-організм в цілому [Pietras *et al.*, 2010, McMillin *et al.*, 2013, Belli *et al.*, 2018]. Реактивна пухлинна строма складається з багатьох типів клітин, зокрема фібробластів та пухлино-асоційованих фібробластів, макрофагів та пухлино-асоційованих макрофагів, мезенхімних стовбурових клітин, ендотелійних, клітин імунної системи тощо [Werb *et al.*, 2015, Bussard *et al.*, 2016, Ridge *et al.*, 2017]. Взаємодії генетично змінених пухлинних клітин і позаклітинного матриксу, з одного боку, і реактивних стромальних клітин - з іншого, суттєво контролюють більшість аспектів прогресії пухлин, таких як епітелійно-мезенхімний перехід, міграцію, інвазію, утворення метастазів, неоваскуляризацію, апоптоз і стійкість до хіміотерапії [Erdogan *et al.*, 2017, Alkasalias *et al.*, 2018]. Нажаль, ні в Україні, ні в світі ще не створено повноцінних діагностикумів для оцінки стану строми пухлин, що актуально для прогнозу захворювання та підбору терапії.

Складність механізмів канцерогенезу унеможливорює пошук однієї мішені для терапії та одного біомаркера для діагностики раку, і порушує вельми нагальне питання про встановлення індивідуальних молекулярних особливостей пухлин (генетичних, епігенетичних, експресійних), їхнього мікрооточення та стану і можливостей організму у боротьбі з раком, що є реальною задачею, яка відповідає сучасному рівневі розвитку молекулярної біології та генетики. Це є актуальним для розробки точної діагностики та прогнозування, пошуку індивідуального ефективного лікування, що є основою персоніфікованої медицини, засади якої тільки створюються в світі й Україні.

Зв'язок з науковими програмами, планами, темами. Роботу виконано в рамках бюджетних наукових проектів відділу молекулярної онкогенетики

Інституту молекулярної біології і генетики НАН України «Ідентифікація генів-супресорів, картованих на 3-й хромосомі для створення маркерів – ключових для певних видів злоякісних пухлин епітелійного походження» (2007-2011 р., державний реєстраційний номер 0107U000337), «Вивчення генетичних та епігенетичних змін в злоякісних пухлинах епітелійного походження» (2011-2015 р., державний реєстраційний номер 0110U000691), «Ідентифікація нових біомаркерів для діагностики злоякісних новоутворень та розробка підходів до генотерапії пухлин у модельних системах» (2016-2020 р., державний реєстраційний номер 0115U003742), та «Дослідження властивостей молекулярно-генетичних маркерів як основи для діагностики онкологічних патологій» (2007-2009 р., державний реєстраційний номер 0107U0004941), цільової комплексної міждисциплінарної програми наукових досліджень НАН України «Фундаментальні основи молекулярних та клітинних біотехнологій». Проект «Ідентифікація молекулярно-генетичних маркерів для діагностики злоякісних новоутворень епітелійного походження» (2010-2014 р., державний реєстраційний номер 0110U004744, та 2015 р. № 41/146), цільового тематичного конкурсу Ф46 ДФФД науково-навчального центру «Державна ключова лабораторія молекулярної та клітинної біології» - «Макромолекули та їх комплекси в реалізації генетичної інформації» (2011-2012 р., державний реєстраційний номер №F46.1/011) та за підтримки гранту Державного агентства з питань науки, інновацій та інформатизації (державний реєстраційний номер 0111U005988). Програма «Нанотехнології та наноматеріали» Проект «Функціональні біонаноматеріали для медичної діагностики онкологічних захворювань» (2010-2014 р., державний реєстраційний номер 0110U004646). Державна цільова науково-технічна програма розроблення новітніх технологій створення вітчизняних лікарських засобів для забезпечення охорони здоров'я людини та задоволення потреб ветеринарної медицини «Створення та введення в експлуатацію лабораторного модуля для дизайну та застосування мікрочипів» (2012 р., державний реєстраційний номер 0112U007434). Програма «Молекулярні та клітинні біотехнології для потреб медицини, промисловості та сільського господарства» «Гени-супресори пухлинного росту та пухлино-асоційовані гени - як потенційні маркери для діагностики та терапії злоякісних новоутворень» (2015-2019 р., державний реєстраційний номер 0115U002950).

Мета і завдання дослідження. Метою роботи є ідентифікація та характеристика генетичних, епігенетичних порушень генів та їх експресії в епітелійних пухлинах людини та виявлення пухлино-асоційованих генів, які задіяні в патогенезі раку та можуть характеризувати молекулярні підтипи й набори біомаркерів для діагностики видів епітелійних пухлин та потенційні мішені для таргетної терапії.

Для досягнення мети вирішували такі **завдання**:

1. Виявити та провести порівняльний аналіз генетичних та епігенетичних порушень генів 3-ої хромосоми людини у епітелійних пухлинах за допомогою NotI-мікропанелей.

2. Встановити тип змін (генетичний або епігенетичний) генів та/або локусів, що мають зміни за даними NotI-мікропанелей.
3. Визначити рівні відносної експресії генів, що мають генетичні та/або епігенетичні зміни за даними NotI-мікропанелей.
4. Встановити пухлино-супресорну функцію гена *SEMA3B* (*Chr 3p21.31*) у пухлинах епітелійного походження *in vitro* та *in vivo*.
5. Дослідити рівні експресії пухлино-асоційованих генів у клітинних лініях раку передміхурової залози для виявлення особливостей канцерогенезу, потенційних маркерів агресивності і метастазування пухлин.
6. Визначити диференційно-експресовані гени, що асоційовані з характеристиками пухлинних клітин передміхурової залози.
7. Виявити диференційно-експресовані гени-маркери елементів строми пухлин передміхурової залози.
8. Встановити клінічно значущі експресійні характеристики і кореляції генів для молекулярного профілювання пухлин передміхурової залози та виявити молекулярні підтипи на основі експресійних патернів пухлино-асоційованих генів та маркерів елементів строми пухлин.
9. Провести аналіз та підбір наборів потенційних ДНК біомаркерів для діагностики епітелійних новоутворень і їх агресивності на основі результатів NotI-мікропанелей.
10. Виявити потенційні експресійні фармакологічні біомаркери та розробити набори для діагностики раку передміхурової залози.

Об'єкт дослідження – молекулярні порушення у механізмах регулювання експресії генів та їхнє функціональне значення при реалізації генетичної інформації у прогресії пухлин епітелійного походження.

Предмет дослідження – ідентифікація і характеристика генетичних та епігенетичних змін і транскрипційних порушень в епітелійних пухлинах.

Методи дослідження: Скринінг генетичних та/або епігенетичних змін з використанням NotI-мікропанелей, ПЛР та кількісна ПЛР у реальному часі, метил-специфічна ПЛР, секвенування та бісульфітне секвенування, визначення втрати гетерозиготності, нозерн-блот гібридизація, клітинні моделі *in vitro*, трансфекція культур клітин, тести на ріст пухлин *in vivo* на мишах, флуоресцентна мікроскопія, імуногістохімічні, біоінформативні та статистичні методи.

Наукова новизна отриманих результатів. За допомогою технології широкомасштабного скринінгу NotI-мікрочипів виявлено генетичні та/або епігенетичні зміни десятків генів та/або локусів 3-ої хромосоми людини у епітелійних пухлинах яєчника, кишечника, передміхурової та молочної залоз, та підтверджено іншими незалежними методами встановлені генетичні порушення - делеції (втрата гетерозиготності, аналіз копій генів), епігенетичні порушення – метилювання промоторів (метилювання специфічна ПЛР, бісульфітне секвенування), зміна експресії генів на рівні мРНК (нозерн-блот гібридизація, ПЛР у реальному часі). Проведено порівняльний аналіз змін пухлино-асоційованих генів та потенційних генів супресорів росту пухлин в зразках епітелійних пухлин та проведено підбір панелей потенційних біомаркерів для діагностики епітелійних

новоутворень, зокрема раку яєчника та передміхурової залози. У дослідах *in vitro* та *in vivo* вперше доведена пухлино-супресивна роль гена *SEMA3B* у канцерогенезі на прикладі пухлин легені.

Вивчення змін експресії генів (біля 200 генів) як на клітинних лініях раку передміхурової залози, так і на зразках хірургічно видалених пухлин дозволило виявити диференційно-експресовані гени у клітинних лініях з різним потенціалом агресивності та метастазування, серед яких гени *TAGLN*, *EFNA5*, *IL1B*, *PLAU*, *TGFBI*, *EPDR1* і *FOS*, а також певні особливості пухлино-стромальних характеристик пухлин передміхурової залози, які є одними з найбільш гетерогенних видів злоякісних новоутворень. Отримані дані свідчать про біологічно-детермінований характер змін експресії, що проявляється у високому рівні дисперсії цього показника у пухлинах. Це дозволило вперше виявити молекулярні характеристики зразків пухлин та профілі експресії як простато-специфічних генів, серед яких *AR*, *CDH1*, *KRT18*, *ESR1*, *GCR*, *PRLR*, *VDR*, *SRD5A2*, так і генів-маркерів стромальних елементів раку передміхурової залози, зокрема *ACTA2*, *CXCL14*, *CTGF*, *THY1*, *FAP*, *CCL17*, *CCL22*, *CCR4*, *CD68*, *CD163*, *NOS2A*, *CTLA4*, *IL1R1*. Вперше встановлено молекулярні підтипи раку передміхурової залози, що мають різні активовані онкогенні шляхи та інактивовані гени-супресори. Модифіковано алгоритм для розробки експресійних наборів онкомаркерів на базі MDR-аналізу та проаналізовано потенційні діапазони чутливості до таргетної терапії генів-мішеней пухлин передміхурової залози (*AR*, *FASN*, *LDLR*, *HMGCR*, *COX2*, *PTEN*, і *CTLA4*) на основі змін відносної експресії генів.

Практичне значення отриманих результатів. Виявлення за допомогою NotI-мікропанелей та підтвердження іншими методами генетичних та епігенетичних порушень низки генів та/або локусів 3-ої хромосоми людини у епітелійних пухлинах призвело до ідентифікації нових потенційних біомаркерів та розробці панелей для діагностики та розрізнення пухлин яєчника та передміхурової залози. Встановлення епігенетичного характеру порушень для низки генів відкриває можливість розробки наборів біомаркерів у біологічних рідинах для ранньої діагностики онкологічних захворювань.

Виявлені особливості експресії генів, асоційованих з характеристиками клітин пухлин та стромального мікрооточення раку передміхурової залози започаткувало можливість детекції специфічних клінічно-значущих молекулярних підтипів та потенційних діапазонів чутливості до таргетної терапії, які можуть бути важливими при діагностиці, прогнозуванні та підборі лікування хворих, що можливо впровадити у клінічну практику. Модифікація та оптимізація підходів для розробки експресійних панелей біомаркерів на основі методів машинного навчання сприяє створенню нових діагностикумів з високими статистичними показниками для діагностики пухлин та встановлення їх агресивності.

Матеріали дисертації можуть бути використані у навчальних курсах молекулярно-біологічного та генетичного профілю для студентів біологічних та медичних спеціальностей ВНЗ України та підвищення кваліфікації.

Особистий внесок здобувача. Дисертантом особисто обгрунтовано концепцію та розроблено методологію роботи та експериментальних досліджень, проведено пошук та аналіз літератури за темою, запропоновано гіпотези та способи реалізації намічених завдань, проаналізовано отриманий експериментальний матеріал, підготовлено до друку публікації. Основні положення і висновки дисертаційної роботи, сформульовані автором, обговорено разом з науковим консультантом д.б.н., професором В.І.Кашубою.

Усі дослідження виконано за безпосередньої участі або під керівництвом здобувача. Основні результати по підтвердженню та аналізу результатів NotI-мікропанелей, експресії пухлино-асоційованих генів та генів-маркерів елементів строми у клітинних лініях та зразках пухлин, статистичний аналіз результатів та виявлення молекулярних підтипів, діапазонів чутливості, модифікація даних для аналізу методом машинного навчання та розробка експресійних панелей біомаркерів отримані особисто автором.

Підготовку проб, гібридизацію та аналіз NotI-мікропанелей проведено у співпраці з професором В.І. Кашубою та к.б.н. В.В.Гордіюком. Встановлення метилювання низки генів за даними NotI-мікропанелей виконано за участі к.б.н. О.Г. Кондратова, ідентифікація генетичних порушень низки генів 3-ої хромосоми проведено разом з к.б.н. Є.Є. Руденко, дослідження експресії генів на клітинних лініях та NotI-мікропанелі на зразках раку передміхурової залози й підтвердження змін відносної експресії на клінічних зразках здійснено разом з к.б.н. Є.Е. Розенберг. Збір зразків пухлин передміхурової залози та виділення з них тотальної РНК проводилося разом із к.б.н. Є.Е. Розенберг та Л.В. Мевс. Імуногістохімічні дослідження проведено спільно із завідувачем відділу молекулярної та клітинної патобіології ІЕПОР ім.Р.Є.Кавецького НАН України, д.б.н. О.В.Кашубою. Автор висловлює подяку усім співавторам за плідну співпрацю. Слова щирої вдячності автор висловлює член-кореспонденту НАН України, д.б.н., професору А.В. Риндич за допомогу у виборі теми дослідження, освоєнні низки методів та аналіз результатів. Щиру подяку автор висловлює науковому консультанту д.б.н., професору В.І. Кашубі за допомогу в розробці стратегії досліджень, аналізі, узагальненні результатів та підготовці наукових публікацій.

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень було представлено на поточних семінарах відділу молекулярної онкогенетики Інституту молекулярної біології і генетики НАН України та міжнародних і вітчизняних конференціях: Rесоор HST Consortium “Bridges in life Sciences Annual Scienific Rewiew” (Pecs, Hungary, 2007), X Український біохімічний з’їзд (Одеса, Україна, 2010), III З’їзд українських генетиків і селекціонерів ім. М.І.Вавілова та V Міжнародна наукова конференція «Фактори експериментальної еволюції організмів» (Київ, Україна, 2011), VII Conference of Young Scientists, Institute of Molecular Biology and Genetics NAS Ukraine (Kyiv, Ukraine, 2013), VIII Conference of Young Scientists, Institute of Molecular Biology and Genetics NAS Ukraine (Kyiv, Ukraine, 2014), X міжнародній науковій конференції студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, Україна, 2014), X Український

біохімічний конгрес (Київ, Україна 2014), FEBS EMBO Conference присвячена 50-и річчю FEBS (Paris, France, 2014), XI міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, Україна, 2015), EACR Conference in Cancer Genomics (Cambridge, United Kingdom, 2015), XIII з'їзд онкологів та радіологів України (Київ, Україна, 2016), конференція «Інтегральні патогенетичні підходи в діагностиці та терапії раку» (Київ, Україна, 2016), Mini-symposium “New trends in cancer research and innovative tumor vaccines” (Kyiv, Ukraine, 2017), XII annual Conference of Young Scientists Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine (Kyiv, Ukraine, 2018), International Symposium “Fundamental principles of cancer biotherapy” (Kyiv, Ukraine, 2018), XI PARNAS Conference – Young Scientists Forum “Biochemistry and Molecular Biology for Innovative Medicine” (Kyiv, Ukraine, 2018), міжнародна конференція “Modern Molecular-Biochemical Markers in Clinical and Experimental Medicine -2018” (Prague, Czech Republic, 2018).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 28 статей у фахових вітчизняних та міжнародних виданнях та 11 тез доповідей на наукових конференціях.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів, результатів експериментальних досліджень, аналізу та узагальнення результатів, висновків, списку використаних джерел та додатків. Загальний обсяг дисертації - 503 сторінки машинописного тексту. Робота містить 78 рисунків і 79 таблиць, 25 додатків. Перелік використаної літератури охоплює 951 джерело.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи досліджень.

Зразки тканин епітелійних пухлин. У роботі використано швидко заморожені у рідкому азоті зразки біопсій та хірургічно видаленого матеріалу пухлин яєчника, нирки, кишечника, передміхурової залози, а також парних умовно-нормальних тканин (УНТ) та аденом передміхурової залози. Зразки отримано з Національного інституту раку та Інституту урології НАМН України. Зразки пацієнтів отримано згідно з принципами Гельсинської декларації. Низку пухлин (нирки, легені) було люб'язно надано у рамках спільних досліджень МТС Каролінського Інституту (м. Стокгольм, Швеція).

Клітинні лінії. Клітинна лінія нормальних епітелійних клітин передміхурової залози людини PNT2 отримана з Європейської колекції клітинних культур (м. Солсбері, Великобританія). Клітинні лінії аденокарцином передміхурової залози людини LNCaP, PC3, DU145, та клітинна лінія мілкоклітинної карциноми легені U2020 отримано з Каролінського інституту (м. Стокгольм, Швеція).

Стандартні молекулярні методи. Виділення геномної ДНК та тотальної РНК, Нозерн-блоттинг, ПЛР здійснено за стандартними методами (Sambrook et.al., 1989).

Підготовка ДНК, гібридизація та сканування NotI-мікропанелей.

Здійснювалися на приладах Lucidea Base та GenePix 4000B (Amersham Pharmacia Biotech, США) згідно розроблених раніше протоколів (Kashuba *et al.*, 2006, Zabarovsky *et al.*, 2000) та протоколам виробника. Обрахунок результатів проводили за допомогою програми GenPix4.0.

Значення відносної гібридизації оцінювали за співвідношенням інтенсивності флуоресценції Cy5 і Cy3. Якщо відношення Cy5/Cy3 лежали у межах 0-0,34 - детектовано гомозиготну делецію та/або метилювання, інтервал від 0,35 до 0,84 – відповідає гетерозиготній делеції та/або метилюванню. Якщо співвідношення сигналів у межах 0,85-1,50 – вважалось, що змін не виявлено; а якщо ж це відношення більше, ніж 1,51 - детектовано ампліфікацію та/або деметилювання.

Визначення статусу метилювання промоторів генів у зразках геномної ДНК. Бісульфітну модифікацію проводили за допомогою EZ DNA Methylation™ Kit (ZYMO RESEARCH) згідно протоколу виробника. Праймери для метилспецифічної ПЛР підбирали з використанням онлайн-інструменту MethPrimer (<http://www.urogene.org/methprimer/>). Реакції проводили з використанням DreamTaq DNA Polymerase (Thermo Scientific, США) згідно протоколу виробника. Електрофоретичний аналіз зразків ДНК після ПЛР проводився у 2% агарозному гелі в 1xTAE або 0,5xTBE.

Бісульфітне секвенування ампліфікованих фрагментів ДНК проводили після їхнього лігування та клонування. Для лігування у вектор pTZ57 R/T використовували набір реагентів InsTAclone PCR Cloning Kit (Thermo Scientific, США). Після цього проводили трансформацію компетентних клітин *E. coli* штаму JM107. Виділення плазмідної ДНК проводили за допомогою набору GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific, США) згідно протоколу виробника. Клоновані ПЛР продукти були секвеновані на автоматичному секвенаторі ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США) з використанням набору для секвенування Big Dye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США) та прямого праймера до продукта ПЛР згідно з інструкцією виробника. Послідовність ДНК аналізували за допомогою програмного забезпечення Sequencing Analysis (Applied Biosystems, США) та Chromas 1.55 (Technelysium LTD, Австрія). Аналіз нуклеотидних послідовностей виконували з використанням сервісу BLASTN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Аналіз кількості копій гена. Експерименти виконували за допомогою кількісної ПЛР у реальному часі на приладі Bio-Rad iQ5. Реакції проводили з використанням 2x SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Scientific, США). Кожний зразок аналізували двічі у триплетах.

Вивчення втрати гетерозиготності. Досліди проводили за допомогою денатуруючого ПААГ електрофорезу продуктів ПЛР з міченими Cy5 праймерами (ІВА, США) для генів *GPX1* та *GPX3*. Електрофорез проводили на автоматичному лазерному секвенаторі «ALF express» («Pharmacia Biotech», США).

Встановлення рівнів відносної експресії генів (BE). Експерименти проводили методом ПЛР у реальному часі (кПЛР). Тотальну РНК зі зразків

виділяли з використанням TRI Reagent (Sigma-Aldrich, США), набору Rneasy Mini kit (Qiagen, Німеччина) згідно протоколів виробників. Якість виділених зразків тотальної РНК перевіряли електрофорезом в денатуруючих умовах у бораному буфері з використанням 2x RNA Loading Dye (ThermoScientific, США). Всі отримані зразки тотальної РНК обробляли ДНКазою I (Thermo Scientific, США) та синтезували кДНК використовуючи набір First Strand cDNA Synthesis kit (ThermoScientific, США) та суміш оліго(dT)- та Random праймерів відповідно до протоколу виробника. ПЛР у реальному часі проводили на ампліфікаторах iCycler iQ5 Multicolor Detection System (Bio-Rad, США) та CFX96 (Bio-Rad, США) з SYBR Green PCR Master Mix (ThermoScientific, США) та Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (ThermoScientific, США) згідно протоколам виробників з модифікаціями під певні пари праймерів за 2 та 3-кроковою програмою.

Трансфекція і виділення стабільно трансфікованих клітинних клонів SEMA3B-U2020. кДНК, що кодує ген SEMA3B ампліфікували та клонували в епісомальний тетрациклін-регульований вектор рETE. Трансфекцію клітин U2020 проводили з використанням Lipofectamine і Plus Reagent (Invitrogen, CA, США) відповідно до протоколу виробника.

Тест на формування колоній проводили через 24–48 год після трансфекції і пересівали у культуральні чашки 100 мм² при щільності 500-1000 клітин на чашку. Забарвлення колоній проводили за Гімза та фотографували і підраховували за допомогою програмного забезпечення QuantityOne (версія 4.4.0; Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Життєздатність клітин оцінювали за допомогою аналізу FACS з пропідієм йодидом (PI-FACS), дотримуючись рекомендацій виробника (FACS Calibur, BD Bioscience).

Дослідження пухлино-супресорної активності гена SEMA3B in vivo. Експерименти проводили на імунодефіцитних мишах (SCID миші) шляхом підшкірного введення трансфікованих рETE / SEMA3B U2020 клітин та порожніх U2020 клітин й спостереженням за ростом пухлин протягом місяця.

Імуногістохімічний аналіз (ІГХ). Дослідження експресії білків у пухлинній клітинній лінії U2020 і ангиогенезу пухлин імунодефіцитних мишей було оцінено після фіксації у нейтральному формаліні й заливкою зразків у парафін. Блоки нарізали товщиною 5 мм та переносили на предметні скельця. Далі проводили депарафінізацію зрізів. Епітопи активували нагріванням в мікрохвильовій печі протягом 5 хв у цитратному буфері. Анти-CD31 мишаче антитіло, разом з кролячо-анти-мишачим FITC-кон'югованим вторинним антитілом (Dako, Karlstrup, Denmark), використовували для забарвлення мікросудин. Аналіз TUNEL (In Situ Cell Death Detection Kit, Boehringer Mannheim, Німеччина) використовували для виявлення апоптозу, який виконували згідно протоколу виробника.

Імуногістохімічний аналіз експресії білків в тканинах передміхурової залози проводили за тією ж схемою. Після фіксації, дегідратації тканини заливали у парафін. Серійні зрізи тканин фарбували гематоксилином та еозином для гістологічної діагностики. Експресію білків TGFB1, PLAU, FOS, IL1b та TAGLN

оцінювали, використовуючи специфічні антитіла. Сигнали білка були візуалізовані за допомогою системи виявлення пероксидази / DAB системи EnVision™ (Dako, Glostrup, Denmark). Ядра фарбували гематоксилином Майєра (Dako).

