

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ ІНСТИТУТ
МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ
ННЦ «ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ ТА МЕДИЦИНИ»
КИЇВСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОГО УНІВЕРСИТЕТУ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

МАНЬКОВСЬКА Оксана Сергіївна

УДК 577.218+616.65

ДИСЕРТАЦІЯ

**ЕПІГЕНЕТИЧНІ ТА ЕКСПРЕСІЙНІ МАРКЕРИ ПУХЛИН
СЕЧОСТАТЕВОЇ СИСТЕМИ**

03.00.03 – молекулярна біологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних
наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання
ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне
джерело _____ О.С. Маньковська

Науковий керівник:

Кашуба Володимир Іванович,
доктор біологічних наук, професор

Київ – 2021

АНОТАЦІЯ

Маньковська О.С. Епігенетичні та експресійні маркери пухлин сечостатевої системи – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.03 «Молекулярна біологія». – Інститут молекулярної біології і генетики Національної Академії Наук України, Київ, 2021.

Широке розповсюдження онкологічних захворювань на сьогодні залишається проблемою, при чому кількісні показники захворюваності на рак у світі продовжують зростати. Рак передміхурової залози посідає друге місце за захворюваністю серед чоловіків у світі. На ранніх стадіях він є безсимптомним, симптоми часто з'являються вже на етапі наявності метастазів у кістки. Рак сечового міхура посідає 10 місце за кількістю нових випадків у світі станом на 2020 рік. Первинний рак сечового міхура є неінвазивним і сам по собі має хороший прогноз лікування, проте дуже часто відбуваються рецидиви, які вже представлені інвазивною формою, небезпечною для життя. Рак сечового міхура також безсимптомний на ранніх стадіях, а його перші симптоми є подібними до симптомів запальних захворювань сечостатевої системи.

Таким чином, як рак передміхурової залози, так і рак сечового міхура гостро потребують знаходження нових ефективних маркерів для ранньої діагностики, скринінгу та прогнозування розвитку хвороби. Перевага на сьогодні надається пошуку неінвазивних методів діагностики онкозахворювань, зокрема на основі дослідження біологічних рідин індивідів – рідинних біопсій. Вони містять різноманітний матеріал пухлинного походження: циркулюючі пухлинні клітини, ДНК та РНК зі зруйнованих клітин, а також продукти виділення пухлинних клітин, зокрема екзосоми, що містять у собі різні біологічні молекули.

Враховуючи результати попередніх досліджень, найкращою біологічною рідиною для аналізу вважається та, що безросередньо контактує або знаходиться у фізичній близькості з пухлиною, таким чином, для пошуку маркерів пухлин сечостатевої системи доцільним та актуальним є аналізувати матеріал, який міститься у сечі пацієнтів.

Таким чином, метою роботи було виявлення маркерних для раку передміхурової залози та сечового міхура епігенетичних та експресійних змін у тканинах та біологічних рідинах хворих та оцінка можливості їх використання для неінвазивної діагностики цих захворювань.

Ми обрали низку генів кандидатів для раку передміхурової залози та раку сечового міхура, експресія яких може бути регульована метилюванням у ділянках промоторів, зміни їх експресії та/або метилювання характерні для онкологічних захворювань, зокрема для досліджуваних нами злоякісних пухлин. Крім того, ми досліджували зміни експресії генів кінази родини Aurora та кінази BRAF, які є потенційними онкогенами для раку передміхурової залози. Довга некодуюча РНК PANDAR є одним з нещодавно виявлених потенційних онкогенів, який пов'язаний, крім того, з поганим прогнозом для раку сечового міхура і для низки інших онкологічних захворювань, проте вона не була вивчена у біологічних рідинах хворих, тож нами було досліджено її позаклітинні рівні у сечі пацієнтів і експресію для обох досліджуваних пухлин.

Було проведено кількісний аналіз рівнів метилювання генів *VIM*, *KRT18*, *RASSF1A*, *NKX3.1*, *CDH1* і *PTEN* у клітинних лініях раку передміхурової залози, тканинах пухлин раку передміхурової залози та прилеглих нормальних тканинах. В результаті ми виявили, що клітинні лінії відрізнялись за рівнем метилювання досліджуваних генів, зокрема, метилювання онкосупресора *RASSF1A* у LNCaP було нижчим за обидві інші лінії. Дуже низькі рівні метилювання були виявлені для *CDH1* у всіх клітинних лініях, а ген *VIM*, натомість, був повністю заметильований, при

чому подібне явище спостерігалось і в тканинах пацієнтів. У тканинах найбільш диференційно метильованим виявився ген *RASSF1A*, проте і для нього, і для всіх інших генів не було виявлено різниці у рівнях метилювання між тканинами пухлин та парними умовно нормальними тканинами. Натомість, для генів *CDH1*, *PTEN*, *NKX3.1* було виявлено позитивну кореляцію у цих парах за рівнем метилювання, що може відображати ранні зміни, які відбуваються у прилеглих тканинах, проте ще не призвели до канцерогенезу. Кореляційний аналіз експресії цих генів, їх метилювання та клініко-патологічних характеристик хворих на РПЗ виявив негативну кореляцію рівня метилювання *KRT18* та балом за шкалою Глісона в аденокарциномах простати. Розділивши зразки на групи за критерієм наявності чи відсутності у них гібридного транскрипту *TMPRSS2:ERG* ми з'ясували, що рівні метилювання *RASSF1A* були вищими у групі з гібридним транскриптом.

У сечі пацієнтів метилювання оцінювали шляхом якісного аналізу. В результаті було показано, що наявність у сечі метилювання усіх досліджуваних генів є більш характерним для пацієнтів з раком передміхурової залози, ніж для здорових донорів, проте часто зустрічається у осіб з запальними захворюваннями сечостатевої системи. Найкращою комбінацією для визначення різниці між хворими на РПЗ та особами без онкозахворювань є комбінація метильованих генів *PTEN*, *CDH1*, *NKX3.1*, *RASSF1A* та *GDF15*.

Провівши аналіз метилювання генів *VIM*, *TMEFF2*, *RASSF1A*, *NKX3.1*, *MYO3A* та *GDF15* у сечі хворих на рак сечового міхура, ми виявили, що ген *MYO3A* був заметильований у всіх пацієнтів з запаленням і хоч його метилювання зовсім не зустрічалось у здорових донорів, очевидно, що воно не здатне виявити різницю між хворими на рак і пацієнтами без раку, і, можливо, є асоційованим саме з процесом запалення. На основі розрахунків було визначено, що найкраще хворих на

рак від осіб без раку може відрізнити наявність у них метилування більшості генів з комбінації *VIM*, *TMEFF2*, *GDF15*, *RASSF1A* і *NKX3.1*.

Ми проаналізували відносну експресію генів кінази родини Aurora у тканинах аденом, аденокарцином та парних прилеглих тканинах раку передміхурової залози. Було виявлено статистично значущу відмінність у показниках відносної експресії гену *AURKA* у злоякісних пухлинах та аденомах ($p=0,047$) з нижчою експресією у злоякісних новоутвореннях. Розділивши пухлини за стадією, ми з'ясували, що така різниця зберігається для пухлин на 3-4 стадії та аденом. Експресія гену *AURKC* відрізнялась у групах умовно-нормальних тканин ранніх (N1/2) та пізніх стадій (N3/4), із вищими показниками відносної експресії у тканинах N3/4 ($p=0,021$). Оцінивши кореляцію досліджуваних генів між собою та з іншими генами, що раніше досліджувались на цих зразках у нашому відділі, ми виявили позитивну кореляцію відносних рівнів експресії генів *AURKA* і *AURKB*, кореляцію експресії цих генів з *MKI67*, геном *NKX3.1*. Експресія *AURKA* позитивно корелювала з експресією *AR* а експресія *AURKC* з експресією *CYP17A1*.