Статистична обробка даних. Статистичні програми STATISTICA10, відкритий ресурс Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health (<http://www.openepi.com/>) та програма NIMAN, створена співавторами [Dmitriev D. 2014] були використані для статистичної обробки результатів досліджень. Для оцінки нормальності розподілу значень відносних рівнів експресії генів використовували тести Колмогорова-Смірнова та Ліллієфорса. Парний тест Вілкоксона використовували для оцінки відмінностей між аденокарциномами та умовно-нормальними тканинами за моделлю $2^{-\Delta Ct}$. Точний тест Фішера застосовано для виявлення змін між парами груп за моделлю $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Процедуру Бенжаміні-Хохбера з FDR=0,1-0,25 використано для корекції на множинні порівняння для цих тестів [Benjamini *et al.*, 1995]. Тести Краскела-Уолліса та Дана-Бонферроні для множинних порівнянь виконували для встановлення відмінностей відносної експресії між усіма досліджуваними групами зразків. Тест рангової кореляції за Спірменом застосовували для пошуку кореляцій між експресією досліджуваних генів та клініко-патологічними характеристиками зразків й кореляцій рівнів експресії між генами. Методи класифікації та кластеризації за К-значеннями були використані для пошуку класифікаторів та молекулярних підтипів пухлин передміхурової залози. Програма MDR 3.0.2 (<http://epistasis.org/software.html>) була застосована для розробки експресійних наборів та аналізу їх статистичних параметрів та діагностичного рівня.

Результати досліджень та їхнє обговорення.

Виявлення генетичних та епігенетичних порушень генів 3-ої хромосоми людини у епітелійних пухлинах за допомогою NotI-мікропанелей. NotI-мікропанелі є сучасною технологією широкомасштабного скринінгу, яка дозволяє одночасно детектувати як генетичні, так і епігенетичні зміни, у даному випадку, у 180 клонах 3-ої хромосоми людини [Zabarovsky *et al.*, 1996, Kashuba *et al.*, 1999, Dmitriev *et al.*, 2012]. Нами проведено дослідження на чотирьох локалізаціях епітелійних пухлин різних стадій та парних умовно-нормальних тканинах: яєчника (25 зразків), товстого кишечника (24 зразки), передміхурової залози (33 зразки) та молочної залози (47 зразків) генетичних та/або епігенетичних змін 3-ої хромосоми людини. Приклад фрагментів профілів гібридизації ДНК зразків пухлин яєчника та кишечника на NotI-мікропанелях наведено на рис. 1 а, б відповідно. Виявлено, що найчастіші зміни, притаманні пухлинам – це гетерозиготні делеції та/або метилювання. Так, для пухлин яєчника знайдено 35 генів та локусів, які мають значущі зміни у злоякісних пухлинах яєчника вище 17% зразків. Гени та локуси, що зазнали найбільших змін *IQSEC1*, *NKIRAS1/RPL15*, *THRB*, *LRRC3B*, *RBSP3 (CTDSPL)*, відносяться до короткого плеча (3p) хромосоми 3. Але на гени 3q плеча хромосоми 3 припадає 14 з 35 генів та локусів зі змінами, що складає 40% від усіх генів та локусів з делеціями та/або

Порівняльний аналіз виявлених за допомогою NotI –мікропанелей змін пухлино-асоційованих генів та потенційних генів супресорів росту пухлин.

Аналіз результатів наших досліджень епітелійних пухлин чотирьох локалізацій (рак товстого кишечника, рак яєчника, рак передміхурової та молочної залози) та даних інших дослідників у ще трьох локалізаціях епітелійних пухлин (світло-клітинний рак нирки, рак шийки матки, рак легені) методом NotI-мікропанелей виявив 74 гени та локуси (табл. 1), які мають значущі зміни (делеції та/або метилювання) від однієї до семи локалізацій.

Таблиця 1.

Гени та локуси зі значущим відсотком делецій та/або метилювання у семи типах епітелійних пухлин

№	Кількість локалізацій	Ген/локус	Локус хромосоми	РЯ	РТК	РМЗ	РШМ	РЛ	РН	РПЗ
1	7	<i>FOXP1</i>	3p13	*	*	*	*	*	*	*
2	7	<i>LRRC3B</i>	3p24.1	*	*	*	*	*	*	*
3	7	<i>NKIRAS1</i>	3p24.2	*	*	*	*	*	*	*
4	7	<i>RBSP3 (CTDSPL)</i>	3p22.2	*	*	*	*	*	*	*
5	7	<i>ZIC4</i>	3q24	*	*	*	*	*	*	*
6	6	<i>ITGA9</i>	3p22.2	*	*	*	*	*		*
7	6	<i>GORASP1</i>	3p22.2	*	*		*	*	*	*
8	6	<i>IQSEC1</i>	3p25.2-p25.1	*	*		*	*	*	*
9	6	<i>CGGBP1</i>	3p11.1	*	*	*	*	*		*
10	6	<i>PPP2R3A</i>	3q22.2-q22.3	*	*	*	*	*		*
52	1	<i>FLJ44898</i>	3q21.1			*				
53	1	<i>B3GALNT1</i>	3q26.1							*
54	1	<i>EPHB3</i>	3q27.1							*
55	1	<i>KBTD8</i>	3p14.1							*
56	1	<i>LRRC58</i>	3q13.33							*
57	1	<i>PARP3</i>	3p21.2							*
58	1	<i>TMEM45A</i>	3q12.2							*
59	1	<i>ACPL2 (PXYLP1)</i>	3q23			*				
60	1	<i>CHCHD6/C3orf46</i>	3q21.3							*
61	1	<i>CKLFSF6</i>	3p22.3		*					
62	1	<i>CLASP2</i>	3p22.3							*
63	1	<i>CMTM8</i>	3p22.3							*
64	1	<i>DZIP1L</i>	3q22.3							*
65	1	<i>HMGB1L5(Pseudo)</i>	3p24.3							*
66	1	<i>MANF</i>	3p21.2							*
67	1	<i>MITF</i>	3p13					*		
68	1	<i>USP19</i>	3p21.31							*
69	1	<i>MOBP</i>	3p22.1	*						
70	1	<i>DCBLD2</i>	3q12.1; 3	*						
71	1	<i>FNDC3B</i>	3q26.31			*				
72	1	<i>C3ORF21(XXYLT1)</i>	3q29			*				
73	1	<i>DHX30</i>	3p21.31			*				
74	1	<i>ABTV1/PODXL2</i>	3q21	*						

Примітки: 1.РЯ – рак яєчника; 2. РТК – рак товстого кишечника; 3. РМЗ – рак молочної залози; 4. РШМ – рак шийки матки; 5. РЛ – рак легені; 6. РН – рак нирки; 7. РПЗ – рак передміхурової залози; 8. * - статистично-значущі зміни при FDR=0,2

У табл. 1 наведено гени та локуси зі змінами у 6-7 локалізаціях пухлин, що характеризують загально-пухлинні зміни та у одній локалізації (пухлино-специфічні порушення). Необхідно відмітити, що найбільша кількість змін - це гетерозиготні та гомозиготні делеції або метилювання у всіх представлених семи локалізаціях епітелійних пухлин. Ампліфікація та деметилювання є досить рідкісним випадком у цих типах пухлин у порівнянні з лейкемією [Dunwell *et al.*, 2009]. Отже, делеції та метилювання були в центрі уваги наших досліджень. Із 74 виявлених генів та локусів, 40 генів та/або локусів із змінами були із короткого плеча (3p) хромосоми 3 та 34 гена та/або локусу з довгого плеча (3q) 3-ої хромосоми. Так, 5 генів (*FOXP1*, *LRRC3B*, *NKIRAS1*, *RBSP3 (CTDSPL)*, *ZIC4*) мають зміни у всіх семи видах досліджених пухлин (не показано). Вони знаходяться в регіоні 3p14-3p24. П'ять генів та локусів мають зміни у 6-и з 7-и локалізацій епітелійних пухлин: *ITGA9*, *GORASP1*, *IQSEC1*, *CGGBP1*, *PPP2R3A*. Гени *GORASP1*, *IQSEC1*, *CGGBP1*, *NBEAL2* та *VHL* локалізовані у регіоні 3p12-3p26; гени *PPP2R3A*, *FGF12*, *ALDH1L1*, *GATA2* і *PLCL2* розташовані в області 3q13-3q28. Велика кількість генів із однаковими змінами у різних епітелійних пухлинах свідчить про загальні механізми розвитку раку.

22 гени із 74 мають зміни лише в одному типі пухлин. Значна частина з них (13 генів та/або локусів) зустрічається при раку передміхурової залози. Ці результати наштовхують на припущення про специфічні особливості канцерогенезу та певні особливі механізми розвитку раку передміхурової залози. Ці факти потребують детальніших досліджень.

Аналіз статусу метилювання промоторних ділянок генів для виявлення епігенетичних порушень у епітелійних пухлинах. Встановлення метилювання промоторів генів проведено за допомогою методів метил-специфічної ПЛР та бісульфітного секвенування. Для генів *LRRC3B*, *ITGA9*, *THRB*, *RBSP3* методом бісульфітного секвенування підтверджено наявність метилювання промоторних ділянок у пухлинах яєчника. Як приклад, на рис. 2 наведено фрагмент промотора гена *ITGA9*, який досліджували методом бісульфітного секвенування, та фрагменти електрофореграми з метильованим та неметилюваним NotI-сайтом та CpG-динуклеотидами. Крім того, для гена *ITGA9* досліджено метилювання промотора і в пухлинах товстого кишечника (рис. 3а, б).

Два зразки пухлин яєчника, у яких аналізували по 8 клонів (рис. 3а), показали 41,1 та 43,75% загального метилювання досліджуваної ділянки та 43,75% метилювання CpG-динуклеотидів NotI-сайту. Дослідження двох зразків пухлин кишечника з делецією та/або метилюванням гена *ITGA9* за даними NotI-мікропанелей показало 66,7 та 39,3% метилювання 14-и пар CpG-динуклеотидів (рис. 3б) та 83,3 й 50% метилювання CpG-динуклеотидів NotI-сайту по результатам бісульфітного секвенування 6-и клонів кожного зразка. У третьому зразку пухлин кишечника, який не мав змін за даними NotI-мікропанелей (рис. 3б, зразок 3) не виявлено метилювання у досліджуваній ділянці промотора гена *ITGA9*.

Отже, встановлення статусу метилювання промоторів досліджуваних генів підтверджують дані NotI-мікропанелей про наявність епігенетичних порушень у

a

Номер	СрG	1	2	3	4		
		CCCTGGGGTCCCAGCCCAGAGCGTGGGGGGAGAGCCGCTAGAGTTGTCTCCTCCGCGCGC					
		5	6	7			
		CCAGCTAGACTCGGCTTCACTCTCTGAATCGAAAAGTAACTTGGCTCCTCTGCCTCCGG					
		8	9	10	11	12	13
		GCGGCCGCGCTGGCCAGCGAGCCTCCTGAACCTCGCAGGGCCTGGAGGAGTCGGGGC					
			14				
		ACTGGAGCTGCACCCCTCCCCGTTTTGGGGAACCCCTGAGGAAGGAGTATAGCCTCTC					

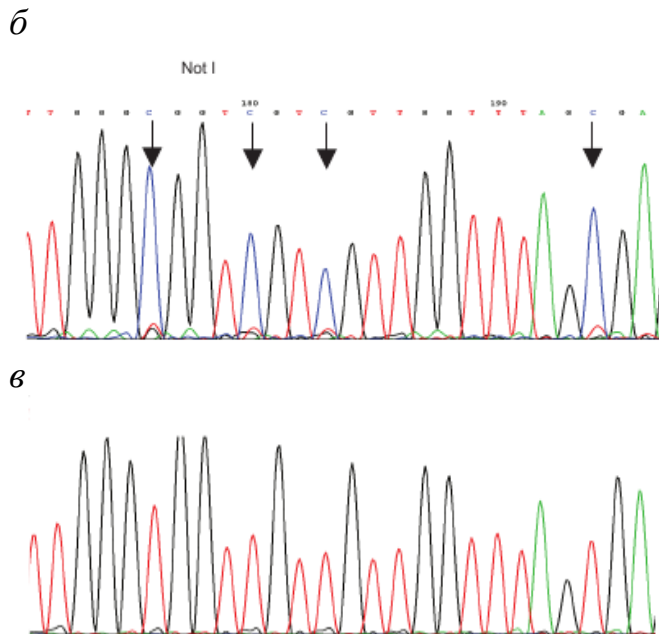


Рис. 2. Фрагмент промотора гена *ITGA9*, який досліджували методом бісульфітного секвенування: *a* - послідовність промоторної ділянки з вказаними праймерами (жирний шрифт) та 14-ма парами

СрG-динуклеотидів;

***б* - фрагмент хроматограми з метильованим NotI-сайтом та СрG-динуклеотидами;**

***в* - фрагмент хроматограми з неметильованим NotI-сайтом та СрG-динуклеотидами**

пухлинах яєчника та товстого кишечника.

Інший метод, який дозволяє встановлювати статус метилювання СрG-динуклеотидів, – метил-специфічна ПЛР (МСП). Цим методом нами досліджено метилювання промоторних ділянок низки генів у пухлинах нирки. Так, вивчення метилювання промоторних ділянок геномної ДНК генів *NKIRAS1*, *PPM1M*, *PRICKLE2*, *LRRC3B*, *SEMA3B*, *GPX1*, *GPX3* і *GPX4*, які мали зміни у пухлинах нирки *PRICKLE2* за даними NotI-мікропанелей та відкритих баз даних [Brigelius-Flohé *et al.*, 2013], не підтвердило наявності метилювання досліджуваних регіонів для генів *NKIRAS1*, *PPM1M*, *PRICKLE2*, *GPX1*, *GPX3*, *GPX4*.

Отримані дані дають можливість припустити, що ці гени можуть мати генетичні порушення у пухлинах нирки. Тоді, як для гена *LRRC3B* цим методом доведено наявності метилювання промоторної ділянки більше, ніж 65% у пухлинах нирки. Ці результати підтверджено і бісульфітним секвенуванням. Ген *SEMA3B*, для якого було вивчено статус метилювання, розташований у регіоні 3p21.31, який має назву LUCA та в якому виявлено часті порушення у злоякісних новоутвореннях [Senchenko *et al.*, 2004, Ji *et al.*, 2005]. Він містить два СрG-острівці: один розташований в області промотора (1-й СрG-острівець, hg38 / chr3: 50,267,308-50,267,797, 22 СрG-динуклеотида), а інший - у першому нітроні (2-й СрG-острівець, hg38 / chr3: 50,268,972-50,269,271, 12 СрG-динуклеотидів).



Рис. 3. Профілі метилювання 14-ти CpG-динуклеотидів за результатами бісульфітного секвенування клонів гена *ITGA9* у пухлинах яєчника (*a*) та товстого кишечника (*б*): ■ – метильовані CpG; □ – неметилювані CpG; 8 і 9 CpG-динуклеотиди асоційовані з NotI-сайтом

Ми проаналізували профіль метилювання промоторної ділянки гена *SEMA3B* бісульфітним секвенуванням та МСП у двох локалізаціях раку: рак нирки та рак легені обома методами. Аналіз результатів бісульфітного

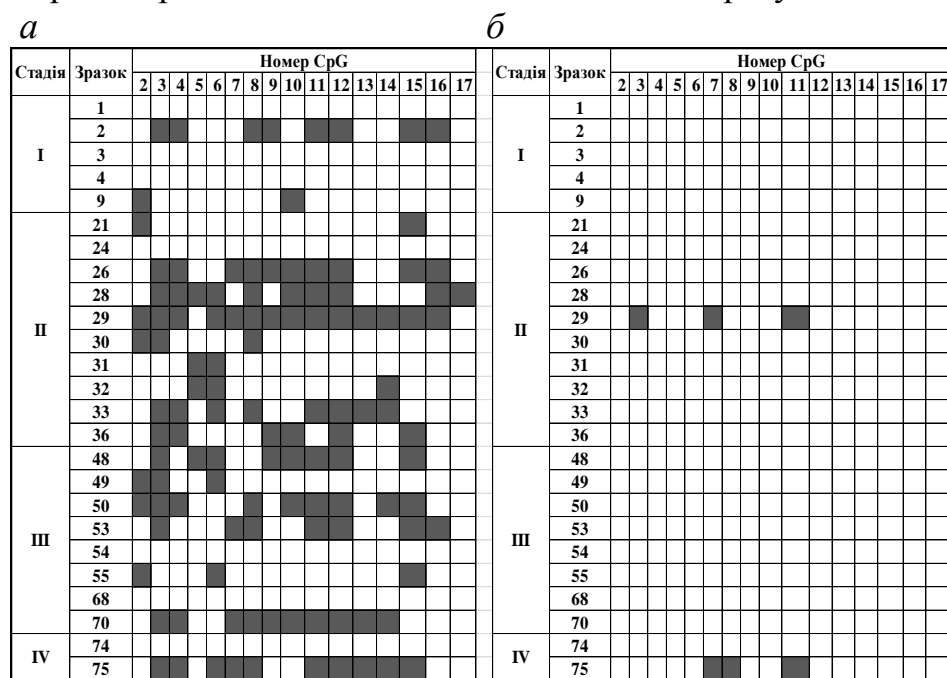


Рис. 4. Профіль метилювання промоторного CpG-острівця гена *SEMA3B* у пухлинах нирки (*a*) та умовно-нормальних тканинах нирки (*б*) за даним бісульфітного секвенування: ■ - метильовані; □ - неметилювані CpG-динуклеотиди

секвенування у 25 первинних пухлинах нирки (рис. 4) виявив наявність метилювання промоторного CpG-острівця у 11 з 25 первинних пухлин нирки.

Серед парних гістологічно нормальних тканин метильовані CpG-динуклеотиди були виявлені лише у 2 з 25 випадків пухлин нирки. Виявлення частоти метилювання промотора гена *SEMA3B* методом МСП на вибірці пухлин нирки (табл. 2) показало 52% (43/83) зразків пухлин з метильованими промоторними острівцями. Інтронний CpG-острівець метильований менше, ніж

Таблиця 2.

Частота метилювання двох CpG-острівців гена *SEMA3B* у пухлинах нирки

Стадії	Промоторні CpG (3, 4)				Інтронні CpG (9-12)			
	Пухлини		УНТ		Пухлини		УНТ	
	№ мет	% мет	№ мет	% мет	№ мет	% мет	№ мет	% мет
I (n=20)	8	40	0	0	9	45	0	0
II (n=23)	10	44	1	4	7	30	2	9
III (n=30)	18	60	1	3	10	33	5	17
IV (n=10)	7	70	1	10	6	60	0	0
Всього (n=83)	43	52	3	4	32	39	7	8
p-рівні *П/УНТ	p<0,001				p<0,001			

Примітка. * - p-рівні за тестами Фішера та χ -квадрат

промоторний острівець - 39% (32/83). Частоти метилювання обох острівців були значно вищими у тканинах пухлин, ніж у парних умовно-нормальних тканинах (УНТ) (p<0,001).

Аналіз профілю метилювання 16-и CpG-динуклеотидів промоторної ділянки *SEMA3B* проведено також на 12-и недрібноклітинних пухлинах легені, з яких 5 аденокарцином легені різних стадій та 7 плоскоклітинних карцином легені різних стадій та їхніх парних умовно-нормальних тканинах. Частота метилювання за даними бісульфитного секвенування складала >40% від аналізованих CpG-динуклеотидів. Метилювання знайдено у 2 з 5-и аденокарцином легені (обидва зразки 3-ої стадії) та всіх 7-и плоскоклітинних карцином легені у 2-12 CpG-динуклеотидах промоторної ділянки гена *SEMA3B*.

Для підтвердження частот метилювання обох CpG-острівців *SEMA3B* ми провели дослідження на іншому сеті пухлин легені методом МСП на 38 зразках недрібноклітинних пухлин легені різних стадій та УНТ. Частота метилювання промоторного CpG-острівця гена *SEMA3B* становить 44% (7/16) у аденокарциномах легені та 45% (10/22) у плоскоклітинних карциномах легені. Інтронний CpG-острівець має дещо нижчі показники метилювання, які становлять 38% (6/16) та 32% (7/22) у аденокарциномах та плоскоклітинних карциномах легені відповідно. В усіх досліджуваних групах пухлини легені мають статистично значуще підвищення метилювання обох CpG-острівців у порівнянні з нормою (від p=0,04 до p=0,01).

Таким чином, метилювання обох CpG-острівців гена *SEMA3B* є ознакою раку нирки та легені і в подальшому може бути розцінене як потенційний біомаркер цих пухлин. Як і очікувалося, метилювання 1-го та 2-го *SEMA3B* CpG-острівця не виявлено у зразках ДНК, виділених з лімфоцитів крові здорових донорів (n=15). Дані МСП узгоджуються з результатами бісульфитного секвенування для зразків раку нирки і легені та УНТ.

Для підтвердження результатів NotI-мікропанелей у пухлинах передміхурової залози ми провели бісульфитне секвенування 4 генів: три гени

(*FGF12*, *GATA2*, *LMCD1*) мали високий відсоток делецій та/або метилювання у злоякісних пухлинах передміхурової залози, ген *TESSP2* використовували у якості негативного контролю. Було відібрано 12 зразків карцином передміхурової залози з сумою за шкалою Глісона (СГ) від 4 до 9 з високим відсотком змін за даними NotI-мікропанелей для проведення бісульфітного секвенування. Результати бісульфітного секвенування свідчать про наявність метилювання NotI-сайту промотора гена *FGF12* у 6 з 11 клонів (55%) та високий рівень метилювання всього досліджуваного регіону. Інші 11 зразків раку передміхурової залози показали 40-80% метилювання NotI-сайту гену *FGF12*. Також високий рівень метилювання промоторних ділянок (30-70%) знайдено для генів *GATA2* та *LMCD1*, тоді як метилювання контрольного гена *TESSP2*, який слугував негативним контролем, спостерігалось на рівні не вище 10%. Таким чином, результати бісульфітного секвенування співпадають з даними NotI-мікропанелей та підтверджують факт, що метилювання пухлино-асоційованих генів є поширеною подією у аденокарциномах передміхурової залози.

Встановлення генетичних аберацій генів з високим відсотком змін за даними NotI –мікропанелей у епітелійних пухлинах. Гени, які за даними NotI –мікропанелей мають високий відсоток змін у пухлинах, але в яких не знайдено метилювання, вірогідно мають генетичні порушення. Для виявлення цих змін нами проведено пошук делецій методами втрати гетерозиготності (LOH) та встановлення кількості копій гена. Ці методи дозволяють виявити як делеції, так і ампліфікації (дублікації) гена/локуса або регіона в залежності від того який тип маркерів використовувався для дослідження генетичних порушень. Так, для гена *NKIRAS1* встановлено кількість копій гена у 19 зразках пухлин нирки за допомогою кількісної ПЛР з референсним геном *TBP*. Було виявлено 13 гемізіготних делецій та 3 гомозиготні делеції у пухлинах нирки. Це співпало з даними NotI-мікропанелей більше, ніж на 80% для досліджуваних зразків пухлин. Слід зазначити, що в парних УНТ нирки не було змін кількості копій гена *NKIRAS1*. Отже, ген *NKIRAS1* має генетичні зміни, а саме - делеції у пухлинах нирки, що підтверджує результати NotI-мікропанелей.

Дослідження кількості копій генів *PPM1M* та *PRICKLE2* проведено на 18 зразках пухлин нирки та парних УНТ. Аналіз результатів кількості копій гена кПЛР виявив наявність у пухлинах нирки 9 гемізіготних делецій як для гена *PPM1M* так і для гена *PRICKLE2*. Крім того, знайдено одну гомозиготну делецію гена *PPM1M*.