Було продемонстровано, що клітини лінії PC3 характеризуються нижчою експресією генів *AURKA* і *AURKB* у порівнянні з андрогенчутливою лінією LNCaP і нормальними клітинами передміхурової залози. При цьому, рівень експресії *AURKC* у даної клітинної лінії є найвищим з-поміж усіх інших. Рівень експресії *BRAF* був вищий у PC3 ніж у LNCaP. У клітинах, осаджених з сечі, експресія гена кінази Aurora A була достовірно вищою у групи пацієнтів з раком передміхурової залози, ніж у осіб без раку. Крім того, ми з'ясували, що у групах хворих на РПЗ та осіб без раку спостерігається позитивна кореляція експресії генів кінази Aurora A і Aurora B, так само, як було виявлено на зразках тканин, у той час як експресія кінази *BRAF* у зразках

пацієнтів з РПЗ сильно корелює з експресією гена кінази Aurora C, а у клітинах з сечі осіб без раку – з експресією генів Aurora A і B.

Результати біоінформатичного аналізу з використанням різних алгоритмів та баз даних виявили, що днРНК PANDAR може взаємодіяти з низкою мікроРНК, що беруть участь у регуляції експресії онкогенів. У клітинній лінії LNCaP рівень PANDAR у клітинах був найвищий серед інших клітинних ліній, у той час як найнижча відносна експресія PANDAR була у клітинах PC3, проте її рівні у кондиційованому середовищі цих клітин були найвищими. Ми не виявили статистично достовірної різниці у рівнях днРНК PANDAR у безклітинній сечі пацієнтів, хворих на РПЗ та умовно здорових осіб. При аналізі рівнів днРНК PANDAR у сечі пацієнтів, хворих на рак сечового міхура, ми виявили статистично достовірну різницю між хворими на рак та умовно здоровими особами. Провівши ROC аналіз, ми показали, що площа під ROC кривою становила 0,7803 при $p = 0,0053$.

Проаналізувавши кореляцію експресії генів кіназ родини Aurora у клітинах з сечі та днРНК PANDAR у безклітинній сечі тих самих пацієнтів, ми знайшли позитивні кореляції між рівнями днРНК PANDAR та експресією у клітинах із цих зразків генів кіназ *AURKC* і *BRAF* ($r_s = 0,51$ і $0,57$, відповідно, $p < 0,05$).

Для пацієнтів з раком сечового міхура ми припустили, що додавши визначення рівнів PANDAR до маркерів на основі метилювання, ми можемо отримати кращі показники, ніж для кожного із них окремо. Так, дійсно, аналіз простої логістичної регресії та ROC аналіз виявили можливість досить точно відрізнити хворих на рак сечового міхура від осіб без раку, поєднавши ці два типи потенційних маркерів.

Таким чином, зміни у метилюванні генів-онкосупресорів, що досліджувались у даній роботі, можуть скласти потенційні маркерні панелі для діагностики раку передміхурової залози та сечового міхура;

підвищення експресії *AURKA* в клітинах сечі може виступати прогностичним маркером для РПЗ, тоді як роль експресії генів інших кіназ, а також відносних рівнів днРНК PANDAR для діагностики РПЗ потребує подальшого дослідження. Поєднання рівнів PANDAR та маркерів на основі метилювання ДНК для РСМ дає змогу ефективно відрізнити пацієнтів з раком сечового міхура від індивідів без онкозахворювань.

Ключові слова: метилювання промоторів, кінази родини Aurora, BRAF, рідинні біопсії, днРНК PANDAR, рак передміхурової залози, рак сечового міхура.

Список наукових публікацій здобувача

1. Mankovska O.S., Korsakova A.S., Cherniavskiy K.R., Kononenko O.A., Stakhovsky E.O., Bondarenko Yu.M., Kashuba V.I., Gerashchenko G.V. Methylation pattern of tumor-suppressor gene promoters as putative noninvasive diagnostic markers for prostate cancer. *Biopolymers and Cell* – 2021. – 37(1). – pp. 23-32.

2. Mankovska O., Gerashchenko G., Rozenberg E., Stakhovsky E., Kononenko O., Bondarenko Yu., Kashuba V. Analysis of Aurora kinases genes expression points on their distinct roles in prostate cancer development. *Ukr.Biochem.J* – 2019. – 91(6). – pp. 15-26.

3. 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. *Biopolymers and Cell* – 2017. – 33(5). – pp. 335-355.

4. Маньковська О.С., Асатрян О. Е., Вікарчук М. В., Кононенко О. А., Стаховський Е. О., Кашуба В. І Визначення експресії генів кіназ AURORA A, AURORA B, AURORA C, BRAF і EGFR у сечі пацієнтів, хворих на рак передміхурової залози *Наукові записки НаУКМА* . – 2016. – т.184. – с.16 -23.

5. Маньковська О. С., Скрипнікова О. С., Панасенко Г. В., Вікарчук М. В., Кононенко О. А., Стаховський Е. О., Кашуба В. І. Виявлення метилування генів *VIM*, *TMEFF2* і *GDF15* у сечі пацієнтів, хворих на рак сечового міхура в українській популяції Наукові записки НаУКМА . – 2016. – т.184. – с. 23-29.

6. Mankovska O.S., Cherniavskiy K.R., Savitskyu A.L., Semko S.L., Grechko B.O., Bondarenko Yu.M., Kashuba V.I. Epigenetic markers of bladder cancer: can we distinguish cancer from non-cancerous inflammation using urine as source of DNA? // Науково-практичний журнал ОНКОЛОГИЯ. - Т. 21. - № 3. - 2019. - с. 268.

7. Mankovska O.S., Kashuba V. I. Differential expression of Aurora kinases' genes in prostate cancer and prostate adenoma samples points on possibility of their distinct roles in prostate cancer development. // Матеріали конференції молодих вчених “Фундаментальна медицина: інтегральні підходи до терапії хворих з онкопатологією”, 4-5 лютого, 2019 р., Київ, Україна. Науково-практичний журнал ОНКОЛОГИЯ. - Т. 21. - № 3. - 2019. -с.77.

8. Asatryan O. E., Mankovska O.S., Kashuba V. I. Changes in expression of oncogenes and methylation of tumor suppressor genes in urine from patients with prostate cancer. // Biopolymers and Cell. Materials of XII annual Conference of Young Scientists Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine. - 2018. - Vol. 34. (2). - P 143.

9. Skrypnikova O. S., Mankovska O.S., Kashuba V. I. Detection of methylation of tumor suppressor genes and identification of expression profile of non-coding rnas in samples of urine from patients with bladder cancer. // Biopolymers and Cell. Materials of XII annual Conference of Young Scientists Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine.- 2018. - Vol. 34. (2). – P. 155.

10. Mankovska O., Panasenko G, Kashuba V. BRAF mutation and hypermethylation of RASSF1A, GSTP and RARbeta2 in prostate cancer patients // European Journal of Human Genetics, - 2018. - V26. - 1001-2 pp.

11. Mankovska O., Kashuba V. Identification of novel molecular and genetic markers for early detection of epithelial tumours and prognosis of the course of the disease // Exp. Oncol. Materials of mini-symposium “New Trends in Cancer Research and Innovative Tumor Vaccines” – 2017. V 39, 2. – P.158.

12. Mankovska O.S., Asatryan O. E., Vikarchuk M.V., Kononenko O. A., Stakhovsky E. O., Kashuba V. Expression of AURORA C Kinase Gene Correlates with BRAF Gene Expression in Samples of Patients with Prostate and Thyroid Cancer. // The 12th International Congress of Cell Biology July 21-25 2016, Prague, Czech Republic. Abstract book. – 2016.