Дослідження генетичних порушень генів *GPX1* та *GPX3* показало відсутність втрати гетерозиготності генів, тоді як аналіз кількості копій цих генів методом кПЛР, проведений на 12 зразках пухлин нирки та парних УНТ показав наявність гомо- та гемізіготних делецій у 11 з 12 досліджених пухлин нирки (91,7%) для гена *GPX1*. Тоді як *GPX3* навпаки має інший тип генетичних порушень – ампліфікації. Про це свідчать показники кількості копій гена >1,4 (6 з 12 зразків пухлин нирки, що складає 50%). Ці дані підтверджуються й біоінформативними даними бази cBioPortal (<http://www.cbioportal.org>).

Аналіз експресії пухлино-асоційованих генів з високим відсотком генетичних та/або епігенетичних порушень у епітелійних пухлинах за даними NotI –мікронанелей і відкритих баз даних. За допомогою нозерн-блот аналізу нам вдалось отримати дані відносної експресії на рівні мРНК двох генів - *GORASP1* та *GNAI2* у пухлинах яєчника. Отримані дані свідчать про те, що відносна експресія *GORASP1* значно знижується в аденокарциномах різних стадій у порівнянні з нормальними тканинами ($p < 0,05$). Вивчення методом нозерн-блотингу відносної експресії *GNAI2* вказує на зниження експресії в усіх досліджених злоякісних пухлинах порівняно з нормальними тканинами ($p < 0,05$). Інші результати відносної експресії генів отримано за допомогою кількісної ПЛР. Встановлено значне зниження рівня відносної експресії гена *NKIRAS1* у 75% зразків пухлин нирки (9 з 12, $p < 0,002$) порівняно з УНТ. Відносна експресія гена *GPX1* у пухлинах нирки була значно знижена у 9 з 12 зразків більш ніж у 2 рази ($p < 0,02$) у порівнянні з умовно-нормальною тканиною, що становить 75%. Відносна експресія гена *GPX3* знижена у всіх зразках зразків пухлин нирки ($p < 0,01$) у порівнянні з УНТ. Аналіз відносної експресії гена *PPM1M* дозволив виявити зразки пухлин з трьома різними рівнями експресії: знижена (більше ніж у 2 рази), незмінна та підвищена (більше ніж у 2 рази) експресія гена. Підвищена експресія *PPM1M* була виявлена у 50% зразків (9 з 18). Знижену експресію *PPM1M* спостерігали у 33,3% (6 з 18) зразків. Так у 16,7% випадків (3 з 18) статистично значущих змін експресії виявлено не було. Інша картина спостерігалася при аналізі рівнів відносної експресії гена *PRICKLE2*. У більшості зразків 15 з 18 рівні відносної експресії цього гена були знижені. Це становило 83% зразків пухлин. Жодних значущих кореляцій між експресією генів та віком, статтю або стадією атипії не виявлено ні для гена *PPM1M*, ні для гена *PRICKLE2*.

Ген *SEMA3B* за даними наших досліджень має епігенетичні порушення, а саме - метилювання промоторної ділянки у пухлинах нирки та легені. Дослідження його експресії та метилювання ДНК й встановлення копій гена проводили на 48 пухлинах нирки (1-4 стадії захворювання) та УНТ (рис. 5).

У 23 зразках пухлин спостерігається значне зниження експресії *SEMA3B* (більше ніж у 2 рази). У 8 зразках пухлин навпаки спостерігається значне підвищення експресії *SEMA3B* (більше ніж у 2 рази). У 16 зразках пухлин нирки зміни експресії досліджуваного гена не виявлено. Кореляції між експресією та клініко-патологічними показниками не виявлено. Але вивчення кореляції між відносною експресією та генетичними/епігенетичними порушеннями гена *SEMA3B* на досліджуваній вибірці пухлин нирки має певні залежності. Дослідження метилювання показало наявність метилювання у 27 зразках пухлин з 48 у промоторному CpG-острівці (56% зразків пухлин), та у 19 з 48 зразків пухлин у інтронному CpG-острівці (40% зразків) гена *SEMA3B*. Майже всі випадки метилювання промоторного острівця пов'язані зі зниженням експресії гена.

Коефіцієнт кореляції за Спірменом (r^s) між експресією та метилюванням промоторного CpG-острівця складає 0,50 ($p < 0,01$), а інтронного CpG-острівця – 0,25 ($p < 0,01$). Тоді як кореляцій між експресією та кількістю копій гена *SEMA3B* не виявлено. Отже, ці дані свідчать про те, що метилювання промотора гена

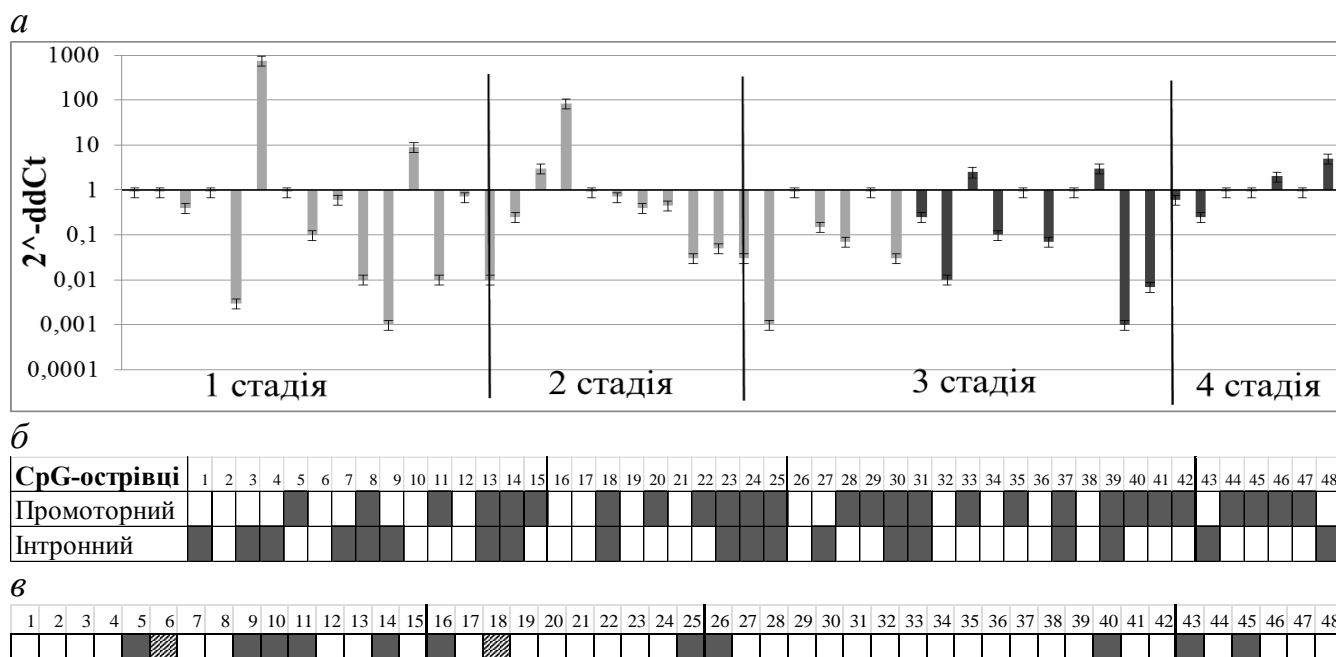


Рис. 5. Відносна експресія *SEMA3B* у пухлинах нирки та генетичні та/або епігенетичні зміни гена: а - відносна експресія; б - статус метилювання двох СрG-острівців: ■ - метилювання; □ - без змін; в - кількість копій гена *SEMA3B*: ■ - гомо- та гемізіготні делеції; ▨ - ампліфікації; □ - без змін

SEMA3B є ймовірною причиною його інактивзації у злоякісних пухлинах нирки. Дослідження рівнів відносної експресії гена *SEMA3B* проведено на 50 парах зразків пухлин нирки 1-4 стадії та УНТ. Результати аналізу показали наявність значного зниження експресії *SEMA3B* у пухлинах нирки в середньому у 4 рази в 42 з 50 зразків пухлин. Це становить 84% зразків пухлин нирки.

Вивчення рівнів відносної експресії гена *SEMA3B* у недрібноклітинних пухлинах легені виявило значне зниження експресії *SEMA3B* (від 2 до 300 разів) у 30 з 32 зразків пухлин легені, що становить 94% від усіх досліджених пухлин. Причому це зниження експресії притаманно обома підтипам раку легені, але середній рівень зниження експресії у аденокарциномах складає 10 разів та 92% зразків, а в плоскоклітинних карциномах - 14 разів та 95% зразків пухлин.

Наступні гени, які мали значущі порушення за даними NotI-мікропанелей, зокрема у пухлинах передміхурової залози, це гени *BHLHE40*, *BCL6*, *ITGA9*. Рівні відносної експресії цих генів встановлені методом кПЛР у 11 парах зразків пухлин та УНТ передміхурової залози з різними СГ та стадіями захворювання. Вони свідчать, що усі досліджені гени мають середнє зниження експресії приблизно в 3 рази у пухлинах передміхурової залози ($p < 0,05$). Так, 5 з 11 зразків пухлин мають значуще зниження експресії усіх трьох генів одночасно. Отже, незалежно від характеру змін, детектованих за допомогою NotI-мікропанелей, спостерігається зниження рівнів експресії генів, які мають значущі генетичні та/або епігенетичні порушення.

Встановлення потенційної супресорної функції гена *SEMA3B* у пухлинах епітелійного походження in vitro та in vivo. Згідно наших результатів та даних інших дослідників ген *SEMA3B* з 3-ої хромосоми людини є потенційним геном-

супресором росту пухлин, функцію якого ми й намагались дослідити. Клітинна лінія мілкоклітинного раку легені U2020 була трансфікована плазмідами рЕТЕ/SEMA3В з доксициклін-регульованою експресією. Трансфіковані клітини культивувались 15 діб. Показники швидкості росту клітин, результати тесту на формування колоній та показники проточної цитометрії з пропідум йодидом (PI-FACS-аналіз) наведено на рис. 6. Швидкість росту клітин U2020, які експресували SEMA3В, значно нижча, ніж у контрольних клітин U2020 (рис. 6а) починаючи з 5-ї доби культивування ($p < 0,01$). У кожному випадку показано середнє значення \pm стандартне відхилення із 4-х повторів. Тест на формування колоній показав, що кількість колоній з U2020 клітин, які експресували SEMA3В, значно нижча після зняття впливу супресивної дії доксицикліну на експресію SEMA3В (рис. 6б) та становила 890 ± 60 колоній у порівнянні з 190 ± 40 колоній для контрольних клітин U2020 ($p < 0,01$). За даними проточної цитометрії з пропідум йодидом (рис. 6в 2) виявлено значне збільшення апоптичних та некротичних клітин U2020, що експресували SEMA3В (без доксицикліну) у порівнянні з клітинами під впливом цього інгібітору експресії з $(7 \pm 2) \times 10^2$ до $(49 \pm 5) \times 10^2$ клітин ($p < 0,01$) (рис. 6в 1).

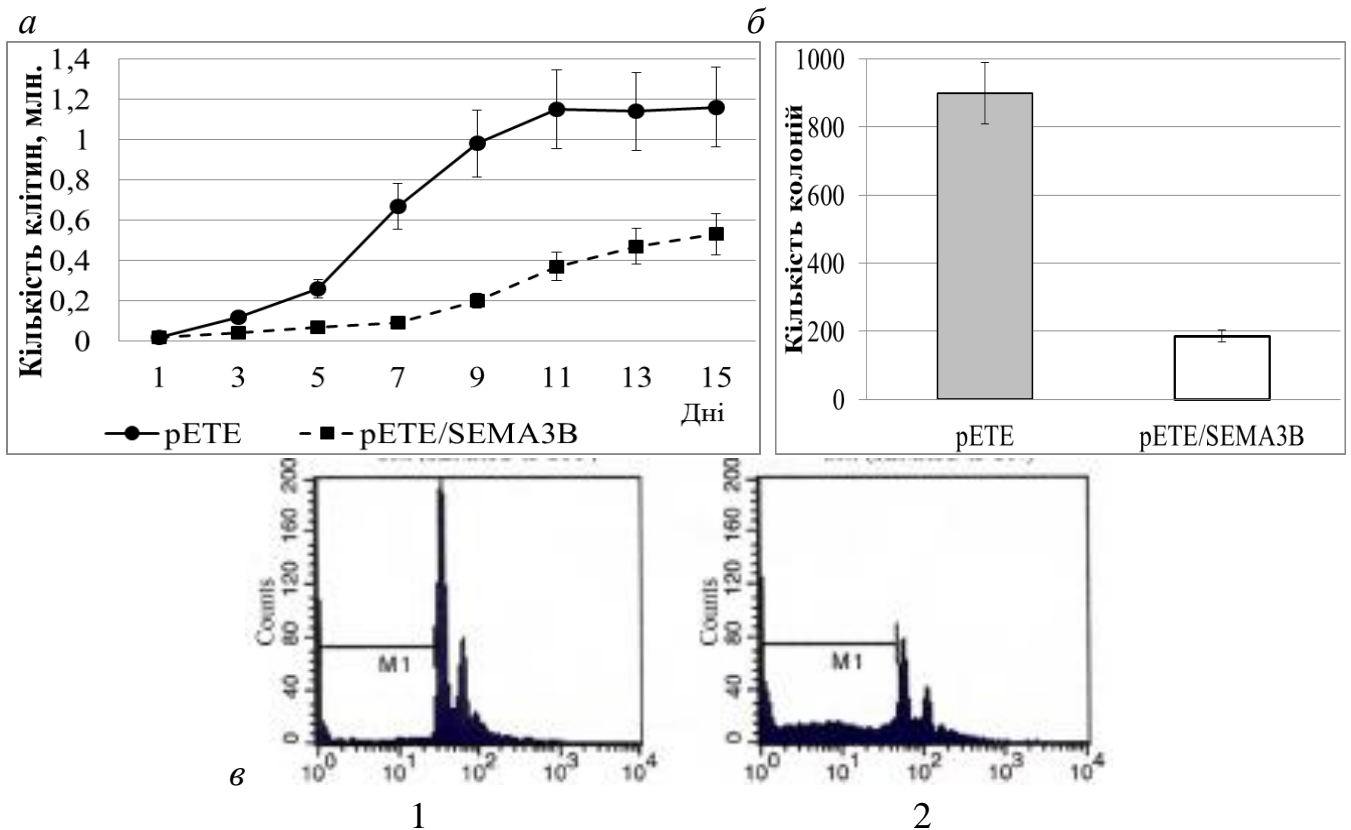


Рис. 6. *In vitro* культивування клітин U2020 (U7111 клон) в залежності від експресії SEMA3В. а – швидкість росту клітин U2020; б – тест на формування колоній; в – дані PI-FACS-аналізу: 1 - Докс+(SEMA3В-) $7 \pm 2 \times 10^2$ апоптичних клітин; 2 - Докс-(SEMA3В+) $49 \pm 5 \times 10^2$ апоптичних клітин

Отже, дані, отримані на культурі клітин *in vitro*, свідчать про те, що SEMA3В здатен інгібувати ріст клітин пухлин U2020, індуюючи в них апоптоз.

Далі ми дослідили чи здатен SEMA3В проявляти супресорні властивості на ріст пухлин на моделі *in vivo*. Для цього знову використали клітинну лінію U2020

з регульованою доксицикліном експресією *SEMA3B* у модельній системі *in vivo* на імунодефіцитних мишах, яким підшкірно вводили клітини пухлин (рис. 7, 8).

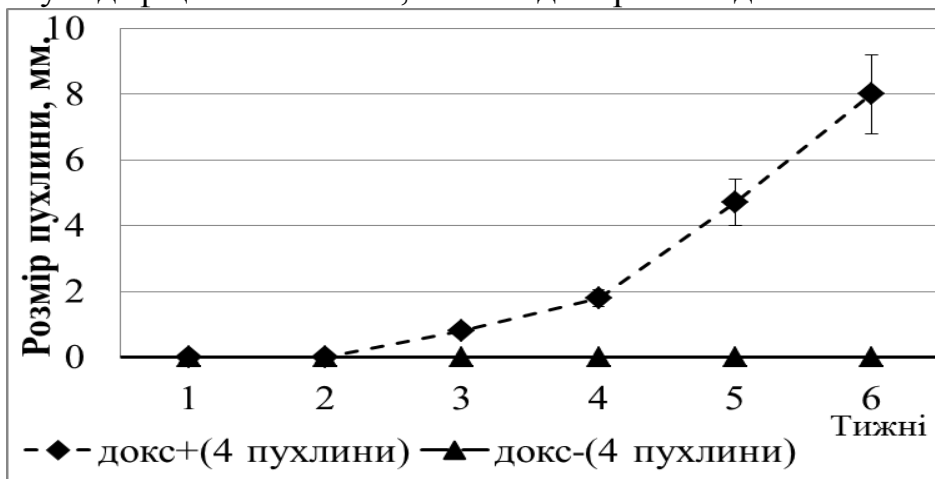


Рис. 7. Інгібування росту пухлин в імунодефіцитних мишах за експресії *SEMA3B*
 докс+ - введені U2020 клітини без експресії *SEMA3B*; докс- - введені U2020 клітини з експресією *SEMA3B*

Чотири миші отримували доксициклін-вмісну воду (докс+, контрольні тварини), яка інгібувала експресію трансгену у U2020 пухлинних клітинах. Чотири миші з введеними підшкірно у задню лапу пухлинними клітинами з трансгеном не отримували доксициклін (докс- миші), тобто за цих умов *SEMA3B* активно експресувався у U2020 клітинах, що було підтверджено за допомогою Нозерн-блот аналізу. Дані розмірів пухлин з U2020, що спостерігались у імунодефіцитних мишах протягом 6-и тижнів, наведено на рис. 7.

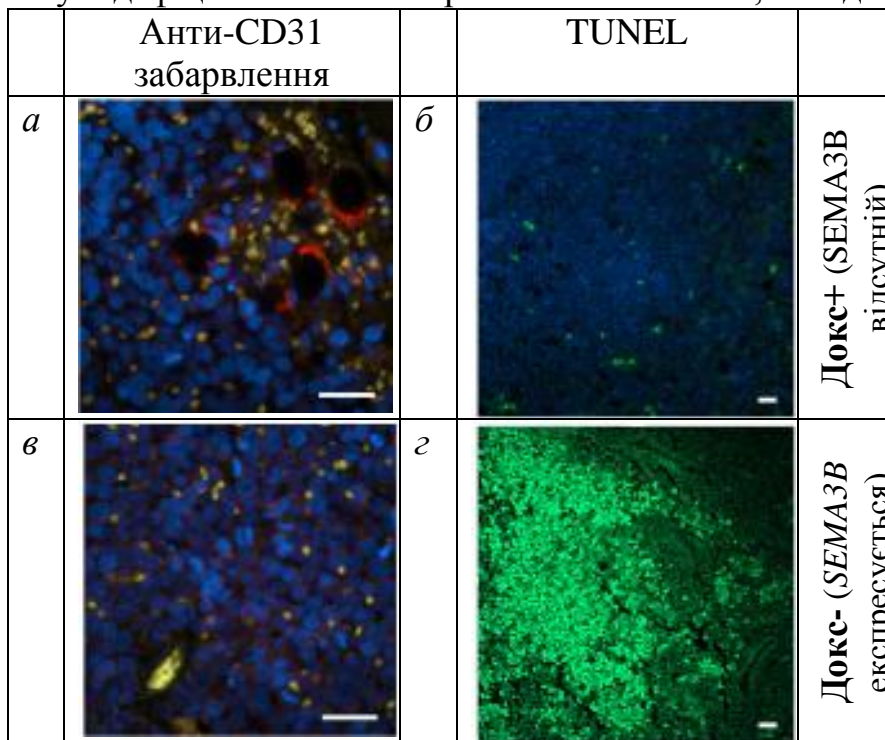


Рис. 8. Гістологічні препарати пухлин: а, б – експресія *SEMA3B* відсутня (при вживанні доксицикліну мишами у питній воді); в, г - *SEMA3B* експресується (мишам не давали доксициклін). а, в – забарвлення анти-CD31 для виявлення кровоносних судин (червоний сигнал); б, г – апоптичні клітини (зелений сигнал)

Гістологічне дослідження пухлин (які спостерігались за відсутності експресії *SEMA3B*) (рис. 8а, б) підтвердило наявність ділянок активної проліферації клітин та посиленого ангіогенезу. На гістологічних препаратах тканин мишей, коли *SEMA3B* відсутній. На рис. 8а спостерігаються поля заповнені еритроцитами (червоний сигнал). Жовтий сигнал виявляє колокалізацію

зеленого та червоного сигналів (наявність кровоносних судин з клітинами крові). Синій сигнал – наявність ДНК. На рис. 8б, г - тест TUNEL з ділянками апоптичних клітин (зелене забарвлення) - особливо інтенсивні при експресії *SEMA3B* (рис. 8г).

Гістологічне дослідження тканин мишей, які були взяті з місць введення пухлинних клітин, при експресії трансгена, показало наявність вираженого фіброзу, слабо диференційована строма та ділянки некрозу та апоптичні клітини (рис. 8г). Ці дані демонструють можливість супресії росту пухлин при активній експресії *SEMA3B* в імунодефіцитних мишах, що підтверджується результатами інших дослідників щодо впливу *SEMA3B* на підвищення експресії p53 і p21 та інгібування фосфорилування Akt (Ser473). *SEMA3B* може індукувати затримку клітинного циклу на фазі G1/S [Tang *et al.*, 2016].

Отже, отримані експериментальні дані свідчать про виявлення пухлино-супресорної функції гена *SEMA3B* у системах як *in vitro*, так і *in vivo*.

Встановлення змін експресії пухлино-асоційованих генів при канцерогенезі раку передміхурової залози у клітинних лініях *in vitro*. Аналіз рівнів відносної експресії 65 генів, що мають відношення до різних сигнальних шляхів у клітинних лініях раку передміхурової залози (ПЗ) (LNCaP, DU145 та PC3) проведено у порівнянні з умовно-нормальною клітинною лінією PNT2. Виявлено 35 диференційно-експресованих генів, які мають зміни BE більше, ніж у 4 рази у клітинних лініях раку ПЗ у порівнянні з нормальною клітинною лінією PNT2. Для 26 генів – рівні BE знижуються, а для 7 генів – підвищуються у клітинних лініях раку передміхурової залози. Два гени мали різноспрямовані зміни рівнів BE у клітинних лініях раку ПЗ порівняно з експресією генів у PNT2. Серед виявлених диференційно-експресованих генів наступні належать до Wnt шляху: *WNT7A*, *TCF7L2*, *FAT1*, *MYO1B*; до Nf-kB шляху: *CXCL2*, *IL8*, *IL1RL1*, *IL1b*, *S100A4*, *TNFRSF11B*; до p53-шляху: *CCNE1*, *TAGLN*, *CCNB2*, *SOX4*, *P16*; до шляхів адгезії: *CSPG4*, *CDH1*, *EFNA5*, *SEMA3A*, *CDK5*, *FYN*; до сигнальної трансдукції: *HOXA13*, *RASSF4*, *NR5A2*; до шляхів інвазивності та метастазування: *PLAU*, *SERPINE1*, *SERPINE2a*, *S100A4*; ангиогенезу: *CXCL1*, *CXCL2*, *CXCL6*, *IL8*, *MME*; до системи клітинної проліферації та репарації: *CCNE1*, *CCNB2*, *HBEGF*, *P16*, *PCNA*. Гени, які мали пороговий цикл (Ct) більше, ніж 30 у лінії PNT2, не включено в аналіз.