13. Mankovska O.S., Asatryan O. E., Vikarchuk M.V., Kononenko O. A., Stakhovsky E. O., Kashuba V. I. Aurora A, Aurora B, Aurora C and BRAF kinases gene expression in samples of urine from patients with prostate cancer // FEBS JOURNAL – 283. – P. 368.

14. Mankovska O.S., Skrypnikova O.S., Panasenko G.V., Slivka U.S., Vikarchuk M.V., Kononenko O.A., Stakhovsky E.O., Kashuba V.I. Characterization of methylated VIM, TMEFF2 and GDF as potential set of epigenetic markers for bladder cancer. // Exp Oncol. Materials of International scientific conference “Integrated Clinacal and Pathogenetic Approaches in Diagnosis and Therapy of Cancer. 2016. – 38 (2). - 128–140 pp.

15. Маньковська О.С., Скрипнікова О.С., Панасенко Г.В., Вікарчук М.В., Стаховський О.Е., Пікуль М.В., Кашуба В.І. Виявлення нових епігенетичних і прогностичних маркерів у сечі хворих на рак сечового міхура. // Український Радіологічний журнал. – Додаток 1. – 2016. – XIII з’їзд онкологів і радіологів України 26-28 травня 2016 р., м. Київ (матеріали з’їзду). – с.114.

16. Панасенко Г.В., Маньковська О.С., Вікарчук М.В., Некрасов К.А., Кондратов О.Г., Кашуба В.І., Стаховський Е.О., Кононенко О.А. Панель нуклеїнових маркерів для виявлення та диференціювання карциноми нирки, передміхурової залози та сечового міхура по сечі пацієнтів. // Науково-практичний журнал «Онкологія», 2015. — Т. 17, № 3 (65).

17. Маньковская О.С., Панасенко Г.В., Кашуба В.И., Стаховский Э.О., Некрасов К.А., Кононенко А.А. Кондратов А.Г. Панель нуклеиновых маркеров для выявления и дифференцировки карциномы почки, простаты и мочевого пузыря по моче пациентов. Abstract book “Science, Technology and Innovative Technologies in the prosperous epoch of the Powerful State” Abstracts of papers of the International Scientific Conference. June.11-13, 2015., Ashgabat. - 2015 – p. 265.

SUMMARY

Mankovska O.S. Epigenetic and expression markers of the cancers of genitourinary system. – Qualification scientific work with the manuscript copyright.

Thesis for obtaining the degree of Doctor of Philosophy (PhD) in Biology, speciality 03.00.03 – Molecular Biology. – Institute of Molecular Biology and Genetics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2021.

The widespread of cancer disease remains a problem today, and the incidence of cancer continues to rise. Prostate cancer (PCa) ranks second in incidence among men in the world. In the early stages, it is asymptomatic, with symptoms often appearing at the stage of bone metastases. Bladder cancer ranks 10th in the number of new cases in the world as of 2020. Primary bladder cancer is non-invasive and has a favorable prognosis, but characterized by often recurrence in already invasive, life-threatening form. Bladder cancer is also

asymptomatic in the early stages, and its first symptoms are similar to the symptoms of inflammatory diseases of the genitourinary system.

Thus, both prostate cancer and bladder cancer are in dire need of finding new effective markers for early diagnosis and prognosis. Today, preference is given to the search for non-invasive methods for the diagnosis of cancer, in particular on the basis of the study of biological fluids of individuals - liquid biopsies. They contain a variety of material of tumor origin: circulating tumor cells, DNA and RNA from destroyed cells, as well as products of tumor cell secretion, in particular exosomes, which also contain various biological molecules. Today, the best biological fluid for analysis is considered to be that which is in direct contact with or in physical proximity to the tumor, so to find markers of tumors of the genitourinary system, it is appropriate and relevant to analyze the material in the urine of patients.

Thus, the aim of the work was to elucidate markers for prostate and bladder cancer based on epigenetic and expression parameters in tissues and biological fluids of patients and to develop a non-invasive methods for the diagnosis of these diseases.

We have selected a number of candidate genes for prostate cancer and bladder cancer, the expression of which can be regulated by methylation in promoter regions, changes in their expression and/or methylation were shown in cancer, in particular in the malignancies of our interest. In addition, we investigated changes in the expression of Aurora kinase and BRAF kinase genes, which are potential oncogenes for prostate cancer. Long non-coding PANDAR RNA is one of the recently discovered oncogenes, which is also associated with a poor prognosis for bladder cancer and a number of other cancers, but it has not been studied in patients' body fluids, so it was interesting to analyze its extracellular levels in the urine of patients and expression for both studied tumors.

We performed a quantitative analysis of the methylation levels of the *VIM*, *KRT18*, *RASSF1A*, *NKX3.1*, *CDH1*, and *PTEN* genes in prostate cancer cell lines, prostate cancer tumor tissues, and adjacent normal tissues. As a result, we found that the cell lines differed in the level of methylation of the studied genes, in particular, the methylation of the tumor suppressor *RASSF1A* in LNCaP cells was lower than in the other two cell lines. Very low levels of methylation were detected for *CDH1* in all cell lines, and the *VIM* gene, on the other hand, was completely methylated, with a similar phenomenon observed in patients' tissues. In tissues, the *RASSF1A* gene was the most differentially methylated, but for it and for all other genes, no difference in methylation levels was found between tumor tissues and paired conditionally normal tissues. In contrast, for the genes *CDH1*, *PTEN* and *NKX3.1*, a positive correlation was found in these pairs in the level of methylation, which may reflect the early changes that occur in adjacent tissues, but have not yet led to carcinogenesis. Correlation analysis of the expression of these genes, their methylation and clinical and pathological characteristics of patients with PCa revealed a negative correlation between the level of methylation of *KRT18* and the Gleason score in prostate adenocarcinomas. Dividing the samples into groups according to the criterion of the presence or absence of a fusion transcript *TMPRSS2: ERG*, we found that the levels of methylation of *RASSF1A* were higher in the group with a hybrid transcript.

In the urine of patients, we detected methylation by qualitative analysis. As a result, methylation of all of these genes has been shown to be more common in patients with prostate cancer than in healthy donors, but is common in people with inflammatory diseases of the genitourinary system. The best combination to differentiate between patients with PCa and those without cancer is a combination of methylated genes *PTEN*, *CDH1*, *NKX3.1*, *RASSF1A* and *GDF15*.

After analyzing the methylation of *VIM*, *TMEFF2*, *RASSF1A*, *NKX3.1*, *MYO3A* and *GDF15* genes in the urine of patients with bladder cancer, we found that the *MYO3A* gene methylation was observed in all patients with inflammation and although its methylation did not occur in healthy donors, apparently that it is not able to distinguish between cancer patients and non-cancer individuals, and may be associated with the inflammatory process. Based on the calculations, it was determined that the cancer patients from non-cancer individuals can be distinguished by the presence of methylation of most genes from a combination of *VIM*, *TMEFF2*, *GDF15*, *RASSF1A* and *NKX3.1*.

We analyzed the relative expression of Aurora kinase genes in adenoma, adenocarcinoma, and paired adjacent prostate cancer tissues. We found a statistically significant difference in the relative expression of the *AURKA* gene in malignant tumors and adenomas ($p = 0.047$) with lower expression in malignant neoplasms. Dividing the tumors by stage, we found that this difference persists for stage 3-4 tumors and adenomas. *AURKC* gene expression differed in the groups of conditionally normal tissues of early (N1/2) and late stages (N3/4), with higher relative expression in tissues N3/4 ($p = 0.021$). Evaluating the correlation of the studied genes with each other and with other genes previously studied on these samples in our department, we found a positive correlation of the relative expression levels of the *AURKA* and *AURKB* genes, the correlation of the expression of these genes with *MKI67*, *NKX3.1* gene. *AURKA* expression was positively correlated with *ARisof1* expression and *AURKC* expression was positively correlated with expression of *CYP17A1*.