На підставі отриманих рівнів BE генів нами були вибрано низку генів, експресія яких відрізняється між андроген-чутливими та андроген-нечутливими клітинними лініями, що характеризуються різними ступенями агресивності. Так, гени *IL8*, *HOXA13*, *IL1RL1*, *IL1B* мають підвищені рівні експресії у андроген-нечутливій клітинній лінії PC3. З 65 досліджуваних генів знайдено зміни експресії для 29 генів в клітинній лінії LNCaP, для 20 генів — в DU145 та для 16 генів - в PC3. В клітинній лінії LNCaP відмічено інгібування Wnt шляху. В клітинних лініях LNCaP та PC3 виявлено інгібування p53 опосередкованого апоптозу. Зниження експресії генов *SEMA3A* може свідчити про активізацію сигнальних шляхів, контролюючих міграцію клітин. В усіх лініях раку ПЗ простежуються ознаки підсилення ЕМП, який проявляється у зниженні рівня експресії генів

клітинної адгезії та епітелійних маркерів (*CDH1*, *CSPG4*, *EFNA5*, *FYN*). Також в клітинних лініях раку передміхурової залози простежується активація процесів інвазивності, метастазування та ангиогенезу. Про це можуть свідчити підвищення рівнів експресії генів *S100A4*, *IL8*, та зниження рівнів експресії генів-інгібіторів серпінових пептидаз (*SERPINE1*, *SERPINE2a*, *SERPINE2b*). Таким чином, сигнальними шляхами, що зазнають найбільших змін експресії генів протягом переходу від неагресивних до агресивних типів раку ПЗ, змодельованому на клітинних лініях, пов'язані з адгезією клітин, інвазивністю та метастазуванням.

Для пошуку потенційних експресійних маркерів, що характеризують відмінності між андроген-чутливими (LNCaP), які є менш агресивними, та андроген-нечутливими (PC3) (більш агресивними) пухлинами передміхурової залози ми встановили та порівняли рівні BE 84 генів з використанням комерційного експресійного мікрочипу Cancer PathFinder RT2 Profiler PCR array PAHS-033 (Qiagen). Аналіз отриманих даних BE показав, що 36 генів мали зміни рівнів експресії у клітинній лінії PC3 порівняно з LNCaP більш ніж у 4 рази. З них 10 генів мали підвищені рівні BE, а 26 генів мали знижені рівні BE у клітинній лінії PC3 порівняно з LNCaP. Серед них гени контролю клітинного циклу і репарації ДНК: *ATM*, *CDKN2A*, *BRCA1*, *CDC25A*, *S100A4*, *TP53*; гени апоптозу і клітинного старіння: *BAX*, *BCL2*, *BCL2L1*, *CASP8*, *TNFRSF10B*, *TNFRSF1A*; гени сигнальної трансдукції і транскрипційні фактори: *ETS2*, *FOS*, *NFKBIA*, *SNGG*, *PIK3R1*; гени адгезії: *ITGA1*, *ITGA3*, *ITGB1*, *ITGAV*, *EPDR1*, *MCAM*, *MTSS1*; гени ангиогенезу: *PDGF*, *TGFB1*, *THBS1*, *VEGFA*; гени шляхів інвазивності і метастазування: *MET*, *MMP1*, *MTA2*, *NME4*, *PLAU*, *SERPINB5*, *SERPINE1*, *S100A4*, *TWIST1*. Сім з цих диференційно-експресованих генів: *MET*, *MMP1*, *PLAU*, *SERPINE1*, *EPDR1*, *TGFB1*, *VEGFA*, мають білки, що секретуються, і можуть в подальшому розглядатися як маркери на рівні білка для визначення їх у біологічних рідинах (кров, сеча).

Підсумовуючи результати двох досліджень на клітинних лініях раку ПЗ методом ПЛР у реальному часі, ми відібрали низку генів для встановлення їхніх рівнів відносної експресії у клінічних зразках аденом, аденокарцином та УНТ передміхурової залози згідно їхніх функцій та ролі у канцерогенезі ПЗ. Це дозволить не тільки співставити результати отриманих досліджень, але й знайти диференційно експресовані гени та визначити можливі сигнальні шляхи, які беруть участь у перетворенні в андроген незалежний тип пухлин. На підставі результатів цих експериментів для вивчення BE генів на клінічних зразках пухлин ПЗ обрано наступні гени, враховуючи їхні функції та роль у канцерогенезі, а саме - *TAGLN*, *FOS*, *EFNA5* (з підвищеними рівнями BE у PC3) та *IL1B*, *PLAU*, *TGFB1*, *EPDR1* (зі зниженими рівнями BE у PC3). Рівні BE для цих генів встановлено у 16 аденомах (А), 37 аденокарциномах (П) ПЗ з різними стадіями та сумою за шкалою Глісона (СГ), з яких 29 зразків були парними УНТ передміхурової залози. За даними тестів Краскела-Уолліса та Дана-Бонфероні для множинних порівнянь виявлено статистично значущі різниці BE між П та А для генів *IL1B* та *FOS*. У гена *IL1B* є різниця між групами А та УНТ ($p < 0,02$). Ген *FOS* має дві статистично значущі різниці між парами груп: А та П з СГ < 7 ($p < 0,008$) та А УНТ ($p < 0,003$).

Крім того, для гена *FOS* виявлено й статистично значущу різницю між всіма П (без урахування СГ) та П ($p < 0,013$). Рівні BE були розділені на 3 номінальних значення на основі експресії контрольного зразка з аденом: 1-й - без змін (BE рівні в діапазоні 0,41-2,09), 2-й – знижені рівні BE ($BE \leq 0,4$) та 3-й - з підвищеними рівнями BE ($BE \geq 2,1$). Аналіз таблиць спряженості за точним тестом Фішера виявив 4 гени зі статистично значущими відмінностями між групами А, П та УНТ: *FOS* ($p = 0,0001$), *EFNA5* ($p = 0,0030$), *IL1B* ($p = 0,0180$) і *TGFBI* ($p = 0,0300$). Статистично значущі зміни спостерігали між А та П у BE *FOS* ($p = 0,0026$) та *EFNA5* ($p = 0,0047$). Крім того, знайдено зміни BE між П та УНТ для гена *TGFBI* ($p = 0,0233$). Розрахунки з урахування СГ виявили відмінності між А та П з $СГ \leq 7$ для *FOS* ($p = 0,007$) та *EFNA5* ($p = 0,0014$). Отримані результати лише частково співпадають з результатами експресії на клітинних лініях, що може бути спричинене як гетерогенністю експресії у пухлинах, так наявністю її у різних типах клітин, які присутні у пухлинах.

Вплив рівнів експресії референсних й досліджуваних генів на статистичні показники відносної експресії у кПЛР аналізі. Для нормалізації розрахунків рівнів BE ми обрали наступні комбінації: 1 референсний ген – *TBP*, 2 референсних гени - *TBP*, *HPRT*, та 4 референсних гени - *TBP*, *HPRT*, *ALAS1*, *TUBA1B*. Для дослідження було обрано 23 гени, які є маркерами фібробластів та пухлино-асоційованих фібробластів (ПАФ), макрофагів та пухлино-асоційованих макрофагів (ПAM) та гени, що асоційовані з імунними реакціями та відповіддю (ІАГ). Наші розрахунки показали, що відхилення BE з помилкою у 0,5 цикли для референсних генів була однаковою (1,414 разів) для всіх досліджуваних генів незалежно від рівнів експресії ні референсних, ні досліджуваних генів. Ці дані свідчать про важливість показника стійкості рівня експресії референсного гена, як превалюючого для аналізу відносної експресії генів.

Рівні BE розраховано за моделями $2^{-\Delta Ct}$ та $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Спочатку ми встановили рівні BE для парних зразків пухлин передміхурової залози (П) та УНТ для 23 досліджуваних генів за моделлю $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Ми вважали значущими зміни BE більш або менш 2 рази. Наші дані свідчать, що статистично значущі зміни за тестом Фішера з поправкою на множинні порівняння з $FDR=0,2$ мають 17 з 23 генів. Повне співпадіння статистичних даних спостерігалось для всіх груп референсних генів у 16 з 23 досліджуваних генів. Одинадцять з 16 генів мали статистично значущі різниці BE між П/УНТ групами, серед них 7 високо-експресованих та середньо-експресованих генів. Розбіжності у значеннях BE спостерігались у 7 з 10 досліджуваних генів, 6 з яких мали низькі рівні BE. Так, пороговий рівень співпадінь між значущими різницями для високо- та середньо-експресованих генів становив 25-30% зразків (10-11 пар зразків з 37), тоді як для низько-експресованих генів цей показник має бути не меншим за 35% (більше, ніж 13 пар зразків з 37) для запобігання можливого впливу помилок експресії генів та інгібіторів кПЛР реакцій для низько-експресованих генів.

Розрахунки за моделлю $2^{-\Delta Ct}$ з урахуванням патологічних характеристик пухлин. Згідно до цих результатів, усі три типи нормалізації референсних генів можуть бути використані для розрахунків BE генів для зразків пухлин

передміхурової залози. Відмінності у рівнях експресії досліджуваних і референсних генів не мають впливу, незалежно від використання моделей $2^{-\Delta C_t}$ та $2^{-\Delta\Delta C_t}$; тоді як стабільність експресії референсних генів є важливим параметром у дослідженні. Крім цього, рівні експресії досліджуваних генів, а також рівень змін значень BE, кількість зразків у групах та висока дисперсія експресії генів є важливими параметрами для вибору порогового рівня відмінностей між групами зразків для вірної інтерпретації даних.

Встановлення та аналіз експресії генів, що задіяні у епітелійно-мезенхімному переході (ЕМП) клітин раку ПЗ, гібридних транскриптів та некодувальних РНК. Нами вперше у групі з української популяції виявлено та детектовано експресію гібридного транскрипта (ГТ) - *TMPRSS2-ERG* (EF194202.1). Серед 37 аденокарцином виявлено експресію ГТ у 21 зразку злоякісних пухлин (56,8%) та 4 з 20 аденом (20%). У парних УНТ з 37 зразків виявлено 16 з експресією *TMPRSS2-ERG*, що становить 43% від групи УНТ. Серед аденокарцином з різним СГ показники експресії за частотою є такими: із 11 П з СГ<7 виявлено 6 зразків з експресією *TMPRSS2-ERG* (54,5%), з 9 П СГ=7 знайдено 7 зразків (77,8%) та з 17 зразків СГ>7 - 9 зразків з експресією ГТ (52,9%). Порівняння частот зразків з експресією ГТ (ГТ-позитивні) та його відсутністю (ГТ-негативні) при наявній вибірці зразків не дає значущої різниці між групами аденокарцином з різним СГ. Така ж ситуація (відсутність значущої різниці між частотами появи ГТ) має місце з порівнянням зразків, ГТ-позитивних та негативних з різними стадіями, рівнем ПСА. Пошук кореляцій за Спірменом не виявив жодної значущої кореляції між частотою появи гібридного транскрипта та клініко-патологічними характеристиками досліджуваних зразків. Тобто, можна припустити, що зміни у клітинах, що призводять до появи експресії ГТ, можуть відбуватися на ранніх стадіях канцерогенезу. Це дає можливість надалі умовно ділити пухлини на ГТ-позитивні та ГТ-негативні.

Ми обрали 19 генів, асоційованих з ЕМП для встановлення рівнів їх BE у 37 аденокарциномах (П) та парних УНТ з різними стадіями та СГ, та 20 аденомах. З них 11 зразків П мали СГ<7, 9 П були зі СГ=7, та 17 П з СГ>7. 22 П були 1-2 стадії та 17 П 3-4 стадії. Аналіз BE продемонстрував досить високі рівні гетерогенності BE, особливо у групі П. З 19 генів, асоційованих з ЕМП їх BE можна охарактеризувати як мінімум трьома рівнями: високо-експресовані гени (*PSA, PTEN, FNI, VIM, KRT18*), середньо-експресовані гени (*AR 1* ізоформа, *CDH1, NKX3.1, OCLN, PCA3, CASP3, MMP2, MMP9, XIAP*) та низько-експресовані гени (*AR 2* ізоформа, *CDH2, HOTAIR, SCHLAP1*). Приклад патернів BE низки досліджуваних генів наведено на рис. 9.

Статистичний аналіз парних зразків П/УНТ за парним тестом Вілкоксона з поправкою на множинні порівняння FDR=0,1 показав наявність значущих відмінностей BE для шести генів ($p<0,02$): *KRT18, MKI67, MMP2, MMP9, VIM, HOTAIR*. Причому BE у групі П підвищена у порівнянні з УНТ для всіх перелічених генів.

Пошук диференційно-експресованих генів між трьома групами зразків (П-УНТ-А) згідно тесту Дана-Бонферроні виявив 9 генів, що мають значущі різниці

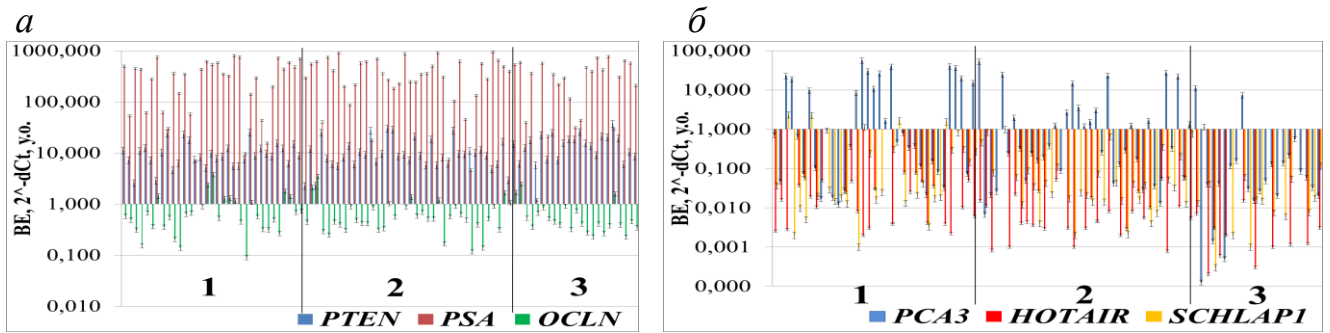


Рис. 9. Приклад патернів BE генів а - *PTEN*, *PSA* та *OCLN*; б - lncRNA: *PCA3*, *HOTAIR* та *SCHLAP1* у зразках аденокарцином (1), УНТ (2) та аденом (3) передміхурової залози

BE ($p < 0,05$). Так, гени *AR* (1 isof), *AR* (2 isof) і *PTEN* мають найвищі рівні BE у групах аденом, тоді як групи аденокарцином мають значно знижені BE ($p = 0,021$; $p = 0,047$; $p = 0,015$, відповідно). Подібні значущі зміни BE спостерігались також для групи аденом та УНТ передміхурової залози для *AR* (1 isof) та *PTEN* ($p = 0,045$; $p = 0,047$). BE *VIM* була найвищою також у аденомах і показала суттєві відмінності у порівнянні з групою УНТ ($p = 0,007$), тоді як ніяких відмінностей BE з групою аденокарцином не виявлено. Протилежна ситуація спостерігалася для BE *MMP9*, *PCA3* та *SCHLAP1* в аденомах. Вони показали найнижчі рівні, тоді як BE у групах аденокарцином була значно підвищеною ($p = 0,0001$; $p = 0,001$; $p = 0,013$, відповідно) та в групах УНТ – для *MMP9* ($p = 0,015$) та *PCA3* ($p = 0,006$). BE *KRT18* і *HOTAIR* продемонстрували аналогічну тенденцію змін. Найвищі рівні BE спостерігались у групах аденокарцином, ці рівні значуще відрізнялися як від УНТ ($p = 0,018$; $p = 0,047$; відповідно), так і від аденом ($p = 0,001$, $p = 0,0001$), які показали найнижчі рівні BE. Тільки гени *KRT18* та *HOTAIR* мали відмінності рівнів BE між групами аденокарцином та УНТ, за даними тесту Дана-Бонферроні. Аналіз BE досліджуваних генів серед 7 груп зразків з урахуванням різних СГ виявив 10 генів (*AR* (1 isof), *CASP3*, *CDH1*, *KRT18*, *MMP9*, *OCLN*, *XIAP*, *PCA3*, *HOTAIR*, *SCHLAP1*), які мали значущі відмінності за даними тесту Краскела-Уолліса з $FDR = 0,1$. Серед значущих змін BE 8-и з цих генів за тестом Дана-Бонферроні, для 7-и з них виявлено відмінності між П з різними СГ та аденомами. Причому для 6-и з цих генів, а саме *KRT18*, *MMP9*, *OCLN*, *PCA3*, *HOTAIR*, *SCHLAP1*, спостерігається значуще ($p < 0,05$) підвищення BE у групах П з різними СГ у порівнянні з аденомами, тоді як для гена *AR* (1 isof) виявлено значуще зниження BE у П СГ < 7 у порівнянні з аденомами. Два гени *CDH1* та *OCLN* мають відмінності BE між групами аденокарцином з різним СГ. Ген *CDH1* має значуще підвищення BE у П СГ = 7 у порівнянні з П СГ > 7 ($p = 0,041$), а *OCLN* має значуще підвищення BE у П СГ = 7 у порівнянні з П СГ < 7 ($p = 0,049$). Жодних відмінностей BE між аденокарциномами та УНТ не виявлено, тоді як для *PCA3* знайдено підвищення BE у УНТ СГ = 7 у порівнянні з А ($p = 0,021$). Тоді як лише 6 генів: *KRT18*, *MMP9*, *VIM*, *PCA3*, *HOTAIR*, *SCHLAP1* мають статистично значущі відмінності BE у експериментальних групах з урахуванням стадій згідно обох тестів. Відомо, що підвищення BE *KRT18*, *MKI67* свідчить про посилену проліферацію клітин у пухлинах, а збільшення BE *CDH2*, *MMP2*, *MMP9* та *VIM* -

про більшу рухливість клітин та посилення процесів ЕМП [Dongre *et al.*, 2019]. Підвищення ВЕ *HOTAIR*, пов'язують із активізацією процесів метастазування у пухлинах [Hajjari *et al.*, 2015]

Встановлення та аналіз рівнів ВЕ генів, асоційованих з раком передміхурової залози: рецепторів стероїдних та білкових гормонів, факторів росту та простато-специфічних протеїнів. Нами відібрано 14 транскриптів (10 генів), що представляють рецептори стероїдних та пептидних гормонів, факторів росту та метаболічні ферменти, які мають вплив на прогресію досліджуваного виду раку [Jordan *et al.*, 2016], для встановлення патернів їхньої ВЕ у аденокарциномах, УНТ та аденомах ПЗ. Встановлення рівнів ВЕ цих генів показало відсутність високо-експресованих генів, за винятком *IGF1R*. Більшість генів з цієї групи можна віднести до середньо-експресованих генів (*ESR1*, *GCR* (усі ізоформи), *INSRA*, *INSRB*, *PRLR*, *SRD5A2*) та низько-експресованих генів (*ESR2*, *VDR*, *PRL*, *SRD5A1*). Патерни ВЕ низки генів наведено на рис. 10. Аналіз

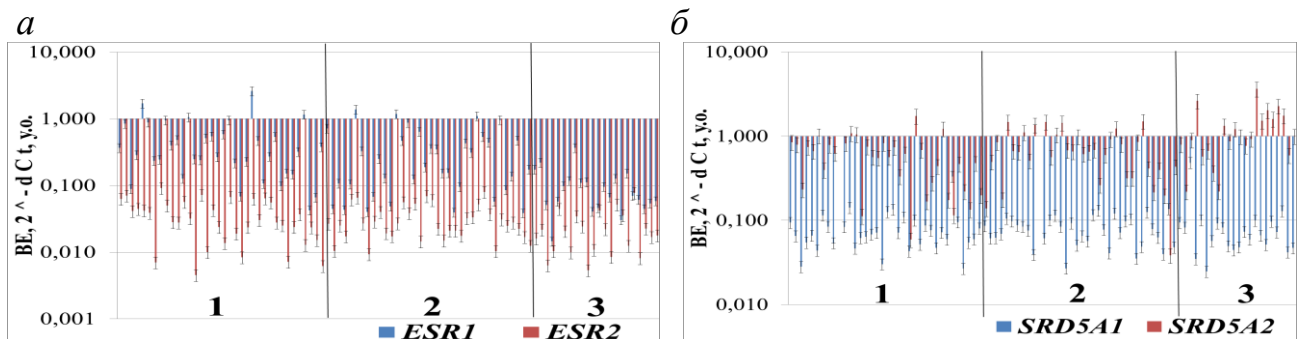


Рис. 10. Приклад патернів ВЕ генів а - *ESR1* та *ESR2*; б - *SRD5A1* та *SRD5A2* у зразках аденокарцином (1), УНТ (2) та аденом (3) ПЗ

ВЕ генів у парних зразках П/УНТ виявив ряд значущих відмінностей між групами. Проведення парного тесту Вілкоксона з $FDR=0,1$ для залежних вибірок показало наявність значущих відмінностей між ВЕ лише для генів *ESR1* та *INSRB* ($p=0,010$; $p=0,037$ відповідно з $FDR=0,1$). За результатами тесту Краскела-Уолліса статистично значущі відмінності між трьома групами П-УНТ-А ($p<0,05$) мають 6 транскриптів (5 генів). Це *ESR1*, *GCR ins AG* й *B*, *PRLR*, *VDR* та *SRD5A2*. Тоді як тест Дана-Бонферроні для множинних порівнянь показав відсутність значущих відмінностей між групами зразків для *GCR ins AG*.

Дослідження ВЕ генів у групах П та УНТ з урахуванням стадій – 7 генів/транскриптів, при групуванні за СГ – 4 гена/транскрипта мали відмінності між групами зразків ПЗ. Так, в усіх трьох типах угруповання зміни ВЕ спостерігаються лише у 3 генах (*ESR1*, *VDR* та *SRD5A2*). Інші гени зі змінами мають специфічні відмінності, які можуть пов'язані з особливостями їхньої ВЕ та, можливо, кореляціями з певними клініко-патологічними характеристиками.

Встановлення та аналіз рівнів відносної експресії генів, що беруть участь у ліпідному метаболізмі в пухлинах передміхурової залози. Відомо, що порушення та зміни в шляхах ліпідного метаболізму спричиняють метаболічне перепрограмування ракових клітин з набуттям більш агресивного фенотипу [Beloribi-Djefafia *et al.*, 2016, Cheng *et al.*, 2018]. Ми проаналізували рівні ВЕ 5

генів, що беруть участь у різних ланках ліпідного метаболізму (*FASN*, *CPT1C*, *LDLR*, *HMGCR*, *COX2*) та пов'язані з канцерогенезом у 37 аденокарциномах (П), 37 УНТ та 20 аденомах (А) ПЗ. Патерни їх ВЕ наведено на рис. 11. Два гени з досліджуваних, а саме - *FASN* і *COX2*, експресуються на високих рівнях, тоді як інші три, а саме - *LDLR*, *HMGCR*, *CPT1C*, показали помірний і низький рівні ВЕ. Найнижчі рівні ВЕ виявлено для гена *CPT1C* в усіх досліджуваних групах зразків. Аналіз рівнів ВЕ цих п'яти генів у 37 парних зразках П/УНТ не виявив значущих відмінностей ВЕ між групами для жодного гена, що ще раз свідчить про те, що УНТ не є адекватним контролем.