PC3 cells are characterized by lower expression of the *AURKA* and *AURKB* genes compared to the androgen-sensitive LNCaP cell line and normal prostate cells. In this case, the level of *AURKC* expression in this cell line was the highest among all others. The level of *BRAF* expression is higher in PC3 than in LNCaP. In urine-precipitated cells, Aurora A kinase gene expression was significantly higher in patients with prostate cancer than in non-cancer

patients. In addition, we found that in the groups of patients with PCa and people without cancer, there is a positive correlation between the expression of Aurora A and Aurora B genes, as found in tissue samples, while the expression of *BRAF* in patients with PCa strongly correlates with the expression of the *AURKC*, and in the urine cells of people without cancer - with the expression of *AURKA* and *AURKB*.

The results of bioinformatics analysis using various algorithms and databases revealed that PANDAR lncRNA can interact with a number of miRNAs involved in the regulation of oncogene expression. In the LNCaP cell line, the level of PANDAR in cells was the highest among other cell lines, while the lowest relative expression of PANDAR was in PC3 cells, which, at the same time, demonstrated the highest levels of circulation PANDAR in the conditioned medium of these cells. We did not find a statistically significant difference in the levels of PANDAR lncRNA in the cell-free urine of patients with PCa and relatively healthy individuals. When analyzing the levels of PANDAR lncRNA in the urine of patients with bladder cancer, we found a statistically significant difference between cancer patients and relatively healthy individuals. After performing ROC analysis, we found that the area under the ROC curve was 0.7803, $p = 0.0053$.

After analyzing the correlation of Aurora kinase genes expression in urine cells and PANDAR lncRNA levels in cell-free urine of the same patients, we found positive correlations between PANDAR levels and *AURKC* and *BRAF* expression in cells from these samples.

For patients with bladder cancer, we hypothesized that by adding PANDAR levels to methylation-based markers, we could obtain better results than for each alone. Indeed, simple logistic regression analysis and ROC analysis have made it possible to distinguish bladder cancer patients from cancer-free individuals quite accurately by combining these two types of potential markers.

Thus, changes in the methylation of tumor suppressor genes studied in this work may constitute potential marker panels for the diagnosis of prostate and bladder cancers; Increased expression of *AURKA* in urinary cells may be a prognostic marker for PCa, while the role of expression of other kinases genes, as well as levels of PANDAR lncRNA for the diagnosis of PCa requires further study. The combination of PANDAR levels and markers based on DNA methylation for bladder cancer makes it possible to effectively distinguish patients with bladder cancer from individuals without cancer.

Key words: methylation of promoters, kinases of the Aurora family, BRAF, liquid biopsies, PANDAR lncRNA, prostate cancer, bladder cancer.

List of scientific publications published on the topic of the dissertation:

1. Mankovska OS, Korsakova AS, Cherniavskiy KR, Kononenko OA, Stakhovskyy EO, Bondarenko YuM, Kashuba VI, Gerashchenko GV Methylation pattern of tumor-suppressor gene promoters as putative noninvasive diagnostic markers for prostate cancer. *Biopolymers and Cell*. 2021; 37(1):23-32.

2. Mankovska O, Gerashchenko G, Rozenberg E, Stakhovsky E, Kononenko O, Bondarenko Yu, Kashuba V. Analysis of Aurora kinases genes expression points on their distinct roles in prostate cancer development. *Ukr.Biochem.J* .2019;91(6):15-26.

3. 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. *Biopolymers and Cell*.2017; 33(5): 335-55.

4. Mankovska O, Asatryan O, Vikarchuk M, Kononenko O, Stakhovsky E, Kashuba V. Identification of gene expression of kinases Aurora A, Aurora B, Aurora C, BRAF and EGFR in samples of urine from patients with prostate cancer. *NaUKMA Research Papers. Biology and Ecology*.2016;184:16-23.

5. Mankovska O, Skrypnikova O, Panasenko G, Kononenko O, Vikarchuk M, Stakhovskyy E, Kashuba V. Detection of methylation of *VIM*, *TMEFF2* and *GDF15* in the urine of patients with bladder cancer in Ukrainian population. *NaUKMA Research Papers. Biology and Ecology*.2016;184:23-29.

6. Mankovska O.S., Cherniavskiy K.R., Savitskyy A.L., Semko S.L., Grechko B.O., Bondarenko Yu.M., Kashuba V.I. Epigenetic markers of bladder cancer: can we distinguish cancer from non-cancerous inflammation using urine as source of DNA? // *Науково-практичний журнал ОНКОЛОГИЯ*. - Т. 21. - № 3. - 2019. - с. 268.

7. Mankovska O.S., Kashuba V. I. Differential expression of Aurora kinases' genes in prostate cancer and prostate adenoma samples points on possibility of their distinct roles in prostate cancer development. // *Матеріали конференції молодих вчених “Фундаментальна медицина: інтегральні підходи до терапії хворих з онкопатологією”*, 4-5 лютого, 2019 р., Київ, Україна. *Науково-практичний журнал ОНКОЛОГИЯ*. - Т. 21. - № 3. - 2019. -с.77.

8. Asatryan O. E., Mankovska O.S., Kashuba V. I. Changes in expression of oncogenes and methylation of tumor suppressor genes in urine from patients with prostate cancer. // *Biopolymers and Cell. Materials of XII annual Conference of Young Scientists Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine*. - 2018. - Vol. 34. (2). - P 143.

9. Skrypnikova O. S., Mankovska O.S., Kashuba V. I. Detection of methylation of tumor suppressor genes and identification of expression profile of non-coding rnas in samples of urine from patients with bladder cancer. // *Biopolymers and Cell. Materials of XII annual Conference of Young Scientists Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine*.- 2018. - Vol. 34. (2). – P. 155.

10. Mankovska O., Panasenko G, Kashuba V. BRAF mutation and hypermethylation of RASSF1A, GSTP and RARbeta2 in prostate cancer patients // European Journal of Human Genetics, - 2018. - V26. - 1001-2 pp.

11. Mankovska O., Kashuba V. Identification of novel molecular and genetic markers for early detection of epithelial tumours and prognosis of the course of the disease // Exp. Oncol. Materials of mini-symposium “New Trends in Cancer Research and Innovative Tumor Vaccines” – 2017. V 39, 2. – P.158.

12. Mankovska O.S., Asatryan O. E., Vikarchuk M.V., Kononenko O. A., Stakhovsky E. O., Kashuba V. Expression of AURORA C Kinase Gene Correlates with BRAF Gene Expression in Samples of Patients with Prostate and Thyroid Cancer. // The 12th International Congress of Cell Biology July 21-25 2016, Prague, Czech Republic. Abstract book. – 2016.

13. Mankovska O.S., Asatryan O. E., Vikarchuk M.V., Kononenko O. A., Stakhovsky E. O., Kashuba V. I. Aurora A, Aurora B, Aurora C and BRAF kinases gene expression in samples of urine from patients with prostate cancer // FEBS JOURNAL – 283. – P. 368.

14. Mankovska O.S., Skrypnikova O.S., Panasenko G.V., Slivka U.S., Vikarchuk M.V., Kononenko O.A., Stakhovskyy E.O., Kashuba V.I. Characterization of methylated VIM, TMEFF2 and GDF as potential set of epigenetic markers for bladder cancer. // Exp Oncol. Materials of International scientific conference “Integrated Clinical and Pathogenetic Approaches in Diagnosis and Therapy of Cancer. 2016. – 38 (2). - 128–140 pp.

15. Mankovska O.S., Skrypnikova O.S., Panasenko G.V., Vikarchuk M.V, Stakhovskyy O.E., Pikul M.V., Kashuba V.I. Detection of new epigenetic and prognostic markers in the urine of patients with bladder cancer // Ukrainian journal of radiology. – Supplement 1. – 2016. – XIII Congress of Oncologists and Radiologists of Ukraine May 26-28, 2016, Kyiv (congress materials). - p.114.

16. Panasenko GV, Mankovskaya OS, Vikarchuk MV, Nekrasov KA, Kondratov OG, Kashuba VI, Stakhovsky EO, Kononenko OA Panel of nucleic markers for detection and differentiation of carcinoma of the kidney, prostate and bladder in the urine of patients. // Scientific and practical journal "Oncology", 2015. - Vol. 17, № 3.-p.65.

17. Mankovskaya OS, Panasenko GV, Kashuba VI, Stakhovsky EO, Nekrasov KA, Kononenko AA Kondratov AG Panel of nucleic markers for the detection and differentiation of carcinoma of the kidney, prostate and bladder in the urine of patients. Abstract book "Science, Technology and Innovative Technologies in the prosperous epoch of the Powerful State" Abstracts of papers of the International Scientific Conference. June.11-13, 2015, Ashgabat. - 2015 - p. 265.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	25
ВСТУП.....	27
Розділ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	35
1.1. Загальна характеристика, особливості діагностики та типові молекулярно-генетичні порушення при раку передміхурової залози.....	35
1.2. Загальна характеристика, діагностика та молекулярно-генетичні особливості раку сечового міхура	39
1.3. Неінвазивна діагностика пухлин на основі рідинних біопсій.....	41
1.3.1. Рідинні біопсії, їх різновиди і використання.....	41
1.3.2. Рідинні біопсії у діагностиці раку передміхурової залози та сечового міхура.....	44
1.4. Метилування ДНК.....	47
1.4.1. Метилування промоторів та його роль у регуляції експресії генів.....	47
1.4.2. Метилування промоторів онкоасоційованих генів при канцерогенезі.....	49
1.5. Кінази родини Аврора, їх фізіологічні функції та участь у канцерогенезі.....	59
1.6. Функціональні характеристики довгої некодуєчої РНК PANDAR та її роль у канцерогенезі.....	60

Розділ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	63
2.1. Хімічні реактиви та реагенти.....	63
2.2. Біологічні матеріали.....	63
2.2.1 Клітинні лінії.....	63
2.2.2. Зразки пухлин сечового міхура та передміхурової залози.....	63
2.2.3. Зразки сечі пацієнтів та умовно здорових донорів.....	64
2.3. Культивування клітинних ліній.....	65
2.4. Первинна обробка зразків.....	66
2.4.1. Отримання кондиційованого середовища культивованих клітин.....	66
2.4.2. Первинна обробка сечі.....	66
2.5. Виділення ДНК.....	67
2.5.1. Виділення пкДНК.....	67
2.5.2. Виділення геномної ДНК.....	68
2.6. Виділення РНК.....	68
2.6.1. Попередня підготовка зразків.....	68
2.6.2. Виділення РНК.....	68
2.7. Синтез першого ланцюга кДНК.....	69
2.8. Кількісна ПЛР у реальному часі.....	69
2.9. Бісульфітна обробка ДНК.....	70
2.10. Створення повністю метильованої ДНК.....	72

2.11. Метил-специфічна ПЛР (МСП).....	72
2.11.1. Дизайн праймерів для МСП.....	72
2.11.2. Умови проведення МСП.....	73
2.12. Електрофорез в агарозному гелі.....	76
2.13. Кількісна метил-специфічна ПЛР.....	76
2.14. Методи біоінформатичного аналізу.....	77
2.15. Методи статистичної обробки.....	79
Розділ 3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА.....	81
3.1. Метилування потенційних генів-онкосупресорів у клінічних зразках пацієнтів та клітинних лініях раку передміхурової залози.....	81
3.1.1. Метилування VIM, PTEN, RASSF1A, NKX3.1, KRT18 і CDH1 у клітинних лініях раку та у тканинах раку передміхурової залози.....	81
3.1.1.1. Метилування промоторів генів PTEN, CDH1, NKX3.1 і KRT18, RASSF1A і VIM у клітинних лініях раку передміхурової залози.....	81
3.1.1.2. Метилування промоторів генів в тканинах раку передміхурової залози.....	83
3.1.1.3. Різниця у відносному рівні метилування між пухлиною та парними умовно нормальними тканинами.....	83
3.1.1.4. Кореляція відносних рівнів метилування досліджуваних генів між пухлиною, парними умовно нормальними тканинами, експресією генів та клініко-патологічними характеристиками.....	84

3.1.1.5. Різниця в патерні метилювання між TMPRSS2:ERG позитивними та негативними аденокарциномами.....	88
3.1.2. Метилювання <i>PTEN, RASSF1A, NKX3.1, KRT18, CDH1</i> та <i>GDF15</i> у сечі пацієнтів з раком передміхурової залози.....	90
3.1.2.1. Якісна оцінка метилювання промоторів досліджуваних genaх у позаклітинній ДНК із зразків сечі.....	90
3.1.2.2. Аналіз комбінації потенційних маркерів для діагностики РПЗ на основі наявності метилювання промоторів досліджуваних генів у сечі.....	92
3.2. Метилювання <i>VIM, TMEFF2, NKX3.1, MYO3A</i> та <i>GDF15</i> у сечі пацієнтів з раком сечового міхура.	97
3.3. Відносна експресія генів кіназ родини Aurora та кінази BRAF у клітинних лініях і клінічних зразках раку передміхурової залози.....	107
3.3.1. Відносна експресія генів кіназ родини Aurora у клітинних лініях РПЗ.....	107
3.3.2. Відносна експресія кіназ родини Aurora в аденокарциномах та суміжних нормальних тканинах пацієнтів, хворих на РПЗ.....	108
3.3.3. Відносна експресія кіназ родини Aurora і кінази BRAF у клітинах, осаджених з сечі хворих на рак передміхурової залози.....	114
3.3.3.1. Рівні відносної експресії кіназ родини Aurora та кінази BRAF у клітинах, осаджених з сечі пацієнтів та умовно здорових донорів.....	114
3.3.3.2. Кореляційний аналіз досліджуваних генів та клініко-патологічних характеристик пацієнтів.....	118
3.4. Дослідження можливої участі довгої некодуючої РНК PANDAR у канцерогенезі передміхурової залози та сечового міхура.....	122

3.4.1. Біоінформатичний аналіз взаємодії довгої некодуєчої РНК PANDAR з мікроРНК та генами, асоційованими з раком передміхурової залози та сечового міхура.....	122
3.4.1.1. Визначення мікро РНК, які відіграють роль у розвитку раку сечового міхура та передміхурової залози.....	122
3.4.1.2. Визначені взаємодії передбачених мікроРНК та генів за допомогою алгоритму DIANAtools.....	124
3.4.1.3 Визначені взаємодії передбачених мікро РНК та генів за допомогою алгоритму ToppMiR.....	126
3.4.1.4. Визначені взаємодії передбачених мікро РНК та генів за допомогою алгоритму miRNet.....	126
3.4.1.5. Визначення генів, експресія яких регулюється передбаченими мікро РНК.....	127
3.4.2. Відносна експресія довгої некодуєчої РНК PANDAR у клітинних лініях раку передміхурової залози та її відносні рівні у кондиційованому середовищі клітинних ліній та у сечі пацієнтів, хворих на рак передміхурової залози.....	127
3.4.2.1. Експресія довгої некодуєчої РНК PANDAR у клітинних лініях раку передміхурової залози та їх живильному середовищі.....	128
3.4.2.2. Рівні днРНК PANDAR у сечі пацієнтів з раком передміхурової залози.....	129
3.4.3. Експресія довгої некодуєчої РНК PANDAR у тканинах пухлин та прилеглих нормальних тканинах та її відносні рівні у сечі пацієнтів з раком сечового міхура.....	132