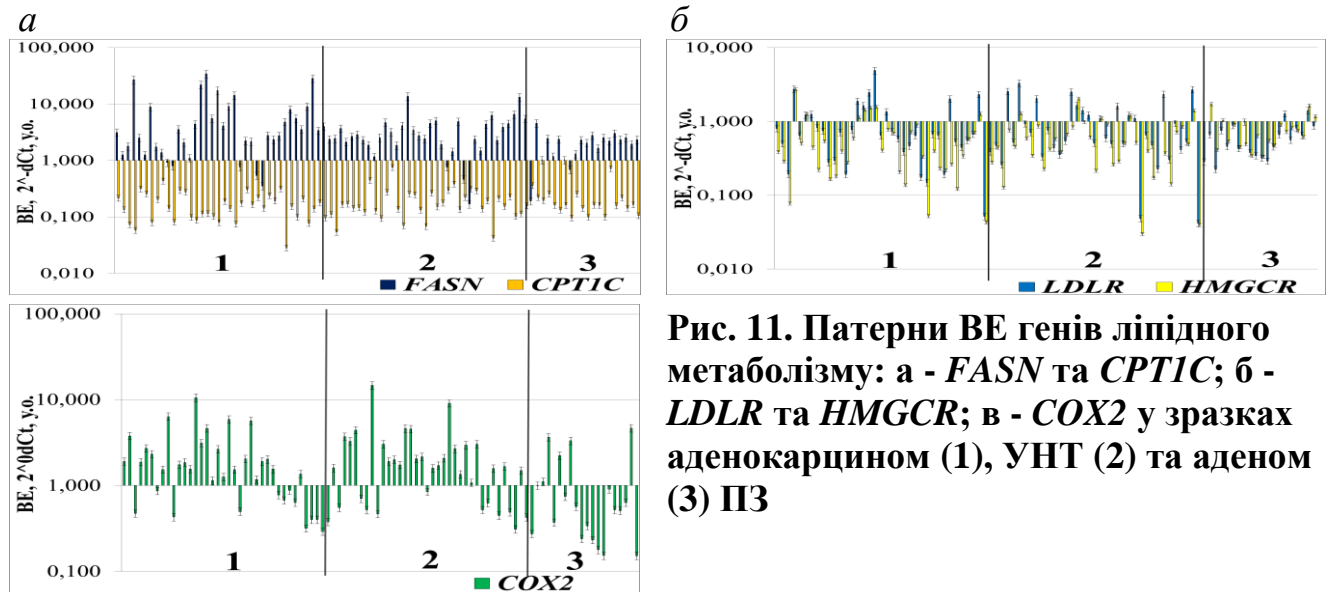


Рис. 11. Патерни ВЕ генів ліпідного метаболізму: а - *FASN* та *CPT1C*; б - *LDLR* та *HMGCR*; в - *COX2* у зразках аденокарцином (1), УНТ (2) та аденом (3) ПЗ

в

Аналіз ВЕ у трьох групах зразків (П-УНТ-А) за тестом Краскела-Уолліса показав значні відмінності ВЕ для 2 генів: *FASN* ($p=0,0253$) і *COX2* ($p=0,0079$). Наступний тест Дана-Бонферроні виявив пари групи зразків зі статистично значущими відмінностями ВЕ для двох генів. ВЕ *FASN* значно збільшилася в групі П, порівняно з групою А ($p=0,0311$). Тоді як ВЕ *COX2* була підвищеною як в групах А ($p=0,0191$), так і в УНТ ($p=0,0109$) у порівнянні з ВЕ у групі аденокарцином. Однак, при урахуванні стадій захворювання за тестом Краскела-Уолліса виявлено значні відмінності рівнів ВЕ для 4 з 5 генів. Тільки *CPT1C* не мав значущих відмінностей ВЕ між досліджуваними групами. Згідно результатів тесту Дана-Бонферроні рівні ВЕ *FASN* і *COX2* були збільшені в П 1-2 стадії, порівняно з групою А ($p=0,0372$, $p=0,0385$, відповідно). Крім того, *COX2* мав підвищений рівень ВЕ в групі УНТ 1-2 стадії порівняно з групою А ($p=0,0245$). Ген *HMGCR* навпаки, мав значно знижений рівень ВЕ у П 3-4 стадії порівняно з групою А ($p=0,0211$). Аналіз рівнів ВЕ з урахуванням СГ зразків за тестом Дана-Бонферроні для множинних порівнянь виявив наявність відмінностей ВЕ для двох генів. *FASN* має значне підвищення ВЕ у П з СГ = 7, порівняно з групою А ($p=0,0491$), а *COX2* показав 3-4-кратне збільшення рівнів ВЕ в групах П і УНТ з СГ = 7 порівняно з групою А ($p=0,0124$, $p=0,0462$, відповідно). Однак слід зазначити, що для більшості досліджуваних генів спостерігається високий рівень дисперсії ВЕ, особливо у групах аденокарцином. Таке явище ми вже фіксували

для інших генів, зокрема ЕМП та простато-специфічних генів, що може свідчити, як ми припускаємо, про наявність різних молекулярних підтипів, окрім визнаної гетерогенності зразків.

Встановлення та аналіз рівнів експресії маркерів стромального мікрооточення пухлин: пухлино-асоційованих фіброblastів, пухлино-асоційованих макрофагів й імунно-асоційованих генів у пухлинах ПЗ. З 23 досліджуваних генів вісім генів були маркерами фіброblastів та ПАФ, (ПАФ група). Шість генів пов'язані з прозапальними і імуносупресивними макрофагами (група ПАМ). Дев'ять генів пов'язані з імунними і захисними реакціями (група ІАГ). Патерни ВЕ низки з цих генів у пухлинах ПЗ наведено на рис. 12а-е.

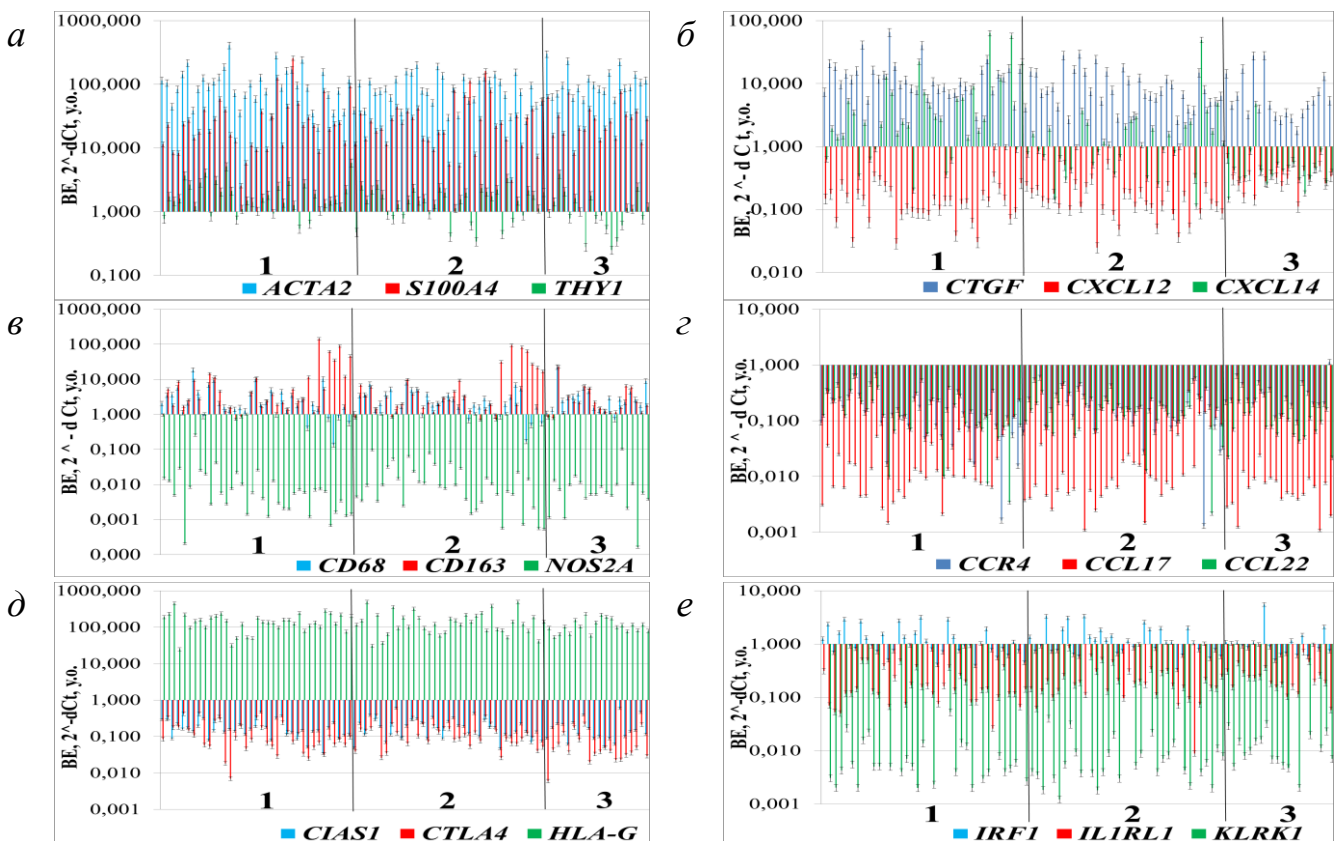


Рис. 12. Приклади патернів ВЕ генів ПАФ: (а) *ACTA2*, *S100A4*, (б) *THY1*, *CTGF*, *CXCL12*, *CXCL14*; ПАМ: (в) *CD68*, *CD163*, *NOS2A*, (г) *CCR4*, *CCL17*, *CCL22*; ІАГ: (д) *CIAS1*, *CTLA4*, *HLA-G*, (е) *IRF1*, *IL1RL1*, *KLRK1* у зразках аденокарцином (1), УНТ (2) та аденом (3) передміхурової залози

Аналіз змін ВЕ у групах П-УНТ-А за тестом Дана-Бонферроні для множинних порівнянь показав наявність значущих відмінностей для 9 генів. Так, для 6 генів спостерігається підвищення ВЕ у П порівняно з А: *CXCL14* ($p < 0,0001$), *CTGF* ($p = 0,001$), *FAP* ($p = 0,015$), *THY1* ($p = 0,011$), *CCL17* ($p = 0,015$), *CTLA4* ($p = 0,016$). Для 3-х генів виявлено значуще зниження ВЕ у П у порівнянні з А: *CXCL12* ($p < 0,0001$), *CCR4* ($p = 0,002$), *IL1RL1* ($p = 0,005$). Значущі різниці між групами УНТ та А виявлено для 4 генів (*CXCL12*, *CXCL14*, *CCR4*, *CTLA4*), причому характер змін ВЕ співпадає з групами аденокарцином. Як і в групах П, групи УНТ мають підвищену ВЕ генів *CXCL14* ($p < 0,0001$), *CTLA4* ($p = 0,003$) у

порівнянні з аденомами та знижені рівні ВЕ *CXCL12* ($p=0,003$), *CCR4* ($p=0,040$). Ці дані підтверджують наші припущення щодо пухлино-асоційованих змін в УНТ. Лише ген *CXCL14* має статистично значущі відмінності ВЕ між групами П та УНТ ($p=0,025$), де група П має більш ніж вдвічі підвищений рівень ВЕ у порівнянні з УНТ. Аналіз даних ВЕ генів у групах зразків з урахуванням стадій захворювання продемонстрував низку значущих відмінностей рівнів ВЕ. Серед 14 генів, для яких детектовано значні відмінності ВЕ за тестом Дана-Бонферроні, вісім генів показали найнижчі ВЕ у групі А, а саме *CTGF*, *CXCL14*, *FAP*, *THY1*, *CD163*, *CCL17*, *CCL22* і *CTLA4*. Підвищений ВЕ в П на стадії 1-2 ($p < 0,05$) спостерігався для *CTGF*, *FAP*, *THY1*, *CCL22*, *CTLA4*, тоді як підвищена ВЕ в П на стадії 3-4 ($p < 0,05$) була виявлена для *CD163* і *CCL17*. Чотири з цих генів крім відмінностей між групами аденокарцином і аденом мають значущу диференційну експресію між групами П 1-2 та 3-4 стадії за тестом Дана-Бонферроні: *HIF1A* ($p=0,008$), *CD68* ($p=0,041$), *CD163* ($p=0,016$), *CCL22* ($p=0,044$). Аналіз ВЕ генів з урахуванням СГ зразків пухлин показав наявність значущих відмінностей між групами для 10 генів з 23 за даними тесту Краскела-Уолліса та Дана-Бонферроні. Дев'ять з них (*CTGF*, *CXCL12*, *CXCL14*, *HIF1A*, *CCR4*, *CCL17*, *CCL22*, *CTLA4* та *IL1R1*) мають також статистично значущі зміни ВЕ у групах аденокарцином з різним ступенем захворювання. Тільки *IL2RA* має відмінності у групах аденокарцином з різним СГ.

Встановлення зв'язків між експресією пухлино-асоційованих генів на рівнях мРНК і білка та типами клітин, що їх експресують. Нами проаналізовано експресію генів *EFNA5*, *EPDR1*, *FOS*, *IL1B*, *PLAU*, *TAGLN* і *TGFBI* за даними кПЛР і ПХ та встановлено коефіцієнти рангової кореляції за Спірменом між ВЕ досліджуваних генів та маркерів специфічних для ЕМП, раку ПЗ, стромальних елементів.

Дослідження експресії на рівні білків генів *FOS*, *IL1B*, *PLAU*, *TAGLN* та *TGFBI* у пухлинах ПЗ показало (рис. 13а-в), що експресія білка FOS відрізняється у аденомах та пухлинах ПЗ: імуногістохімічний сигнал FOS більш інтенсивний у пухлинах 4 стадії, порівняно з аденомами ПЗ (рис. 13а). Звертає увагу збільшення коричневого сигналу (наявність досліджуваного білка імуногістохімічним методом) в епітелійних клітинах ПЗ (червоні стрілки).

Вивчення експресії білка IL1B показало, що сигнал локалізований, імовірно, в клітинах крові (не показано). Більша інфільтрація лімфоцитами виявлена в низько диференційованих аденокарциномах ПЗ, ніж в аденомах. В епітелійних клітинах передміхурової залози IL1B виявився ледь помітним. Вивчення експресії білка PLAU показало картину експресії, протилежну FOS. Слабкий сигнал PLAU у аденомах зник у високорозвинених карциномах (не показано). Привертає увагу зменшення коричневого сигналу (наявності білка PLAU) в епітелійних клітинах.

Дослідження експресії білка TAGLN показало (рис. 13б) його специфічну експресію у певних типах клітин. Так, білок TAGLN не детектується у клітинах ПЗ при аденомах (червоні стрілки, верхній рядок). Але він є високо експресованим у стромальних фібробластах в аденомах (чорні стрілки, верхній рядок). У зразках раку ПЗ клітини пухлин залишалися негативними за TAGLN.

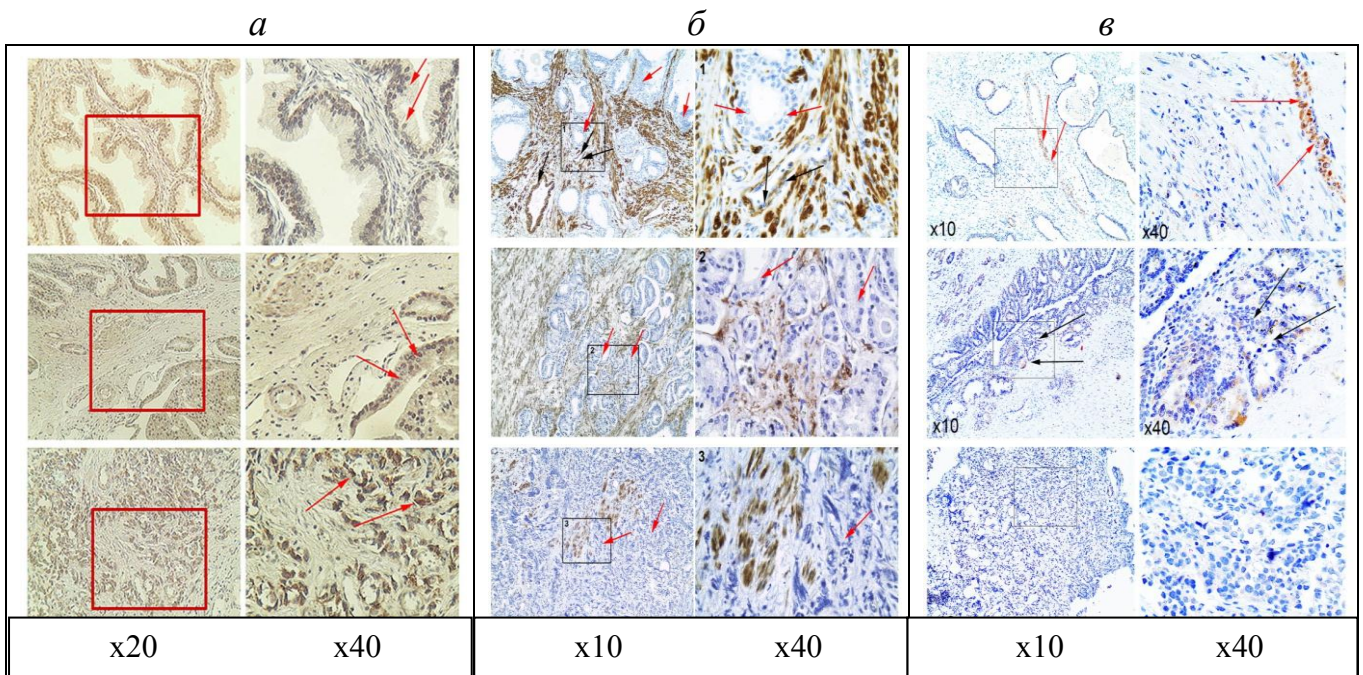


Рис. 13. Експресія генів на рівні білків у тканинах ПЗ: верхній рядок фото – аденоми, середній – аденокарциноми 1 стадія, нижній – аденокарциноми 4 стадія: а – FOS, б – TAGLN; в – TGFB1

Вивчення експресії білка TGFB1 у тканинах ПЗ (рис. 13в) показало досить сильний сигнал імуногістохімічного забарвлення у аденомах (червоні стрілки, верхній рядок). У ракових пухлинах 1 стадії кількість TGFB1 зменшувалась (чорні стрілки, середній рядок). У пухлинах 4-ї стадії білок TGFB1 майже не виявлявся. Звертає на себе увагу сильний коричневий сигнал (наявність білка TGFB1) в епітелійних клітинах ПЗ у аденомах (червоні стрілки).

У табл. 3 наведено порівняльний аналіз експресії досліджуваних генів як на рівні мРНК, так і на рівні білка. Співставлення результатів експресії різними методами дає можливість, по-перше, побачити наскільки експресія гена/білка може бути неоднорідною у тканині, що є одним з джерел високої дисперсії даних, по-друге, метод імуногістохімії дає змогу встановити у яких саме типах клітин відбувається експресія того чи іншого білка. Тому співставлення даних імуногістохімії та кореляції експресії між досліджуваними генами та маркерами інших клітин дає певну валідацію та біологічний сенс отриманим результатам. Так, згідно даних ІГХ білки генів *IL1B* та *TAGLN* експресуються у стромальних клітинах та клітинах крові. Значущі позитивні кореляції гена *IL1B* з маркерами ПАФ (*CTGF*, *HIF1A*) та Т-лімфоцитів (*IRF1*), а у *TAGLN* значущі позитивні кореляції з мезенхімними клітинами (*CDH2*, *FN1*) й ПАФ (*ACTA2*, *CTGF*) мають підтвердження даними ІГХ.

Хоча результати кПЛР та ІГХ співпадають не у всіх випадках, наприклад за результатами кПЛР *TGFB1* має високі рівні ВЕ в усіх групах пухлин, а ІГХ свідчить про зниження експресії білка від аденом до пухлин 1 стадії та відсутність експресії у пухлинах 4 стадії, слід зауважити, що результати мають досить високий рівень дисперсії від пухлини до пухлини. Тобто, щоб робити достовірні висновки, треба вивчати досить велику вибірку зразків. Тож, узгодження даних

Таблиця 3.

Узагальнюючі дані експресії генів на рівні мРНК та білка

Гени	мРНК (кПЛР)			Білок (ІГХ)		
	А	П, 1-2 стадія	П, 3-4 стадія	А	П, 1 стадія	П, 4 стадія
<i>TGFB1</i>	+++	+++ &	+++ &	+++e	++ e	-
<i>IL1B</i>	+	+ &	+ &	+ с	НД	+ с
<i>FOS</i>	+	+++ ↑	++ &	+ e	++ e	+++ e
<i>EFNA5</i>	+	+ ↓	+ ↓	НД	НД	НД
<i>TAGLN</i>	+	+ &	+ &	+++с	++ с	+ с
<i>PLAU</i>	++	+ ↓	+ ↓	+ e	+ e	- e
<i>EPDR1</i>	+	+ ↓	+ &	НД	НД	НД

Примітки: 1. «+++» - високий рівень експресії; 2. «++» - середній рівень експресії; 3. «+» - низький рівень експресії; 4. «-» - відсутність експресії; 5. «НД» - експресію білків ІГХ не досліджували; 6. & - високий рівень дисперсії даних експресії; 7. ↑ - підвищення рівнів ВЕ, у порівнянні з групою А; 8. ↓ - зниження рівнів ВЕ, у порівнянні з групою А; 9. e – експресію білка виявлено у ракових/епітелієвих клітинах; 10. с – експресію білка виявлено у стромальних клітинах/клітинах крові

експресії на різних рівнях (мРНК і білок) з використанням різних статистичних методів дозволяє зрозуміти і візуалізувати неоднозначні результати експресії досліджуваних генів у пухлинах.

Молекулярне профілювання пухлин передміхурової залози. Метод ПЛР у реальному часі дозволяє швидко і набагато дешевше вирішити завдання молекулярного профілювання пухлин. Це допомагає краще розуміти перебіг захворювання, уточнити прогноз та підібрати ефективне лікування. Нами встановлено рівні ВЕ 59 транскриптів, що відносяться до різних функціональних груп генів. До маркерів пухлин ПЗ та ЕМП відносяться гени, що асоційовані з раком ПЗ та мають важливі функції у чутливості до стероїдних та пептидних гормонів; гени ліпідного метаболізму. До маркерів строми пухлин ПЗ відносяться гени-маркери ПАФ, ПАМ та імунної системи. Після проведення статистичного аналізу ВЕ як парних П/УНТ зразків, так і груп (П, УНТ, А) виявлено статистично значущі різниці ВЕ для 35 генів з 59 між аденокарциномами (П) та аденомами (А), або УНТ. З них 14 генів мають достовірні відмінності ВЕ між П та парними УНТ. 33 гени мають відмінності ВЕ між групами П та А, та 8 генів мають відмінності ВЕ між групами П та УНТ. Встановлення коефіцієнтів рангової кореляції за Спірменом між експресією генів у аденокарциномах ПЗ та клініко-патологічними характеристиками (КПХ) показало наявність значущих кореляцій у 30 з 59 досліджених генів/транскриптів (табл 4). 15 з 30 генів, що мають кореляції, характеризують мікрооточення пухлин та стан імунної системи. Максимальну

кількість кореляцій (по 3 з СГ, стадією та рівнем ПСА) мають 2 гени: *SRD5A2* та *VDR*. Причому обидва гени мають негативні кореляції із КПХ, що свідчить про втрату експресії цих генів при прогресуванні пухлин ПЗ. Самі високі значення r^s ВЕ та стадій має ген *CD163* ($r^s= 0,615$). Вивчення рангових кореляцій за Спірменом між рівнями ВЕ всіх досліджуваних генів показало наявність великої кількості значущих як позитивних, так і негативних кореляцій, які за значеннями значно більші, ніж кореляції з КПХ. Ці дані свідчать про тісний взаємозв'язок та можливий взаємовплив досліджуваних генів у канцерогенезі ПЗ.

Таблиця 4.