3.4.3.1. Експресія днРНК PANDAR у тканинах пацієнтів, хворих на рак сечового міхура.....	133
3.4.3.2. Визначення відносних рівнів довгої некодуючої РНК PANDAR у сечі хворих на рак сечового міхура.....	135
3.4.3.3. Порівняння відносних рівнів довгої некодуючої РНК PANDAR у сечі пацієнтів з раком передміхурової залози і сечі пацієнтів з раком сечового міхура.....	139
3.5. Поєднання кількісних та якісних характеристик нуклеїнових кислот, отриманих з сечі пацієнтів з раком передміхурової залози та сечового міхура для неінвазивної діагностики цих захворювань.....	141
3.5.1. Позаклітинні ДНК та РНК і мРНК з клітин у сечі хворих на рак передміхурової залози.....	142
3.5.2. Метилування генів-онкосупресорів та відносні рівні днРНК PANDAR при раку сечового міхура.....	143
Розділ 4 АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ ОДЕРЖАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ.....	146
ВИСНОВКИ.....	160
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	164
ДОДАТОК А.....	184
ДОДАТОК Б.....	188
ДОДАТОК В.....	192

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

А – аденоми передміхурової залози

BE- відносна експресія генів

ВООЗ – Всесвітня організація охорони здоров'я

ГТ – гібридний транскрипт

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота

днРНК – довга некодуюча РНК

ЕМП – епітелійно-мезенхімний перехід

кДНК – комплентарна ДНК

кПЛР – кількісна ПЛР

КПХ – клініко-патологічні характеристики

мРНК – матрична РНК

МСП – метил-специфічна ПЛР

П – пухлини (аденокарциноми ПЗ)

ПЛР – полімерзано-ланцюгова реакція

ПСА – простато-специфічний антиген

РНК – рибонуклеїнова кислота

РПЗ – рак передміхурової залози

РСМ – рак сечового міхура

СГ – сума за шкалою (ступінь) Глісона

УНТ – умовно-нормальні тканини

п.н. – пари нуклеотидів

OR – (Odds Ratio) рівень шансів

ТВЕ – трис-боратний буфер

ТЕ – трис-ЕДТА розчин

CIN – хромосомна нестабільність

CNV – варіації кількості копій ДНК

МІВС – інвазивний рак сечового міхура (Muscle Invasive Bladder Cancer)

MSI – мікросателітна нестабільність

NMIBC – поверхневий рак сечового міхуро (Non-Muscle Invasive Bladder Cancer)

PCAG – гени, пов'язані з раком передміхурової залози

ВСТУП

Актуальність теми. На сьогодні онкологічні захворювання є одними з найпоширеніших патологій у світі і відзначаються як великою кількістю нових випадків, так і високим рівнем смертності. За оцінками бази GLOBOCAN у 2018 році у всьому світі виникло 18,1 мільйон нових випадків раку і налічувалось 9,6 мільйонів смертей від різноманітних онкологічних захворювань [1].

Рак передміхурові залози є одним з найчисленніших за поширенням типом злоякісних новоутворень у Європі, США та Канаді. Цей тип раку складає приблизно 14 % усіх випадків злоякісних пухлин серед чоловіків. Рак сечового міхура посідає десяте місце серед найбільш поширених злоякісних захворювань у світі з 573 278 нових випадків та 212 536 смертельних випадків щороку [2]. Хоч більшість пацієнтів (70-80%) з неінвазивним раком сечового міхура мають хороший прогноз, проте цей тип раку часто може переходити у інвазивну форму, для якої 5-річна виживаність складає всього 10-50% залежно від стадії пухлини та методу лікування [3].

Наразі в усьому світі проводиться величезна кількість досліджень для виявлення причин та механізмів появи пухлин різних типів. Крім того, велику увагу приділяють діагностиці та лікуванню злоякісних пухлин.

Відомо, що ракові клітини характеризуються порушеннями у процесах поділу і проліферації. Серин-треонінові кінази родини Aurora відіграють ключову роль у процесах, залучених у клітинному поділі, серед яких подвоєння centrosом, формування веретена поділу, прикріплення хромосом до веретена та сегрегація сестринських хроматид [4]. Порушення у вище зазначених процесах можуть призвести до злоякісної трансформації клітини. Наразі було описано низку типів пухлин, у яких

спостерігали порушення експресії генів, продуктом яких є білки родини Aurora [5]. У зв'язку з цим їх гени є потенційними онкогенами, а їх білкові продукти можуть бути мішенями для таргетної терапії, тож дослідження їх ролі у канцерогенезі різних типів пухлин є, безумовно, актуальним.

Епігенетичні зміни, такі як метилювання ДНК, часто спостерігаються в пухлинах різної типу. Дійсно, було показано, що метилювання генів-онкосупресорів сприяє розвитку різних видів раку, включаючи рак сечового міхура і передміхурової залози. Метилювання ДНК відбувається в CpG-острівцях, які часто лежать у промоторному регіоні генів. Метилювання у промоторах генів-онкосупресорів негативно впливає на експресію таких генів і може бути ініціюючою подією або сприяти промоції злоякісної пухлини [6]. Такі епігенетичні модифікації ДНК можуть слугувати корисними біомаркерами для діагностичних та прогностичних цілей. Тому протягом двох останніх десятиліть ведеться активний пошук маркерів на основі метилювання генів онкосупресорів, які могли б допомогти у виявленні низки пухлин, зокрема раку передміхурової залози та раку сечового міхура.

Довгі некодуючі РНК також часто мають властивості онкогенів. Наприклад, для раку передміхурової залози вже доведеним онкогеном є довга некодуюча РНК PCA3 [7]. Роль багатьох некодуючих РНК, зокрема довгої некодуючої РНК PANDAR, яка є кандидатом у біомаркери деяких видів раку, в тому числі й раку сечового міхура [8], відома не до кінця. Переважна більшість досліджень експресії гену PANDAR були виконані на клітинних лініях або зразках пухлинних тканин пацієнтів [9], що не дає повного розуміння того, чи можна використовувати отримані дані для ранньої діагностики, моніторингу стану хворого або для прогнозу розвитку захворювання.

В останні роки все більше досліджень присвячені вивченню можливості діагностики різноманітних захворювань, в тому числі

онкологічних, на основі біомаркерів, що циркулюють у біологічних рідинах організму. Такий підхід, в першу чергу, є неінвазивним, що робить можливим проводити такі аналізи у осіб без будь-яких симптомів, а значить, придатний до використання для ранньої діагностики і скринінгу населення. Неінвазивність також нівелює ризик пошкодити уже наявну пухлину, що іноді відбувається під час голкової біопсії, провокує потрапляння пухлинних клітин у кров і може бути причиною виникнення віддалених метастазів [10]. Також рідинні біопсії є придатними для моніторингу стану хворого, в тому числі після операції і протягом лікування, і можуть нести інформацію як про відповідь на терапію, так і про ризики рецидиву захворювання [11]. Найбільш інформативним для різних захворювань є той тип біологічної рідини, яка контактує з ураженим органом або знаходиться у безпосередній близькості до нього. Зокрема, для пухлин сечостатевої системи такою біологічною рідиною є сеча.

Усі з перелічених вище типів потенційних біологічних маркерів можуть бути виявлені у рідинних біопсіях. Таким чином, розробка цієї проблеми і знаходження найкращих комбінацій маркерів, асоційованих з пухлиною, є актуальною проблемою для неінвазивної діагностики і прогнозування онкологічних захворювань.

Зв'язок з науковими програмами, планами, темами. Робота виконана у відповідності до науково-дослідних тем відділу молекулярної онкогенетики Інституту молекулярної біології і генетики НАН України. У роботу включені наукові результати, які отримані автором під час виконання проекту УНТЦ № 6056 «Набір нуклеїнових маркерів для виявлення та диференціювання злоякісних пухлин сечостатевої системи» (2014-2015 рр.), програми «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) та в рамках 5-річної бюджетної тематики відділу «Ідентифікація нових біомаркерів для діагностики злоякісних новоутворень та розробка підходів до генотерапії пухлин у модельних системах» (I кв.2016 –IV кв. 2020 рр.).