Значущі кореляції за Спірменом (r^s) між ВЕ досліджуваних генів у аденокарциномах ПЗ та клініко-патологічними показниками

Ген	СГ	Стадія	ПСА (нг/мл)	Вік	Ген	СГ	Стадія	ПСА (нг/мл)	Вік
<i>AR (Iisof)</i>	0,109	-0,381	-0,147	-0,154	<i>THY1</i>	-0,056	0,012	0,225	0,328
<i>CDH1</i>	-0,132	-0,385	-0,233	-0,001	<i>CXCL14</i>	0,360	0,181	0,479	0,148
<i>NKX3-1</i>	-0,024	-0,353	-0,263	0,085	<i>HIF1A</i>	-0,403	-0,538	-0,233	0,204
<i>XIAP</i>	0,003	-0,352	-0,046	0,154	<i>S100A4</i>	0,353	0,336	0,141	0,027
<i>ESR2</i>	-0,354	0,142	-0,271	-0,011	<i>CTLA4</i>	-0,382	-0,148	-0,117	0,172
<i>INSRA</i>	-0,157	-0,478	-0,178	-0,058	<i>IRF1</i>	-0,316	-0,303	-0,417	0,151
<i>IGF1R</i>	-0,146	-0,441	-0,319	-0,004	<i>IL1RL1</i>	-0,057	0,033	-0,410	0,020
<i>MSMB</i>	-0,437	-0,114	-0,315	-0,180	<i>IL1R1</i>	-0,272	-0,406	-0,321	-0,084
<i>PRLR</i>	-0,009	-0,326	-0,254	-0,056	<i>IL2RA</i>	-0,449	-0,155	-0,166	0,023
<i>PRL</i>	0,007	0,437	-0,168	-0,052	<i>CD68</i>	-0,217	-0,369	-0,097	0,136
<i>SRD5A2</i>	-0,520	-0,395	-0,461	0,032	<i>CD163</i>	0,224	0,615	0,230	0,193
<i>VDR</i>	-0,382	-0,444	-0,409	0,261	<i>CCR4</i>	-0,492	-0,436	-0,214	0,193
<i>COX2</i>	-0,340	-0,188	-0,296	0,178	<i>CCL17</i>	0,437	0,435	0,324	0,092
<i>LDLR</i>	-0,237	-0,541	-0,255	0,084	<i>CCL22</i>	-0,304	-0,398	-0,174	0,004
<i>HMGCR</i>	-0,111	-0,420	-0,243	0,151	<i>NOS2A</i>	-0,352	-0,407	-0,169	0,034

Примітки: 1. $p < 0,05$ – курсив; 2. $p < 0,01$ – жирний шрифт; 3. СГ – сума за шкалою Глісона

Деякі гени, що не мають значущих кореляцій з КПХ або не мають важливого значення в канцерогенезі ПЗ, або їхні аберації відбуваються на ранніх етапах ракової трансформації клітин та визначають певний молекулярний тип пухлини, як, наприклад, наявність ГТ *TMPRSS2-ERG*, втрата експресії *PTEN* або *NKX3-1* [Cancer Genome Atlas Research Network, 2015].

Ми перевірили це припущення стосовно наявності або відсутності ГТ *TMPRSS2-ERG* та рівнів експресії *PTEN* як молекулярних характеристик і виявили певні особливості експресії генів у пухлинах ПЗ у порівнянні з аденомами та УНТ. Але жодних відмінностей між аденокарциномами з різними молекулярними показниками виявлено не було. Тобто, цих окремих характеристик недостатньо для повноцінного молекулярного профілювання та розділення на клінічно-значущі молекулярні підтипи. Для цього ми використали статистичний підхід – метод кластеризації за К-центрами з різними наборами профілів експресії генів у групах аденокарцином передміхурової залози (рис. 14а-г).

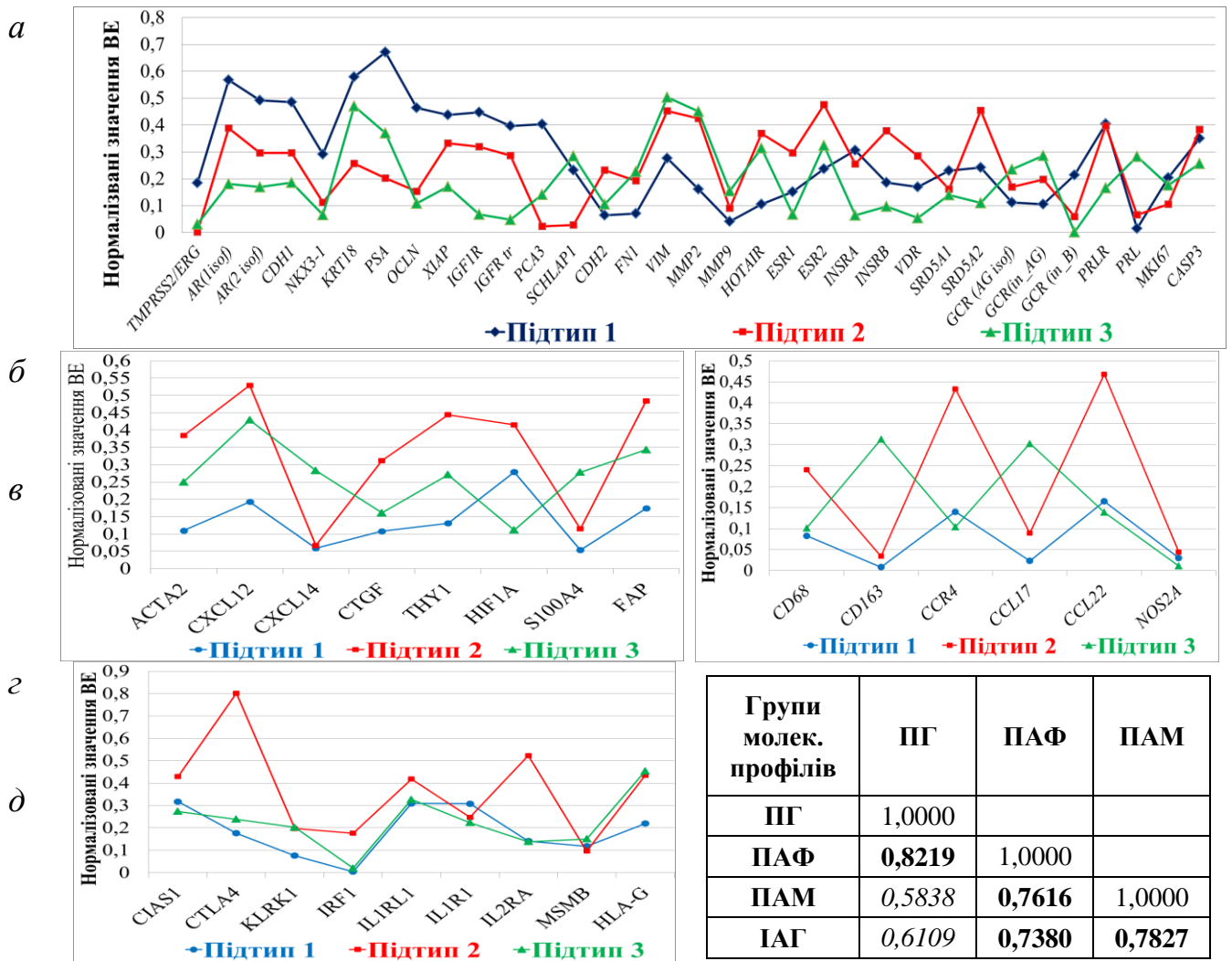


Рис. 14. Профілі нормалізованої експресії генів у трьох кластерах (підтипах) аденокарцином ПЗ за даними кластеризації за методом К-центрів: а – гени групи ПГ (ЕМП та асоційовані з раком ПЗ); б – гени групи ПАФ; в – гени групи ПАМ; г – гени групи ІАГ; д – Коефіцієнти рангової кореляції за Спірменом між різними групами молекулярних профілів: $p < 0,001$ - курсив; $p < 0,0001$ – жирний шрифт

Спочатку ми взяли для кластеризації профілі експресії лише ЕМП-асоційованих генів (19 генів) та отримали 2 окремих кластери/підтипи аденокарцином, які ми охарактеризували як люмінальний та стовбуровоподібний підтип. Але ці підтипи не мали значущої різниці ні у показниках стадій, ні СГ пухлин ПЗ. Тоді до цих генів ми додали ще профілі експресії генів, асоційованих з раком ПЗ. За результатом кластеризації 33 транскриптів та показників стадій пухлин отримано 3 підтипи/кластери аденокарцином зі значущою різницею за показником стадій пухлин та наявності ГТ *TMPRSS2-ERG* (рис. 14а). ВЕ 21 транскрипта та показник стадій мають значущі відмінності між підтипами аденокарцином за результатами теста Дана-Бонферроні для множинних порівнянь. Характерні ознаки кластера/підтипу 1 є експресія у всіх 12 зразках аденокарцином переважно 1-2 стадії ГТ *TMPRSS2-ERG*, значуще підвищення ВЕ *AR*, епітелійних маркерів (*CDH1*, *NKX3-1*, *OCLN*) та маркерів раку ПЗ (*PSA*, *PCA3*,

KRT18, *SCHLAP1*). Широко відомо, що підвищення експресії епітелійних та люмінальних маркерів зазвичай спостерігається на фоні низької експресії мезенхімних маркерів, що і відмічено для цього підтипу. Особливою рисою цього підтипу є активація онкогенних шляхів *PCA3* та *ERG* без інгібування експресії гена супресора росту пухлин *NKX3-1*. Отже, кластер 1 можна охарактеризувати як ГТ-позитивні андроген-чутливі аденокарциноми люмінального підтипу 1, які мають крім високої чутливості до андрогенів, чутливість до пролактину, інсулінового фактору росту 1, інсуліну, що стимулюють онкогенні сигнали [Heidegger *et al.*, 2014], та активовані онкогенні шляхи *ERG* та *PCA3* [Teixeira *et al.*, 2017, Feng *et al.*, 2014].

Тринадцять зразків аденокарцином переважно ранніх стадій, як і підтип 1, що входять до підтипу 2, мають такі особливості: найнижчу експресію низки епітелійних та люмінальних маркерів: *KRT18*, *PCA3*, *PSA*, тоді як мезенхімні маркери *CDH2*, *MMP2*, *FN1*, *VIM* є високо-експресованими. Описані характеристики притаманні стовбуровоподібному (базальному) підтипу раку ПЗ [Shtivelman *et al.*, 2014]. Крім того, високі рівні ВЕ *ESR1*, *SRD5A2*, *INSRB*, *PRLR* і днсРНК *HOTAIR* надають цьому кластеру посилені карциногенні властивості [Jia *et al.*, 2015, Austin *et al.*, 2016, Zhang *et al.*, 2015].

Кластер/підтип 3 аденокарцином містить 8 пухлин з найвищим СГ та стадіями. Тобто, у його склад входять найбільш агресивні пухлини ПЗ. Відмічено, що зразки аденокарцином мають найнижчу експресію *AR*, що є ознакою андроген-резистентних пухлин, як і низька ВЕ епітелійних маркерів (*CDH1*, *OCLN*, *NKX3-1*), ферментів стероїдогенезу (*SRD5A2*), та рецепторів інсуліну та інсулінового фактору росту (*INSRA*, *INSRB*, *IGF1R*). Також про агресивний характер пухлин у цій групі свідчить підвищена ВЕ *PRL*, довгих некодувальних РНК *SCHLAP1* та *HOTAIR*, а також підвищення експресії мезенхімних маркерів *VIM*, *FN1*, *MMP2*. За цими молекулярними ознаками ми вважаємо, що кластер 3 є іншим підтипом люмінального раку ПЗ, який є переважно ГТ-негативний з андроген-незалежними та кастрат-резистентними характеристиками. Висока експресія *HOTAIR* свідчить про ймовірну резистентність до Ензалутаміду [Zhang *et al.*, 2015] та можливу стимуляцію процесів канцерогенезу через *PRL/STAT5* сигнальний шлях завдяки ендогенній експресії *PRL* цими пухлинами, що посилює андрогенну резистентність [Sackmann-Sala *et al.*, 2015].

Наступні кластеризації ми проводили для груп генів стромального мікрооточення. Так, проведення кластерного аналізу за методом К-центрів для 8 генів групи ПАФ та урахуванням стадій захворювання виявило також 3 кластери зразків аденокарцином ПЗ з значущими відмінами між профілями ВЕ досліджуваних генів (рис. 14б). Кластеризовано 100% зразків аденокарцином. За даними тесту Дана-Бонферроні для множинних порівнянь виявлено значущі відмінності ВЕ для 7 з 8 генів ПАФ між різними кластерами. Крім того ці профілі ВЕ пов'язані з КПХ – стадією захворювання. Так, у 1 та 2 кластерах знаходяться зразки переважно 1-2 стадії, тоді як у 3 кластері – більш агресивні пухлини 3-4 стадії. Статистично значущі різниці між кластерами з $p=0,0002$ для обох відмінностей стадій між 1 й 3 та 2 й 3 кластерами. Кластер 1 та 2 являють собою 2

різних молекулярних підтипи ВЕ генів ПАФ пухлин ПЗ з приблизно однаковою стадією захворювання зі значущими відмінностями ВЕ між п'ятьма генами групи ПАФ: *ACTA2* ($p < 0,0001$), *CXCL12* ($p = 0,0007$), *CTGF* ($p = 0,0096$), *THY1* ($p < 0,0001$), *FAP* ($p = 0,0010$). Причому кластер 1, як і для попереднього типу кластеризації за пухлино-асоційованими генами має менш агресивні молекулярні характеристики, ніж кластер 2, де знаходяться приблизно такі ж пухлини за стадією захворювання (1-2 стадія). Кластер 3 має найбільш агресивні пухлини згідно стадії захворювання та відмінні від попередніх кластерів ВЕ двох генів *HIF1A* та *S100A4*, які мають значущі різниці ВЕ у порівнянні з кластерами 1 та 2. Ген *HIF1A* має мінімальне значення ВЕ ($p = 0,0335$; $p = 0,0011$ відповідно), а *S100A4* ($p = 0,0333$; $p = 0,0145$ відповідно) – максимальне у кластері 3. Така ж тенденція змін ВЕ у кластерах, як має *S100A4*, спостерігається й для значень ВЕ *CXCL14*, але статистичних відмінностей за даними тесту Дана-Бонферроні не детектовано. Тобто гени *HIF1A*, *S100A4* (і потенційно *CXCL14*) можна вважати ПАФ маркерами прогресії раку ПЗ.

Наступна група генів маркерів стромальних елементів, для якої було проведено кластеризацію ВЕ у аденокарциномах, це макрофаги та ПАМ. За результатом кластерного аналізу за методом К-центрів для 6 генів групи ПАМ та урахуванням стадій захворювання виявлено 3 кластери зразків аденокарцином ПЗ з різними профілями ВЕ досліджуваних генів (рис. 14в). Кластеризовано 100% зразків аденокарцином. За тестом Дана-Бонферроні для множинних порівнянь виявлено статистично значущі відмінності ВЕ для усіх 6 генів між різними кластерами без винятків, як і значущі різниці показників стадій між кластерами. Як і гени ПАФ групи, ПАМ гени можна умовно розділити на 2 типи: гени, що характеризують, як ми вважаємо, різні підтипи макрофагів у одній стадії захворювання, тобто мають значущо різні профілі ВЕ у кластерах 1 та 2 – до яких входять аденокарциноми 1-2 стадії: *CD68*, *CCR4*, *CCL22*. Інша група генів може характеризувати відмінності між аденокарциномами з різними стадіями захворювання, тобто у кластерах, що мають аденокарциноми 1-2 стадії ВЕ генів та не відрізняється, але вони відмінні від кластеру аденокарцином з 3-4 стадією (підтип/кластер 3): *CD163*, *CCL17*, *NOS2A*.

Наступна група генів маркерів, для якої було проведено кластеризацію ВЕ у аденокарциномах, це ІАГ, до якої входило 9 генів (рис. 14г). За результатом кластерного аналізу за методом К-центрів для 9 генів ІАГ та урахуванням стадій захворювання виявлено також 3 кластери зразків аденокарцином ПЗ з різними профілями ВЕ досліджуваних генів. Кластеризовано, як і для попередніх груп генів стромальних маркерів, 100% зразків аденокарцином. Згідно тесту Дана-Бонферроні для множинних порівнянь виявлено значущі відмінності ВЕ між кластерами лише для 4 генів: *CTLA4*, *IRF1*, *IL2RA*, *HLA-G*. Крім того два кластери 1 та 2, як і в попередніх типах кластеризацій, включають переважно аденокарциноми 1-2 стадії, тоді як кластер 3 має у складі аденокарциноми 3-4 стадії. Ця різниця між кластерами є статистично значущою ($p < 0,05$). Між 4 генів, що мають значущі відмінності ВЕ між кластерами три з них (*CTLA4*, *IL2RA* та

HLA-G) дають можливість розрізнити між собою два кластери 1 та 2, які мають аденокарциноми більш ранніх стадій.

Завдяки методу кластеризації ми отримали специфічні молекулярні кластери/підтипи аденокарцином за профілями ВЕ генів, що характеризують стан клітин пухлин: гени ЕМП та гени, асоційовані з раком ПЗ та наявністю гібридного транскрипта *TMPRSS2-ERG* (ПГ). Групи кластерів аденокарцином за профілями ВЕ генів, що характеризують стан строми пухлин: ПАФ, ПАМ, ІАГ. Найціннішим з наукової та клінічної точки зору є виявлення кореляцій між різними групами кластеризацій. Ми встановили коефіцієнти рангової кореляції за Спірменом (r^s) між цими групами описаних вище кластеризацій рис. 14д. Найвище значення коефіцієнту кореляції між групами кластерів мають кластеризація за станом клітин пухлин (ПГ) та ПАФ ($r^s=0,8219$ з $p<0,00001$). Хоча групи кластерів ПАМ та ІАГ теж мають досить високі кореляції з групою кластерів ПГ ($r^s=0,5838$, $p<0,001$; $r^s=0,6109$, $p<0,001$). Отже, ці результати свідчать про тісний взаємозв'язок між кластерами молекулярних характеристик клітин пухлин та стромальних елементів, особливо фібробластів та ПАФ, що описує клінічно-значущі зміни та характеристики пухлин ПЗ.

Розробка панелей потенційних ДНК біомаркерів на основі генетичних та/або епігенетичних порушень для діагностики епітелійних новоутворень на основі результатів *NotI* –мікропанелей. За результатами *NotI*-мікропанелей нами виявлено гени з генетичними та/або епігенетичними змінами у доброякісних та злоякісних пухлинах яєчника та передміхурової залози різних стадій захворювання. Розрахунки панелей проведені на основі даних тесту Фішера та критерію χ -квадрат з використанням методу опорних векторів (метод класифікатора з максимальним зазором) [Cruz *et al.*, 2007, Cruz *et al.*, 2014, Huang *et al.*, 2018], як одного з методів машинного навчання.

Ці розрахунки дозволили виявити набори генів як для раннього виявлення пухлин яєчника, так і для розрізнення між доброякісними та злоякісними пухлинами й злоякісними пухлинами 1-2 стадії та 3-4 стадії. Set з 10 маркерів (*NKIRAS1/RPL15*, *THRB*, *RBPS3 (CTDSPL)*, *IQSEC1*, *NBEAL2*, *ZIC4*, *LOC285205*, *FOXP1*, *CGGBP1*, *EPHB1*) дозволить виявляти більшість випадків епітелійних пухлин яєчника з чутливістю та специфічністю вище, ніж 71% і до 94%.

Для виявлення раку в зразках біопсії яєчника на всіх етапах, включаючи ранню діагностику є найбільш перспективним набором з аналізованих генів. В цей набір включено 8 біомаркерів: *NKIRAS1/RPL15*, *THRB*, *RBPS3 (CTDSPL)*, *IQSEC1*, *NBEAL2*, *ZIC4*, *LOC285205* та *FOXP1*. Зразок визнається раком яєчника, якщо виявлено метилування та/або делеція у двох або більше з цих біомаркерів. Чутливість цього набору дорівнює (72 ± 11)% і специфічність (94 ± 5)%. Ранні стадії представляли найскладніші випадки виявлення. Зразки доброякісних пухлин не мали змін у п'яти випадках з семи проаналізованих, тому для того, щоб відрізнити їх від зразків раку, можна використовувати той же набір, що і для виявлення раку. Якщо метилування та/або делеція знайдено у двох або більше з вищезазначених біомаркерів, то зразок буде визнаний раком. Чутливість цього набору дорівнює (72 ± 11)% і специфічність (71 ± 17)%. Для розмежування стадій

1-2 і стадій 3-4 раку яєчника найбільш перспективними показали себе біомаркери *LOC285205*, *CGGBP1*, *EPHB1* та *NKIRAS1/RPL15*. Якщо виявлено метилювання та/або делецію в 1 або більше з цих біомаркерів, то зразок буде визнаний як пухлина з 3-4 стадією. При цьому чутливість набору дорівнює $(80 \pm 13)\%$, а специфічність $(88 \pm 12)\%$.

Використовуючи наші дані з NotI-мікропанелей, ми сконструювали моделі прогнозування для виявлення раку передміхурової залози та дискримінації між агресивними та неагресивними підтипами. Ми отримали набір з 16 маркерів. Так, для виявлення пухлин передміхурової залози можна запропонувати набір з шести маркерів: *BHLHE40*, *FOXP1*, *LOC285205*, *ITGA9*, *CTDSPL (RBSP3)* і *FGF12*. Аналіз вважається позитивним, тобто пухлину або аденому діагностовано при виявленні в двох або більше делецій та/або метилювання у маркерних генах. За цієї умови, як чутливість, так і специфічність цього набору були 94% для розглянутої вибірки. Коефіцієнт Джині був у діапазоні 0,92–0,99. Однак ці значення потребують подальшого уточнення, використовуючи додаткові вибірки.

Наступний набір з п'яти маркерів: *FAM19A4*, *CAND2*, *MAP4*, *KY*, *LRRC58* дозволяє розрізнити зразки аденоми від неагресивних пухлин ПЗ. У цьому аналізі зразок визнається раковим, якщо метилювання та/або делеція були виявлені не менше ніж у двох з цих маркерів. Цей набір має чутливість 93% та специфічність 73%. Коефіцієнт Джині знаходився в діапазоні 0,61–0,87.

Останній набір складається також з п'яти маркерів: *LOC440944/SETD5*, *VHL*, *CLCN2*, *OSBL10/ZNF860*, *LMCD1*, які дозволять розрізнити між собою агресивні раки від неагресивних та аденом. Зразок буде визнаний агресивним раком, якщо метилювання та/або делеції виявлено у трьох або більше з цих маркерів (100% чутливість і 97% специфічності). Коефіцієнт Джині знаходився в діапазоні 0,93–1,00. Цей набір має найвищі статистичні параметри, тому є найбільш значущим.

Встановлення діапазонів потенційної фармакологічної чутливості за показниками BE генів фармакологічних маркерів. З досліджених нами генів деякі є потенційними фармакологічними біомаркерами завдяки їхнім функціям у канцерогенезі та використанню препаратів інгібіторів білків, що кодується цими генами для лікування раку та інших захворювань людини: *AR*, *PTEN*, *COX2*, *FASN*, *HMGCR*, *LDLR*, *CTLA4*. *PTEN* сам є інгібітором PI3K/АКТ/mTOR сигнального шляху, тому для нього показники чутливості будуть мати зворотну залежність від рівнів його експресії [Matsumoto *et al.*, 2016]. Аналіз рівнів BE в групах П і А показав три типи змін: (1) значуще знижені рівні експресії у П - *AR* і *isof*, *PTEN*; (2) значуще збільшені рівні експресії у П в порівнянні з А - *COX2*, *FASN*, *CTLA4*; (3) ніяких значущих змін BE не виявлено - *HMGCR*, *LDLR*. Слід зазначити, що всі гени проявляли дуже високу варіабельність значень експресії в окремих пухлинах.