Мета та завдання дослідження. Метою роботи було виявлення маркерних для раку передміхурової залози та сечового міхура епігенетичних та експресійних змін у тканинах та біологічних рідинах хворих та оцінка можливості їх використання для неінвазивної діагностики цих захворювань. Для досягнення мети нами було сформульовано наступні завдання:

1. Створити колекцію клінічних зразків аденокарцином та парних умовно нормальних тканин, зразків сечі пацієнтів з раком сечового міхура (PCM) та передміхурової залози (РПЗ), пацієнтів із запаленням сечостатевої системи та здорових донорів та провести біоінформаційний відбір низки білок кодуєчих генів й генів некодуєчих РНК і дослідити рівні відносної експресії генів епітелійно-мезенхімного переходу для виявлення змін у пухлинах для пошуку потенційних експресійних та епігенетичних маркерів.

2. Провести якісний та кількісний аналіз метилювання пухлино асоційованих генів: *VIM*, *PTEN*, *RASSF1A*, *NKX3.1*, *KRT18*, *CDH1* та *GDF15* у клітинних лініях раку передміхурової залози та тканинах аденокарцином і парних прилеглих нормальних тканинах та зразках сечі пацієнтів з раком передміхурової залози, запальними захворюваннями сечостатевої системи та здорових донорів.

3. Провести якісний аналіз метилювання генів-онкосупресорів *VIM*, *TMEFF2*, *RASSF1A*, *NKX3.1*, *MYO3A* та *GDF15* у сечі пацієнтів з раком сечового міхура, запальними захворюваннями сечостатевої системи та здорових донорів.

4. Проаналізувати відносну експресію генів кінази родини Aurora та кінази BRAF у клітинних лініях та клінічних зразках раку передміхурової залози.

5. Провести біоінформатичний аналіз можливої участі днРНК PANDAR у канцерогенезі раку сечового міхура і передміхурової залози шляхом регуляції мікроРНК і проаналізувати відносну експресію довгої некодуючої РНК PANDAR у тканинах раку сечового міхура і клітинних лініях раку передміхурової залози.

6. Дослідити відносні рівні довгої некодуючої РНК PANDAR у безклітинній сечі пацієнтів з раком передміхурової залози та сечового міхура і в кондиційованому середовищі клітин РПЗ.

7. Оцінити комбінації потенційних маркерів для неінвазивної діагностики раку передміхурової залози та раку сечового міхура на основі кількісних та якісних характеристик наявних у сечі нуклеїнових кислот.

Об'єкт дослідження – рак сечового міхура та рак передміхурової залози.

Предмет дослідження – експресійні та епігенетичні зміни та можливість їх визначення у сечі пацієнтів при раку сечового міхура та раку передміхурової залози.

Методи дослідження: у дослідженні використовувались молекулярно-біологічні методи, а саме методи виділення ДНК та РНК, синтезу кДНК і кількісної ПЛР у реальному часі, бісульфітної обробки ДНК, метил-специфічна та кількісна метил-специфічна ПЛР. Також застосовувались методи культивування еукаріотичних клітин, біоінформаційні та біоінформатичні методи по роботі з базами даних і методи статистичної обробки.

Наукова новизна одержаних результатів. У дисертаційній роботі Маньковської О.С. було запропоновано нові набори потенційних маркерів раку сечового міхура та раку передміхурової залози на основі

метилування генів-онкосупресорів, які здатні відрізнити осіб з раком від пацієнтів без онкологічних захворювань.

У даній роботі було виявлено раніше не відомі кореляційні зв'язки між експресією генів кінази родини Auroga та низкою інших генів у тканинах пацієнтів з раком передміхурової залози. Вперше у клітинах сечі пацієнтів з раком передміхурової залози було ідентифіковано експресію генів кінази родини Auroga і кінази BRAF і оцінено їх здатність відрізнити хворих на РПЗ і здорових осіб. Також було вперше виявлено наявність кореляції експресії генів кінази Auroga C і кінази BRAF у клітинах сечі пацієнтів з раком передміхурової залози на фоні відсутності її у осіб без онкологічних захворювань.

Вперше було проведено пошук і виявлено низку мікроРНК, які потенційно можуть зв'язуватись з довгою некодуючою РНК PANDAR, зокрема для тих, для яких доведено онкосупресорну роль при канцерогенезі передміхурової залози та сечового міхура. Вперше було визначено рівні довгої некодуючої РНК PANDAR у кондиційованому середовищі клітинних ліній раку передміхурової залози, порівняно з експресією в клітинах і виявлено, що існує різниця як в експресії цієї довгої некодуючої в клітинах, так і у її рівнях у кондиційованому середовищі цих клітин. Вперше було визначено рівні довгої некодуючої РНК PANDAR у безклітинній сечі пацієнтів, хворих на рак передміхурової залози та сечового міхура і виявлено, що на основі її рівнів можна відрізнити хворих на рак сечового міхура від здорових осіб.

Вперше було проаналізовано і знайдено низку статистично достовірних зв'язків між різними потенційними маркерами досліджуваних пухлин. Було запропоновано сформуванню новий набір для виявлення раку сечового міхура на основі поєднання визначення метилування генів і рівнів позаклітинної довгої некодуючої РНК PANDAR.

Практичне значення одержаних результатів. Результати роботи надають можливість широкого спектру подальших досліджень, пов'язаних як з поглибленням знань щодо ролі знайдених потенційних маркерів у розвитку раку передміхурової залози і сечового міхура і, таким чином, кращого розуміння розвитку цих захворювань, так і для подальшого дослідження їх як маркерів і створення ефективних діагностичних та прогностичних маркерних систем для раку передміхурової залози та раку сечового міхура. Дисертаційні матеріали використовуються в навчальному процесі на кафедрі біології НаУКМА у рамках курсу «Механізми онкогенезу», який викладає автор роботи.

Особистий внесок здобувача. Дисертант безпосередньо брав участь в отриманні всіх результатів, представлених у дисертації. Планування роботи та аналіз і графічне представлення результатів з визначення експресії генів кінази родини Auroga та кількісного визначення метилювання генів у тканинах раку передміхурової залози виконувалось спільно з д.б.н., пров.н.с. Геращенко Г.В. У роботі були використані кДНК з РНК з тканин РПЗ, синтезована Розенберг Е.Е., а також ДНК, виділена з тканин РПЗ Мевс Л.В. Забір та обробка клінічних зразків, виділення нуклеїнових кислот з матеріалу, отриманого з сечі пацієнтів, синтез кДНК, метил-специфічна ПЛР, ПЛР, кількісна ПЛР, біоінформатичний аналіз виконувались дисертантом за участі студентів Національного університету «Києво-Могилянська академія» та ННЦ «Інститут біології та медицини» КНУ ім. Тараса Шевченка Асатрян О.Е., Скрипнікової О.С., Корсакової А.С., Чернявського К.Р., Савицького А.Л., а також пров.інж. Росохацької І.В. Культивування клітин, біоінформаційний пошук, статистичний аналіз даних, отриманих на матеріалі з рідинних біопсій, виконувались дисертантом особисто. Аналіз та обговорення результатів проводилися спільно з науковим керівником, д.б.н., проф. Кашубою В.І.

Автор висловлює подяку співробітникам Відділення пластичної та реконструктивної онкоурології Національного інституту раку НАМН України та відділів онкоурології та відновної урології і новітніх технологій ДУ «Інститут урології» НАМН України за постачання клінічних зразків і надання клініко-патологічних характеристик пацієнтів.