Ми розділили потенційну ефективність (або чутливість) до протиракової терапії на діапазони згідно рівням BE генів як високу, середню, нижче середнього, низьку. Рівні BE в групі аденом використовували як контроль, оскільки жодних відмінностей BE з УНТ для цих генів не виявлено. Тому перший пороговий рівень був значенням медіани групи А для генів із змінами BE типу (1).

Цей рівень розділяє високий і середній діапазони ефективності. Наступний пороговий рівень був 25-й персентиль групи А. Він розділяв ефективність на середній та нижче середнього діапазони. Ці значення близькі до медіани групи П. Останній пороговий рівень був 25-м персентилем групи П: він розділяє діапазони чутливості на нижче середнього та низький. Для другого типу змін ВЕ ми пропонуємо додатковий діапазон - дуже високий рівень чутливості/ефективності. Його пороговим рівнем є медіана групи аденокарцином. Третій тип змін ВЕ дозволяє нам виявляти ефективність аналогічно першому типу, за винятком необхідності додаткового дуже високого рівня при умові, якщо ВЕ 75-го персентиля П є вищою, ніж у групі аденом.

Результати виявлення та розділу на діапазони потенційної фармакологічної чутливості для семи генів-маркерів згідно описаних порогових рівнів для 37 аденокарцином наведено на рис. 15.

Отримані результати є, по суті, нашими припущеннями на основі аналізу рівнів ВЕ та характеристик змін ВЕ у групах пухлин ПЗ. Для встановлення реальної чутливості та ефективності протиракової терапії необхідно провести клінічні дослідження. З іншого боку, ці результати свідчать про наявність зразків



Рис. 15. Діапазони потенційної фармакологічної чутливості семи генів-маркерів

Примітки: 1. Зверху – дуже високий/ високий; 2. знизу – низький рівень фармакологічної чутливості пухлин

з різною потенційною чутливістю до протиракової терапії. Наприклад, різниця між мінімальним та максимальними значеннями ВЕ для *HMGCR*, *FASN*, *LDLR*, *CTLA4* перевищує 100 разів.

Створення панелей експресійних РНК біомаркерів на основі даних експресії генів у зразках раку передміхурової залози. Методи машинного навчання, що описуються байесівським статистичним підходом, широко використовуються для моделювання та оцінки генетичної, епігенетичної, фармакогеномної взаємодії при багатфакторних захворюваннях та оцінки біомаркерів різних типів. Серед них є PanelomiX, ROC та MDR аналіз. Але використання цих підходів потребує їх адаптації до потреб розробки експресійних панелей біомаркерів у зв'язку з особливостями характеру даних відносної експресії та їх інтерпретації. Отже, першим нашим завданням розробки експресійних панелей є пристосування даних відносної експресії під особливості аналізу MDR (Multifactor dimensionality reduction). Реалізація цього завдання включала наступні кроки: обрання групи потенційних генів-прогностичних

факторів, які мають значущі відмінності між досліджуваними групами, виявлення наявності можливих класифікаторів за результатами ВЕ генів, визначення порогового значення рівнів ВЕ для розподілу зразків на групи, для переведення неперервних даних ВЕ у бінарні значення. За результатами методів класифікації за рівнями ВЕ досліджуваних генів для ідентифікації групових предикторів виявлено гени з високим значенням прогнозування для стратифікації П/А груп: *HOTAIR*, *KRT18*, *PCA3*, *AR*, *PTEN*, *MMP9*, *SRD5A2*, *PRLR*, *ESR1*, *CXCL12*, *CXCL14*, *THY1*, *CCR4*, *CCL22*, *CCL17*, *CD68*, *IL1R1*, *CTLA4*, *MSMB*. Всі ці гени мають значущі зміни ВЕ між аденокарциномами і аденомами ПЗ за результатами наших досліджень. Виявлено 30 генів (31 транскрипт) зі значущими відмінностями ВЕ між А і П для розробки експресійних панелей. Крім того, ми врахували відмінності ВЕ у групі аденокарцином з різними стадіями та СГ.

Наступним завданням після відбору генів для розробки експресійних панелей є визначення порогового рівня ВЕ, який розділяє зразки з незмінною ВЕ і є індивідуальним для кожного гена. Виходячи з наших попередніх досліджень, ми виявили, що відмінності ВЕ у 2 рази (підвищення або зниження) є значущими рівнями для ідентифікації групових відмінностей (табл. 5). Ми вибрали його як

Таблиця 5.

Зміни ВЕ генів для визначення порогового рівня експресії для групи аденокарцином передміхурової залози у порівнянні з групою аденом для MDR-аналізу

Група генів	Гени	Зміни ВЕ	Група генів	Гени	Зміни ВЕ
ЕМП	<i>CDH2</i>	>2 рази	ПАФ	<i>CTGF</i>	>2 рази
	<i>FN1</i>	>2 рази		<i>CXCL12</i>	<2 рази
	<i>KRT18</i>	>2 рази		<i>CXCL14</i>	>2 рази
	<i>MMP9</i>	>2 рази		<i>HIF1A</i>	<2 рази
	<i>PTEN</i>	<2 рази		<i>FAP</i>	>2 рази
	<i>VIM</i>	>2 рази		<i>S100A4</i>	>2 рази
	<i>PCA3</i>	>2 рази		<i>THY1</i>	>2 рази
	<i>HOTAIR</i>	>2 рази		<i>CD68</i>	<2 рази
Гени, асоційовані з раком ПЗ	<i>SCHLAP1</i>	>2 рази	ПАМ	<i>CD163</i>	>2 рази
	<i>ESR1</i>	>2 рази		<i>CCL17</i>	>2 рази
	<i>GCR ins AG</i>	>2 рази		<i>CCR4</i>	<2 рази
	<i>GCR ins B</i>	>2 рази	ІАГ	<i>CTLA4</i>	>2 рази
	<i>PRLR</i>	<2 рази		<i>HLA-G</i>	>2 рази
	<i>PRL</i>	>2 рази		<i>IL1R1</i>	<2 рази
	<i>VDR</i>	>2 рази		<i>MSMB</i>	<2 рази
<i>SRD5A2</i>	<2 рази				

порогове значення рівня ВЕ від медіани групи аденом, яку ми беремо як контрольну групу для переведення неперервних значень ВЕ у бінарні. З 31-го транскрипта зі значущими різницями рівнів ВЕ між аденокарциномами передміхурової залози в порівнянні з групою аденом, 22 гени / транскрипти мають

підвищені BE в групі П у порівнянні з А, і 9 - знижені рівні BE в П серед 5 груп досліджуваних генів. Використовуючи ці дані BE генів, ми підготували їх для MDR аналізу шляхом переведення у бінарні значення. Незмінні рівні BE означили "0", змінні (вгору або вниз) рівні BE – означили як "1". Зразки ПЗ мають 2 класи: П і А. Для аналізу використали наступні параметри програми MDR: Аналіз невизначених даних - точний тест Фішера ($p < 0,05$), діапазон кількості атрибутів - всі гени досліджуваної групи, невідома група - клас 1 (П), Метод пошуку конфігурації - вичерпний і випадковий, Коефіцієнт перехресної перевірки - 10, Вибір фільтра – χ -квадрат.

Для MDR-аналізу ми спочатку використали окремі групи генів (ЕМП й пухлино-асоційовані, окремі групи стромальних маркерів) й отримали набори експресійних маркерів з достатньо високими статистичними показниками, але самі високі показники отримано при використанні для аналізу усіх груп генів, до яких входять усі гени з високими прогностичними рівнями для дискримінації зразків пухлин. Комбінаторний аналіз 31 транскрипту виявив набір з 6-и генів *CDH2*, *KRT18*, *PCA3*, *HOTAIR*, *ESR1*, *IL1R1*, який має найвищі статистичні параметри і складається з генів з різних досліджуваних груп. Аналогічний MDR аналіз 31 транскрипта ми провели для 37 аденокарцином з різними стадіями (П 1-2 стадія і П 3-4 стадія) і СГ (П СГ \leq 7 і П СГ $>$ 7) для стратифікації цих груп.

Узагальнюючи наші експериментальні дані, ми можемо запропонувати набір з 12 генів (табл. 6): *CDH2*, *CXCL12*, *CCL17*, *ESR1*, *FNI*, *IL1R1*, *HIF1A*, *HOTAIR*, *KRT18*, *PCA3*, *S100A4*, *VDR* для стратифікації аденокарцином від аденом і розрізнення аденокарцином за їх стадією (1-2 і 3-4 стадії) і СГ (СГ \leq 7 і СГ $>$ 7).

Таблиця 6.

Набір з 12 експресійних біомаркерів для виявлення аденокарцином та розпізнавання П/А і П з різними стадіями і СГ пухлин ПЗ

Застосування	Набір маркерів	Статистичні параметри набору
Виявлення та розпізнавання П/А	<i>CDH2</i> , <i>KRT18</i> , <i>PCA3</i> , <i>HOTAIR</i> , <i>ESR1</i> , <i>IL1R1</i>	Accuracy: 0,9298 Sensitivity: 1,0 Specificity: 0,8 Odds Ratio: >200 χ^2 : 41,1512 ($p < 0,0001$)
Розпізнавання П 1-2 стадія та П 3-4 стадія	<i>CDH2</i> , <i>CXCL12</i> , <i>HIF1A</i> , <i>S100A4</i>	Accuracy: 0,9189 Sensitivity: 1,0 Specificity: 0,8929 Odds Ratio: >200 χ^2 : 24,7768 ($p < 0,0001$)
Розпізнавання П СГ \leq 7 та П СГ $>$ 7	<i>FNI</i> , <i>VDR</i> , <i>CCL17</i> , <i>IL1R1</i>	Accuracy: 0,8108 Sensitivity: 1,0 Specificity: 0,65 Odds Ratio: >200 χ^2 : 17,0354 ($p < 0,0001$)

Отримані нами результати з молекулярного профілювання на основі даних ВЕ генів дають можливість додати перелік генів до запропонованої панелі з 12 експресійних біомаркерів, або зробити додаткову панель для профілювання та встановлення чутливості до деяких препаратів (гени з переліку потенційних фармакологічних маркерів). Тоді діагностично-профілююча панель для раку передміхурової залози буде мати наступний вигляд:

1 частина панелі – Виявлення та розрізнення пухлин ПЗ (12 біомаркерів): *CDH2, KRT18, PCA3, HOTAIR, ESRI, IL1R1, CXCL12, HIF1A, S100A4, FN1, VDR, CCL17*.

2 частина панелі - Молекулярне профілювання раку ПЗ:

а) Розрізнення підтипів раку ПЗ за характеристиками 19 маркерів пухлинних клітин: *AR 1isof, TMPRSS2-ERG, CDH1, CDH2, NKX3-1, KRT18, PSA, OCLN, PCA3, MMP2, SCHLAP1, ESRI, INSRA, INSRB, IGF1R, PRLR, PRL, VDR, SRD5A2*

б) Розрізнення підтипів раку ПЗ за характеристиками стромального мікрооточення пухлин: 1) ПАФ підтипи (8 генів): *ACTA2, CXCL12, CXCL14, CTGF, THY1, HIF1A, S100A4, FAP*; 2) загально стромальне типування (13 генів): *CXCL12, HIF1A, FAP, CD68, CD163, CCR4, CCL17, CCL22, NOS2A, CIAS, CTLA4, IL2RA, HLA-G*.

в) потенційні фармакологічні маркери (7 маркерів): *PTEN, AR 1 isof, COX2, HMGCR, FASN, LDLR, CTLA4*.

Жирним відмічено гени, які вже зустрічались в попередніх групах. Загалом повна експресійна панель для діагностики та молекулярного профілювання раку ПЗ складається з 45 генів, з яких до 12 генів діагностичної частини панелі додається 33 нових гени для встановлення молекулярних підтипів раку ПЗ та фармакологічних біомаркерів.

Спираючись на сучасні парадигми, дані літератури та отримані нами результати можна запропонувати наступну узагальнюючу концепцію канцерогенезу (рис. 16).

Існує низка ендогенних (I) та екзогенних (II) чинників, які з плином часу, тобто віку (III), мають свій власний онкогенний вплив на організм людини, завдяки яким при взаємодії факторів та набутті низки порушень в організмі людини можлива ініціація процесу канцерогенезу як багатофакторного захворювання (IV). Пухлинні клітини хоч і набувають певних злоякісних ознак, але мають як загально-пухлинні, так і пухлино-специфічні порушення (генетичні та/або епігенетичні, експресійні порушення), як свідчать наші дослідження (IV/I). Завдяки різноманітності цих змін відбувається інактивація низки генів-супресорів у різних шляхах клітини, яка виливається у гетерогенність молекулярних характеристик пухлин, які, як ми показали, є біологічно детермінованими (V). Про це свідчить виявлення молекулярних підтипів за характеристиками пухлинних клітин на прикладі раку передміхурової залози (VI). Крім того, ми показали, що гетерогенність стосується й стромальних характеристик (IV/II, V), яка теж має закономірний характер. Нами виявлено молекулярні підтипи стромальних елементів та їхній взаємозв'язок з молекулярними підтипами за характеристиками пухлинних клітин (VI).



Рис. 16. Узагальнююча концепція канцерогенезу

Отже, отримані результати є вкладом до загальної картини сучасних парадигм патогенезу онкологічних захворювань та дають можливість говорити про наближення до створення персоналізованого підходу до діагностики та лікування хворих на рак.

ВИСНОВКИ

Вперше виявлено десятки значущих делецій та/або метилювання генів та локусів 3-ої хромосоми людини в епітелійних пухлинах яєчника, кишечника, молочної та передміхурової залоз за допомогою сучасної технології широкомасштабного скринінгу NotI-мікропанелей, для деяких генів ці порушення підтверджено іншими методами. Найбільшу кількість пухлино-специфічних змін вперше виявлено для раку передміхурової залози, особливості якого досліджували більш детально на рівні змін експресії генів-маркерів клітин пухлин та елементів стромального мікрооточення. Завдяки цьому вдалося встановити молекулярні підтипи аденокарцином та запропонувати потенційні діагностичні панелі на основі змін як ДНК, так і РНК у пухлинах з високими показниками точності, специфічності й чутливості.

1. Виявлено десятки генетичних та/або епігенетичних порушень генів та/або локусів 3-ої хромосоми людини в епітелійних пухлинах, які можуть свідчити про

інактивацию пухлино-асоційованих та потенційних генів-супресорів пухлин за допомогою NotI-мікропанелей.

2. Виявлено 74 гени та/або локуси з генетичними та/або епігенетичними порушеннями за результатами аналізу NotI-мікропанелей 3-ої хромосоми людини у 7-ми локалізаціях епітелійних пухлин, з яких 20 генів та/або локусів характерні для 5-7 типів пухлин, а 23 гени та локуси є пухлино-специфічними, найбільша кількість яких притаманна пухлинам передміхурової залози.

3. Показано метилювання промоторів генів *ITGA9*, *LRRC3B*, *THRB*, *RBSP3B* і *SEMA3B* та детектовано гомозиготні або гемізіготи делеції генів *NKIRAS1*, *PPM1M*, *PRICKLE2* і *GPX1* в епітелійних пухлинах.

4. Виявлено зміни експресії генів з генетичними або епігенетичними порушеннями (*GORASP1*, *GNAI2*, *ITGA9*, *LRRC3B*, *SEMA3B*, *NKIRAS1*, *PPM1M*, *PRICKLE2*, *GPX1* і *GPX3*) в епітелійних пухлинах.

5. Встановлено пухлино-супресорну функцію гена *SEMA3B* у системах *in vitro* та *in vivo* у пухлинах легені.

6. Знайдено низку диференційно-експресованих генів, які належать до різних сигнальних шляхів, таких як апоптоз, адгезія клітин, інвазивність і метастазування на ракових клітинних лініях LNCaP, DU145, PC3 та нормальній клітинній лінії PNT2 передміхурової залози, а також різницю їх експресії між агресивною PC3 та менш агресивною LNCaP лініями клітин.

7. Визначено рівні відносної експресії диференційно-експресованих у клітинних лініях генів: *TAGLN*, *EFNA5*, *IL1B*, *PLAU*, *TGFBI*, *EPDR1* та *FOS* у групах зразків пухлин передміхурової залози.

8. Оцінено рівні відносної експресії 34 генів, з яких 19 генів пов'язаних з епітелійно-мезенхімним переходом, 10 пухлино-асоційованих, 5 генів ліпідного метаболізму та гібридного транскрипта TMPRSS2-ERG (EF194202.1) у аденокарциномах передміхурової залози з різними клініко-патологічними характеристиками, умовно-нормальних тканинах і аденомах групі хворих з української популяції.

9. Встановлено рівні відносної експресії 23 генів, пов'язаних зі стромальними елементами пухлин, та імуно-асоційованих генів у аденокарциномах передміхурової залози.

10. Показана можливість ідентифікації типу клітин з експресією генів *TAGLN*, *IL1B*, *PLAU*, *TGFBI* і *FOS* завдяки об'єднанню імуногістохімічного й кореляційного аналізу експресії генів маркерів пухлинних клітин та стромальних елементів.

11. Визначено специфічні патерни експресії 30 генів у аденокарциномах передміхурової залози, які корелюють з клініко-патологічними характеристиками пухлин, що є основою для молекулярного профілювання раку передміхурової залози.

12. Виявлено 3 клінічно значущі молекулярні підтипи аденокарцином передміхурової залози як за рівнями відносної експресії груп генів маркерів пухлинних клітин, так і стромальних елементів за допомогою кластерного аналізу.

13. Запропоновано потенційні діагностичні панелі для виявлення та розрізнення за стадіями пухлин яєчника (12 маркерів) та пухлин передміхурової залози (16 маркерів) з високими статистичними показниками за даними NotI-мікропанелей.

14. Встановлено потенційні діапазони чутливості до інгібіторів FASN, LDLR, HMGCR, COX2, PTEN, AR і CTLA4, які є фармакологічними біомаркерами та мішенями, на основі аналізу експресії генів при раку передміхурової залози.

15. Розроблено алгоритм й проведено оптимізацію MDR аналізу для підбору експресійних панелей та запропоновано панель з 12 експресійних біомаркерів *CDH2, CXCL12, CCL17, ESR1, FN1, IL1R1, HIF1A, HOTAIR, KRT18, PCA3, S100A4, VDR* для виявлення аденокарцином передміхурової залози.

ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Гордіюк ВВ, Геращенко ГВ, Скрипкіна ІЯ, Симончук ОВ, Павлова ТВ, Угрин ДД, Манжура ОП, Вакулєнко ГО, Забаровський ЄР, Риндич АВ, Кашуба ВІ. Виявлення епігенетичних і генетичних порушень та зміни експресії генів 3-ї хромосоми людини при раку яєчників. *Biorolym Cell*. 2008; 24(4):323-332. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.0007B0>. *(Особистий внесок: виділення зразків РНК пухлин, підготовка та проведення Нозерн-блотингу, аналіз результатів, участь у написанні статті)*.

2. Gerashchenko GV, Gordiyuk VV, Skrypkinia IY, Kvasha SM, Kolesnik OO, Ugryn DD, Pavlova TV, Zabarovsky ER, Rynditch AV, Kashuba VI. Screening of epigenetic and genetic disturbances of human chromosome 3 genes in colorectal cancer. *Ukr Biokhim Zh* (1999). 2009 Jul-Aug;81(4):81-7. *(Особистий внесок: участь у підготовці зразків ДНК, у аналізі та представленні результатів, у написанні статті)*.

3. Gerashchenko GV, Bogatyrova OO, Rudenko EE, Kondratov AG, Gordiyuk VV, Zgonnyk YM, Vozianov OF, Pavlova TV, Zabarovsky ER, Rynditch AV, Kashuba VI. Genetic and epigenetic changes of NKIRAS1 gene in human renal cell carcinomas. *Exp Oncol*. 2010 Jul;32(2):71-5. *(Особистий внесок: виділення зразків ДНК, тотальної РНК, підбір та оптимізація умов ПЛР та кПЛР, аналіз та представлення результатів, написання статті)*.

4. Руденко ЄЄ, Геращенко ГВ, Гордіюк ВВ, Кондратов АГ, Кашуба ВІ. PPM1M як потенційний ген супресор росту пухлин у світлоклітинних карциномах нирок людини. *Фактори експериментальної еволюції організмів: зб. наук. пр.* 2011; 11:522-26. *(Особистий внесок: виділення зразків ДНК, тотальної РНК, підбір та оптимізація умов ПЛР та кПЛР, аналіз та представлення результатів, написання статті)*.

5. Kondratov AG, Stoliar LA, Kvasha SM, Gordiyuk VV, Zgonnyk YM, Gerashchenko AV, Vozianov AF, Rynditch AV, Zabarovsky ER, Kashuba VI. Methylation pattern of the putative tumor-suppressor gene LRRC3B promoter in clear cell renal cell carcinomas. *Mol Med Rep*. 2012 Feb;5(2):509-12. doi: 10.3892/mmr.2011.681.

(Особистий внесок: участь у плануванні роботи, підбір та оптимізація умов ПЛР та кПЛР, аналіз результатів, участь у написанні статті)

6. Kashuba V, Dmitriev AA, Krasnov GS, Pavlova T, Ignatjev I, Gordiyuk VV, Gerashchenko AV, Braga EA, Yenamandra SP, Lerman M, Senchenko VN, Zabarovsky E. NotI microarrays: novel epigenetic markers for early detection and prognosis of high grade serous ovarian cancer. *Int J Mol Sci.* 2012 Oct 18;13(10):13352-77. doi: 10.3390/ijms131013352. *(Особистий внесок: планування роботи, участь у аналізі та обговоренні результатів, написанні статті)*.

7. Rudenko EE, Gerashchenko GV, Lapska YV, Bogatyrova OO, Vozianov SO, Zgonnyk YM, Kashuba VI. Genetic and epigenetic changes of *GPX1* and *GPX3* in human clear-cell renal cell carcinoma. *Biopolym Cell.* 2013; 29(5):395-401. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.00082F> *(Особистий внесок: виділення зразків ДНК, тотальної РНК, підбір та оптимізація умов кПЛР, проведення частини кПЛР експериментів, аналіз результатів, участь у написанні статті)*.

8. Gordiyuk VV, Kondratov AG, Gerashchenko GV, Kashuba VI. Novel epigenetic markers of early epithelial tumor growth and prognosis. *Biopolym Cell.* 2013; 29(3):215-220. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.00081B> *(Особистий внесок: планування роботи, аналіз результатів, написання статті)*.

9. Розенберг ЄЕ, Прудникова ТЮ, Геращенко ГВ, Григор'єва ЕВ, Кашуба ВІ. Пошук генів – потенційних маркерів агресивності і метастазування раку простати людини. *Biopolym Cell.* 2013; 29(6):499-505. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000840> *(Особистий внесок: участь у плануванні роботи, підбір та оптимізація умов кПЛР, аналіз результатів, участь у написанні статті)*.

10. Розенберг ЄЕ, Геращенко ГВ, Кашуба ВІ. Порівняльний аналіз експресії генів у нормальній клітинній лінії та у клітинних лініях раку простати людини. *Ukr.Biochem.J.* 2014; 86(2):119-28 *(Особистий внесок: участь у плануванні роботи, підбір та оптимізація умов кПЛР, участь у аналізі та обговоренні результатів, написанні статті)*.

11. Rudenko EE, Gerashchenko GV, Lapska YV, Vozianov SO, Zgonnyk YM, Kashuba VI. *PPM1M* and *PRICKLE2* are potential tumor suppressor genes in human clear-cell renal cell carcinoma. *Biopolym Cell.* 2014; 30(3):229-233. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.00089A> *(Особистий внесок: участь у виділенні зразків ДНК та тотальної РНК пухлин, підбір та оптимізація умов кПЛР, аналіз та обговорення результатів, участь у написанні статті)*.

12. Rudenko EE, Lapska YV, Gerashchenko GV, Stakhovsky EO, Vikarchuk MV, Kashuba VI. Heterozygous deletions are main cause of expression alterations of *PPM1M* and *PRICKLE2* genes in human clear cell renal cell carcinomas. *Biopolym. Cell.* 2015; 31(1):29-33. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.0008C9> *(Особистий внесок: виділення зразків ДНК, тотальної РНК, підбір та оптимізація умов кПЛР, участь у аналізі результатів, написанні статті)*.

13. Rudenko E, Kondratov O, Gerashchenko G, Lapska Y, Kravchenko S, Koliada O, Vozianov S, Zgonnyk Y, Kashuba V. Aberrant expression of selenium-containing glutathione peroxidases in clear cell renal cell carcinomas. *Exp Oncol.* 2015 Jun;37(2):105-10. *(Особистий внесок: виділення зразків тотальної РНК пухлин та*

умовних норм, оптимізація умов кПЛР, проведення частини експериментів кПЛР, участь у аналізі результатів, написанні статті).

14. Loginov VI, Dmitriev AA, Senchenko VN, Pronina IV, Khodyrev DS, Kudryavtseva AV, Krasnov GS, Gerashchenko GV, Chashchina LI, Kazubskaya TP, Kondratieva TT, Lerman MI, Angeloni D, Braga EA, Kashuba VI. Tumor Suppressor Function of the SEMA3B Gene in Human Lung and Renal Cancers. PLoS One. 2015 May 11;10(5):e0123369. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123369> *(Особистий внесок: участь у плануванні роботи, підбір та оптимізація умов кПЛР, аналіз результатів, участь у написанні статті).*

15. Dmitriev AA, Rosenberg EE, Krasnov GS, Gerashchenko GV, Gordiyuk VV, Pavlova TV, Kudryavtseva AV, Beniaminov AD, Belova AA, Bondarenko YN, Danilets RO, Glukhov AI, Kondratov AG, Alexeyenko A, Alekseev BY, Klein G, Senchenko VN, Kashuba VI. Identification of Novel Epigenetic Markers of Prostate Cancer by NotI-Microarray Analysis. Dis Markers. 2015;2015:241301. doi:10.1155/2015/241301. *(Особистий внесок: участь у плануванні роботи, підготовці зразків геномної ДНК, підбір та оптимізація умов кПЛР, участь у аналізі та обговоренні результатів, написанні статті).*

16. Rosenberg EE, Gerashchenko GV, Hryshchenko NV, Mevs LV, Nekrasov KA, Lytvynenko RA, Vitruk YV, Gryzodub OP, Stakhovsky EA, Kashuba VI. Expression of cancer-associated genes in prostate tumors. Exp Oncol. 2017 Jul;39(2):131-137 *(Особистий внесок: участь у плануванні роботи, підбір та оптимізація умов кПЛР, аналіз результатів, участь у написанні статті).*

17. Mevs LV, Gerashchenko GV, Rosenberg EE, Pikul MV, Marynychenko MV, Gryzodub OP, Vozianov SO, Stakhovsky EA, Kashuba VI. Detection of prostate specific ETS fusion transcripts in cancer samples. Biopolym. Cell. 2017; 33(4):256-267. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000958> *(Особистий внесок: участь у плануванні роботи, підготовці зразків тотальної РНК, підбір та оптимізація умов кПЛР, синтез кДНК дослідних зразків, проведення кПЛР, підготовка зразків для секвенування, аналіз результатів, участь у написанні статті).*

18. Gerashchenko GV, Mankovska OS, Dmitriev AA, Mevs LV, Rosenberg EE, Pikul MV, Marynychenko MV, Gryzodub OP, Stakhovsky EO, Kashuba VI. Expression of epithelial-mesenchymal transition-related genes in prostate tumours. Biopolym. Cell. 2017; 33(5):335-355. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.00095E> *(Особистий внесок: планування роботи, участь у підготовці зразків тотальної РНК, синтез кДНК дослідних зразків, проведення кПЛР, проведення розрахунків відносної експресії, аналіз результатів, написання статті).*

19. Gerashchenko GV, Stakhovsky EO, Chashchina LI, Gryzodub OP, Kashuba VI. A role of expression level of reference and investigated genes in prostate tumors for qPCR analysis. Biopolym Cell. 2018; 34(2):85-96. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000973> *(Особистий внесок: планування роботи, участь у підготовці зразків тотальної РНК, синтез кДНК дослідних зразків, проведення кПЛР, проведення розрахунків відносної експресії, аналіз результатів, написання статті).*

20. Геращенко ГВ, Риндич АВ, Кашуба ВІ. Молекулярне профілювання пухлин передміхурової залози. Допов. Нац. акад. наук Укр. 2018; 6:113-9.

<https://doi.org/10.15407/dopovidi2018.06.113> (*Особистий внесок: планування роботи, участь у підготовці зразків тотальної РНК, синтез кДНК дослідних зразків, проведення кПЛР та розрахунків відносної експресії, аналіз результатів, написання статті*).

21. Gerashchenko GV, Mevs LV, Chashchina LI, Pikul MV, Gryzodub OP, Stakhovsky EO, Kashuba VI. Expression of steroid and peptide hormone receptors, metabolic enzymes and EMT-related genes in prostate tumors in relation to the presence of the TMPRSS2/ERG fusion. *Exp Oncol.* 2018 Jun;40(2):101-108 (*Особистий внесок: планування роботи, участь у підготовці зразків тотальної РНК, синтез кДНК дослідних зразків, проведення кПЛР та розрахунків відносної експресії, аналіз результатів, написання статті*).

22. Gerashchenko GV, Gordiyuk VV, Kashuba VI. Genetic and epigenetic alterations of human chromosome 3, investigated by NotI-microarrays in seven types of epithelial cancers. *Biopolym. Cell.* 2018; 34(4):303-312. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000983> (*Особистий внесок: планування роботи, участь у підготовці зразків геномної ДНК, розрахунки змін за даними NotI-мікропанелей, аналіз результатів, написання статті*).

23. Gerashchenko GV, Grygoruk OV, Kononenko OA, Gryzodub OP, Stakhovsky EO, Kashuba VI. Expression pattern of genes associated with tumor microenvironment in prostate cancer. *Exp Oncol.* 2018 Dec;40(4):315-322 (*Особистий внесок: планування роботи, участь у підготовці зразків тотальної РНК, синтез кДНК дослідних зразків, проведення кПЛР та розрахунків відносної експресії, аналіз результатів, написання статті*).

24. Gerashchenko GV, Kononenko OA, Bondarenko YuM, Stakhovsky EO, Kashuba VI. Expression patterns of genes that regulate lipid metabolism in prostate tumors. *Biopolym. Cell.* 2018; 34(6):445-460. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000990> (*Особистий внесок: планування роботи, участь у підготовці зразків тотальної РНК, синтез кДНК дослідних зразків, проведення кПЛР та розрахунків відносної експресії, аналіз результатів, написання статті*).

25. Геращенко ГВ, Григоруку ОВ, Мевс ЛВ, Кашуба ВІ. РТЕН- пов'язані зміни експресії генів у пухлинах передміхурової залози людини. Фактори експериментальної еволюції організмів: зб. наук. пр. 2018; 22:113-9 (*Особистий внесок: планування роботи, участь у підготовці зразків тотальної РНК, синтез кДНК дослідних зразків, проведення кПЛР та розрахунків відносної експресії, аналіз результатів, написання статті*).

26. Gerashchenko GV, Rynditch AV, Kashuba VI. Development of gene expression panels to determine prostate cancer. *Dopov. Nac. acad. Nauk Ukr.* 2019;(1):100-6. <https://doi.org/10.15407/dopovidi2019.01.100> (*Особистий внесок: планування роботи, участь у підготовці зразків тотальної РНК, синтез кДНК дослідних зразків, проведення кПЛР та розрахунків відносної експресії, аналіз результатів, написання статті*).

27. Gerashchenko GV, Grygoruk OV, Rosenberg EE, Bondarenko YuM, Kashuba EV, Kashuba VI. Expression of cancer-associated genes in prostate tumors at mRNA and protein levels. *Biopolym. Cell.* 2019; 35(1):39-53 (*Особистий внесок: планування*

роботи, участь у підготовці зразків тотальної РНК, синтез кДНК дослідних зразків, проведення кПЛР та розрахунків відносної експресії, аналіз результатів, написання статті).

28. Gerashchenko GV, Chashchina LI, Rynditch AV, Kashuba VI. The gene expression pattern as a tool for assessment of components of microenvironment and response to anti-cancer therapy of prostate tumors. *Dopov. Nac. acad. Nauk Ukr.* 2019;(4):86-93. *(Особистий внесок: планування роботи, участь у підготовці зразків тотальної РНК, синтез кДНК дослідних зразків, проведення кПЛР та розрахунків відносної експресії, аналіз результатів, написання статті).*

29. Rosenberg E., Gerashchenko G, Kashuba V. Search for potential biomarkers of prostate cancer. X Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів. Львів. 2014. 8-11 квітня., 2014; Збірник тез: 230-231. *(Особистий внесок: участь у плануванні роботи, підбір та оптимізація умов кПЛР, участь у аналізі та обговоренні результатів, написанні тез).*

30. Rosenberg E., Gerashchenko G, Kashuba V. Effect of D-Glucuronyl C5-Epimerase expression in prostate cancer cell lines. XI Український біохімічний конгрес 6-10 жовтня 2014 р., м.Київ, Україна, *Ukr Biochem J.* 2014; 86(5):29, Suppl. 2. *(Особистий внесок: участь у плануванні роботи, участь у аналізі та обговоренні результатів, написанні тез).*

31. Dmitriev AA, Krasnov GS, Kudryavtseva AV, Snezhkina AV, Gerashchenko AV, Rudenko EE, Rosenberg EE, Puzanov GA, Puzanov MA, Alekseev BY, Senchenko VN, Kashuba VI. Comparative analysis of methylation/deletion patterns of chromosome 3 in different cancer types using NotI-microarrays. FEBS EMBO 2014 Conference, Paris, France, 30 Aug - 4 Sept 2014. *FEBS Journal.* 2014;281(Suppl. 1):297-98. <https://doi.org/10.1111/febs.12919> *(Особистий внесок: участь у плануванні роботи, участь у аналізі та обговоренні результатів, написанні тез).*

32. Rozenberg E, Gerashchenko G, Gordiyuk V, Danilets R, Kashuba V. Genetic and epigenetic changes in prostate tumors. 2nd EACR Special Conference on Cancer Genomics, 28 June-01 July 2015, Cambridge, UK, EACR Conference Series. 2015:53 *(Особистий внесок: участь у плануванні роботи, підготовці зразків геномної ДНК, участь у аналізі та обговоренні результатів, підготовці тез).*

33. Розенберг ЄЕ, Кашуба ВІ, Геращенко ГВ, Литвиненко РА, Вітрук ЮВ, Стаховський ЕО. Експресія пухлино-асоційованих генів при раку передміхурової залози. XIII з'їзд онкологів та радіологів України 26-28 травня 2016, Київ, Україна. *Укр. Радіол. журнал.* 2016;Додаток 1:114-115 *(Особистий внесок: участь у плануванні роботи, підбір та оптимізація умов кПЛР, аналіз результатів, участь у написанні тез).*

34. Rozenberg EE, Gerashchenko GV, Gordiyuk VV, Bondarenko YuN, Danilets RO, Kashuba VI. Prostate tumors characterization by NotI-microarrays. International scientific conference "Integrated clinical and pathogenetic approaches in diagnosis and therapy of cancer", June 13-15, 2016, Kyiv, Ukraine, *Exp Oncol,* 2016;38(2):138 *(Особистий внесок: участь у плануванні роботи, підготовці зразків геномної ДНК, аналіз та обговорення результатів, участь у написанні тез).*

35. Rozenberg E, Gerashchenko G, Hryshchenko N, Lytvinenko N, Vitruk Yu, Gryzodub O, Stakhovsky E, Kashuba V. Expression of cancer-associated genes in prostate tumors. Mini-symposium “New trends in cancer research and innovative tumor vaccines” May 11, 2017 Kyiv, Ukraine, Exp Oncol. 2017;39(2):157–160 (*Особистий внесок: участь у плануванні роботи, підбір та оптимізація умов кПЛР, аналіз результатів, участь у написанні тез*).
36. Mevs LV, Gerashchenko GV, Rozenberg YE, Kashuba VI. TMRSS2-ERG dependent gene expression changes and possible fusion mechanism in prostate tumors. XII annual Conference of Young Scientists Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine, May15-16, Kyiv, Ukraine, Biopolym Cell. 2018;34(2):154 (*Особистий внесок: участь у плануванні роботи, підготовці зразків тотальної РНК, підбір та оптимізація умов кПЛР, синтез кДНК дослідних зразків, проведення кПЛР, підготовка зразків для секвенування, аналіз результатів, участь у написанні тез*).
37. Gerashchenko G, Rozenberg Y, Mevs L, Pikul M, Gryzodub O, Stakhovsky E, Kashuba V. Expression profiling of prostate tumor specific genes. Symposium and summer school “Fundamental principles of cancer biotherapy”, May 21-23, 2018, Kyiv, Ukraine, Exp Oncol. 2018;40(2):158-9 (*Особистий внесок: планування роботи, участь у підготовці зразків тотальної РНК, синтез кДНК дослідних зразків, проведення кПЛР, проведення розрахунків відносної експресії, аналіз результатів, підготовка тез*).
38. Gerashchenko GV, Kashuba VI. Molecular characteristics of an interaction between prostate tumor cells and the host organism. XI PARNAS Conference –Young Scientists Forum “Biochemistry and Molecular Biology for Innovative Medicine”, September 3-5, 2018, Kyiv, Ukraine. Ukr Biochem J. 2018;90(Special Issue):73 (*Особистий внесок: планування роботи, участь у підготовці зразків тотальної РНК, синтез кДНК дослідних зразків, проведення кПЛР, проведення розрахунків відносної експресії, аналіз результатів, підготовка тез*).
39. Gerashchenko G, Kashuba V. Molecular profiling of prostate tumors. “Modern Molecular-Biochemical Markers in Clinical and Experimental Medicine -2018”, 31 October-2 November, 2018, Prague, Czech Republic, Biological markers in fundamental and clinical medicine (collection of abstracts). 2018;2(2):25 (*Особистий внесок: планування роботи, участь у підготовці зразків тотальної РНК, синтез кДНК дослідних зразків, проведення кПЛР, проведення розрахунків відносної експресії, аналіз результатів, підготовка тез*).

АНОТАЦІЯ

Герашченко Г.В. Генетичні, епігенетичні та експресійні порушення у низці епітелійних пухлин. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальностями 03.00.03 «Молекулярна біологія» та 03.00.22 «Молекулярна генетика» (091 – Біологія). – Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ, 2019.

З використанням NotI-мікропанелей для 180 клонів 3-ої хромосоми людини виявлено десятки генів та локусів, що мають значущі генетичні та/або епігенетичні порушення у чотирьох локалізаціях епітелійних пухлин яєчника, кишечника, молочної та передміхурової залоз, що свідчить про множинну інактивацию генів-супресорів росту пухлин та потенційних генів-супресорів пухлин на 3p- та 3q-плечі. Для низки генів результати валідовані іншими методами. Для потенційного гена супресора росту пухлин *SEMA3B* встановлено його пухлино-супресорну активність в умовах *in vitro* та *in vivo*. За даними NotI-мікропанелей запропоновано панелі для діагностики та розрізнення раку яєчників та передміхурової залози.

Встановлено особливості експресії пухлино-стромальних генів при раку передміхурової залози на модельних клітинних лініях (~140 генів) та зразках пухлин (~57 генів). Виявлено більше 30 диференційно-експресованих генів у пухлинах передміхурової залози, що асоційовані з ЕМП, раком передміхурової залози, пухлино-асоційованими фібробластами, макрофагами та імунно-асоційованими генами. На основі кластеризації цих груп генів встановлено три молекулярні підтипи аденокарцином, які сильно корелюють з пухлино-асоційованими та стромальними групами генів.

На основі створеного протоколу пристосування результатів експресії до MDR-аналізу розроблено експресійні панелі для діагностики раку передміхурової залози.

Ключові слова: злоякісні епітелійні пухлини, генетичні аберації, метилювання промоторів генів, NotI-мікропанелі, 3-я хромосома людини, гени-супресори росту пухлин, пухлино-асоційовані гени, відносна експресія генів, пухлино-стромальні взаємодії, молекулярне профілювання, панелі біомаркерів.

АННОТАЦІЯ

Герашенко А.В. Генетические, эпигенетические и экспрессионные нарушения в ряде эпителиальных опухолей. – Квалификационный научный труд на правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальностям 03.00.03 – «Молекулярная биология» и 03.00.22. – «Молекулярная генетика». – Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев, 2019.

С использованием NotI-микрочипов для 180 клонов хромосомы 3 человека выявлены десятки генов и/или локусов, которые имеют значимые генетические и/или эпигенетические нарушения в четырех локализациях эпителиальных опухолей: яичника, кишечника, предстательной и молочной желез, что свидетельствует об инактивации кластеров генов-супрессоров роста опухолей и потенциальных генов-супрессоров на 3p- и 3q-плече. Для ряда генов результаты валидированы другими методами. Для потенциального ген-супрессора *SEMA3B* установлена его супрессорная активность в условиях *in vitro* и *in vivo*. По данным NotI-микрочипов предложено наборы для диагностики и различения рака яичника и простаты.

В работе установлены особенности экспрессии генов опухоль-стромальных генов при раке предстательной железы на модельных клеточных линиях (~140 генов) и образцах опухолей (~57 генов). Выявлено более 30 дифференциально-экспрессированных генов, ассоциированных с ЭМП, раком предстательной железы, опухоль-ассоциированными фибробластами, макрофагами и иммуно-ассоциированными генами. На основе кластеризации этих групп генов установлены три молекулярные подтипы аденокарцином, которые высоко коррелируют между опухоль-ассоциированными и стромальных группами генов.

На основе созданного протокола адаптации результатов экспрессии для MDR-анализа разработаны экспрессионные панели для диагностики рака простаты.

Ключевые слова: злокачественные эпителиальные опухоли (раки), генетические aberrации, метилирование промоторов генов, NotI-микрочипы, хромосома 3 человека, гены-супрессоры, опухоль-ассоциированные гены, относительная экспрессия генов, опухоль-стромальные взаимодействия, молекулярное профилирование, панели биомаркеров.

SUMMARY

Gerashchenko G.V. Genetic, epigenetic and expression aberrations in several types of epithelial cancers. - Qualification scientific work with the manuscript copyright.

Thesis for obtaining the degree of Doctor of Science in Biology, specialties: 03.00.03 – Molecular Biology and 03.00.22 – Molecular Genetics. – Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine, Kyiv, 2019.

Genetic and epigenetic alterations of genes/loci on human chromosome 3 were determined in four types of epithelial cancers, namely ovarian, colon, prostate and breast, using NotI-microarrays that contained 180 clones associated with genes/loci. We demonstrated inactivation of clusters of tumor suppressor genes (and putative tumor suppressor genes) on the 3p- and 3q-arms. We found that genes, such as *ITGA9*, *LRR3B*, *THRB*, *RBSP3* and *SEMA3B* was inactivated due to methylation of the gene promoters. Other genes, for example, *NKIRAS1*, *PPM1M*, *PRICKLE2* and *GPX1* were inactivated in tumors due to heterozygous and homozygous deletions. Genes *GORASP1*, *GNAI2*, *NKIRAS1*, *GPX1*, *GPX3*, *PPM1M*, *PRICKLE2*, *SEMA3B*, *BHLHE40*, *BCL6* and *ITGA9* showed both, genetic and/or epigenetic aberrations; their expression were downregulated in the studied epithelial tumors, as was shown by a quantitative PCR. For the putative tumor suppressor gene *SEMA3B*, we detected methylation of the promoter and intron CpG-islet in renal and lung tumors and also decreased gene expression in these tumor types. Moreover, we shown the tumor suppressor activity of *SEMA3B* both, *in vitro* and *in vivo*.

In result of an analysis of the NotI- microarray data, concerning 7 types of epithelial tumors we found, that 74 genes/loci showed the significant genetic and/or epigenetic aberrations. Twenty of them are common for several tumor types; changes in

expression in 23 genes/loci are tumor-specific. The majority of them are found in samples of prostate cancer tissue.

Based on the NotI-microarray data analysis, we proposed the panels of markers for diagnostics and sub-division of ovarian and prostate cancers.

Also, we identified some features of tumor-stromal specific gene expression in more in prostate cancer, using tumor samples (~57 genes) and model cell lines (~140 genes). A comparative analysis of the relative expression of 65 genes in tumor cell lines LNCaP, DU145 and PC3 and in the conventionally normal cell line PNT2 revealed 35 differentially expressed genes, encoding proteins involved in the TP53, NF-kB, and WNT signaling pathways and in cell adhesion, invasiveness and metastasizing. Genes, such as *IL1B*, *TAGLN*, *EFNA5*, *IL8*, *CXCL1* and *CCNB2* were among them. Moreover, our study on the relative expression levels of 84 genes in comparison between LNCaP and PC3 cell lines allowed us to identify 36 differentially expressed genes, associated with apoptosis, adhesion, invasiveness and metastasizing, including *MET*, *MMP1*, *MTA2*, *NME4*, *PLAU*, *TGFB1*, *SERPINB5* and *SERPINE1*. Expression of the seven differentially expressed genes, namely *TAGLN*, *EFNA5*, *IL1B*, *PLAU*, *TGFB1*, *EPDR1* and *FOS*, correlated with the stage and a Gleason score in prostate adenocarcinomas, especially, when expression levels were compared with such in the conditionally-normal tissues and adenomas. The data, obtained on clinical samples, only partially coincided with the results on cell lines, which can be explained by heterogeneity of individual tumors and admixture of other cell types.

First, we monitored the presence of a *TMPRSS2-ERG* (EF194202.1) fusion transcript in adenocarcinomas of the different stage and Gleason score, in a group of Ukrainian patients. We assessed levels of relative expression of more than 50 genes from different functional groups in prostate tumors. More than 30 genes, associated with epithelial-to-mesenchymal cell transition (EMT), prostate cancer, tumor-associated fibroblasts, macrophages and immune-associated genes showed differential expression. Based on the cluster analysis of these gene groups, we could identify three molecular subtypes of prostate adenocarcinomas, that showed a high degree of correlation between groups of tumor-associated genes and stromal genes.

The obtained data on the relative expression allowed us to predict potential ranges of the sensitivity of tumor cells to the specific inhibitor drugs, using expression pattern of several genes, such as *AR*, *PTEN*, *COX2*, *LDLR*, *HMGCR*, *FASN* and *CTLA4*.

We developed an approach for the analysis of relative gene expression data, to create biomarker panels, based on the machine learning method and MDR analysis. Using this approach, we proposed the 12 biomarker panel for diagnostics and sub-typing of prostate adenocarcinomas. This panel, including genes, such as *CDH2*, *CXCL12*, *CCL17*, *ESR1*, *FN1*, *IL1R1*, *HIF1A*, *HOTAIR*, *KRT18*, *PCA3*, *S100A4* and *VDR*, can be used to differentiate adenocarcinomas by the stage and Gleason score with the high statistical probability.

Key Words: epithelial cancer, genetic aberration, methylation of gene promoter, NotI-microarray, human chromosome 3, tumor suppressor gene, tumor-associated gene, relative gene expression, tumor-stromal interaction, molecular profiling, biomarker panel.