Апробація результатів дисертації. Результати були апробовані на українських та міжнародних конференціях: «Інноваційні технології скринінгу, діагностики та персоналізованої терапії раку» (Київ, Україна, 2019), Конференція молодих вчених “Фундаментальна медицина: інтегральні підходи до терапії хворих з онкопатологією” (Київ, Україна, 2019 р.), XII annual Conference of Young Scientists Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine (Kyiv, Ukraine, 2018), Міні-симпозіум “New Trends in Cancer Research and Innovative Tumor Vaccines” , (Київ, Україна, 2018), The 12th International Congress of Cell Biology (Prague, Czech Republic, 2016), International scientific conference “Integrated Clinical and Pathogenetic Approaches in Diagnosis and Therapy of Cancer (Kyiv, Ukraine, 2016), XIII з’їзд онкологів і радіологів України (Київ, 2016 р.).

Публікації. За результатами дослідження опубліковано 17 наукових праць – 5 наукових статей у фахових виданнях (з них 3 у виданнях, що входять до міжнародних наукометричних баз даних) та 12 матеріалів і тез доповідей на наукових конференціях.

Структура і обсяг роботи. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, експериментальної частини, узагальнення одержаних результатів, висновків, списку використаних джерел, додатків. Загальний обсяг дисертації – 192 сторінки. Робота містить 32 рисунка, 20 таблиць. Список використаної літератури охоплює 171 джерело.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Загальна характеристика, особливості діагностики та типові молекулярно-генетичні порушення при раку передміхурової залози

Рак передміхурової залози (РПЗ) є одним із найбільш поширених онкологічних захворювань у світі, посідаючи друге місце після раку легень серед чоловічого населення (рис. 1.1). За статистикою в Україні за 2020 рік було виявлено 11 361 новий випадок РПЗ, померло 4 219 осіб [2].



Рис. 1.1. Діаграма розподілу нових випадків онкологічних захворювань у світі серед чоловіків [2]

Більшість (70-75%) злоякісних новоутворень у передміхуровій залозі виникають у периферійній ділянці органу, близько 15% - у його центральній частині і 10-15% у перехідній зоні передміхурової залози. РПЗ може поширюватись локально, напряду інвазувати у сім'яні протоки та утворювати віддалені метастази, передусім у кістках, поширюючись через лімфатичну або кровоносну систему [12].

Перші симптоми РПЗ найчастіше починають проявлятися на етапі інвазії пухлини в сусідні тканини і навіть на стадії утворення віддалених метастазів. Тож на ранній стадії розвитку цього захворювання, коли лікування є найбільш ефективним, його можливо виявити виключно з використанням певних молекулярних тестів. На другій стадії збільшену у розмірах пухлину вже можна виявити під час обстеження при пальпації передміхурової залози. Подальший розвиток пухлини супроводжується інвазуванням у сусідні тканини і з'являється ризик утворення метастазів [13].

У останні десятиліття єдиним широко розповсюдженим маркером РПЗ, який використовувався для скринінгу населення, був простато-специфічний антиген (ПСА). Виділений і описаний у 1979 році Wang зі співавторами з нормальних та патологічних тканин передміхурової залози, цей органоспецифічний протеїн у 1986 році був затверджений USA Food and Drug Administration (FDA) як маркер для моніторингу раку передміхурової залози, а у 1994 ПСА офіційно було затверджено як маркер для виявлення раку передміхурової залози у чоловіків, старших за 50 років [14,15]. Проте аналіз ПСА зовсім непридатний для визначення прогресії раку передміхурової залози і клінічного прогнозування даного захворювання. Більше того, за його результатами неможливо відрізнити випадки небезпечного для життя стану хворого і потреби у негайному радикальному лікуванні. Специфічність ПСА як маркера РПЗ є досить низькою, наприклад, рівень ПСА від 4 до 10 нг/мл має позитивне

прогностичне значення всього 25-40%. Підвищення рівня ПСА у сироватці крові виявляються так само про аденомі передміхурової залози та при простатитах. Таким чином, роль ПСА як засобу скринінгу викликає низку запитань, як у зв'язку з псевдонегативними, так і у зв'язку з псевдопозитивними результатами, що призводить до неможливості точно оцінити стан та діагноз пацієнта і призначити йому оптимальне лікування [16].

Прогнозування перебігу захворювання можна робити за цінкою певних характеристик пухлинної тканини. Гістологічне дослідження раку передміхурової залози, як і інших солідних пухлин, має фундаментальне значення для оцінки ступеня розвитку пухлини та прогнозування. На сьогодні загальноприйнятим методом такого аналізу для РПЗ є оцінка за шкалою Глісона, що залишається основним методом, який застосовується у клініці для прогнозування перебігу РПЗ. Система оцінювання Глісона являє собою бальну систему, яка визначає, наскільки зразок біопсії передміхурової залози є гістологічно подібним до нормальної тканини цього органу. У випадку високої подібності клітин біопсії до нормальних такий зразок за шкалою Глісона отримує низький бал (1 відповідає нормальності) якщо ж клітини за морфологією сильно відрізняються від норми, пухлина отримує високу оцінку (найвища оцінка 5, що відповідає відсутності нормальних залоз та наявності шарів відверто аномальних пухлинних клітин); між цими двома крайніми класами існують проміжні ступені, що лежать в основі прогресуючого переходу від нормальної тканинної архітектури до втрати тканинних залоз і до набуття клітинної атипії [17]. При цьому загальний бал за системою Глісона формується як сума двох найпоширеніших у зразку патернів. Ця система оцінки мала та має безпрецедентне значення в клінічній оцінці пацієнта з неоплазією передміхурової залози [18].

Рак передміхурової залози відзначається своєю гетерогенністю і мультифокальністю, які обумовлені, зокрема, гетерогенністю самого органу, тож проблема його молекулярного типування і визначення певних ключових молекулярно-генетичних порушень, що призводять до розвитку РПЗ, залишається до кінця не вирішеною [19].

Ранні дослідження, які ставили на меті визначити молекулярно-генетичні зміни при РПЗ, зазначали високий рівень гетерогенності тканин аденокарциноми передміхурової залози і на молекулярно-генетичному рівні. Проте їх висновки були обмежені невеликою кількістю досліджуваних маркерів. Згодом було відкрито специфічний для РПЗ гібридний транскрипт Tmprss2-ERG, і його присутність як на ранніх, так і на пізніх стадіях захворювання наштовхнуло на думку про те, що утворення цього злиття є ранньою подією при канцерогенезі передміхурової залози [20-22].

Дослідницька мережа TCGA провела комплексну молекулярну характеристику 333 первинних пухлин передміхурової залози, включаючи дані про соматичні мутації, гібридні гени, малі зміни кількості копій, експресію генів та метилювання ДНК [23]. Серед досліджених пухлин 75% вдалося розділити на сім підтипів, що характеризувались або конкретними типами гібридних генів – членів родини транскрипційних факторів ETS (ERG, ETV1, ETV4 та FLI1), або мутаціями (*SPOP*, *FOXA1* та *IDH1*). Крім того, для пухлин передміхурової залози, що несли гібридні гени (59% усіх випадків), була характерна делеція гена-онкосупресора *PTEN*. Підгрупа з мутантним геном *SPOP* (11% усіх випадків), мала різні профілі за варіацією кількості копій генів (включаючи делеції *CHD1*, 6q та 2q). Було виявлено, що підгрупа з мутацією *SPOP* і одночасною делецією *CHD1* мала високі рівні метилювання ДНК, та часто надмірну експресію мРНК *SPINK1*.

Загалом, соматичні точкові мутації рідше зустрічаються при РПЗ, ніж у більшості інших солідних пухлин. Найчастіше для РПЗ спостерігаються варіації кількості копій ДНК (CNV). У той час як пухлини на ранніх стадіях і високодиференційовані пухлини мають відносно невелику кількість таких змін, більш агресивні первинні та метастатичні пухлини мають велике поширення CNV у всьому їх геномі [24]. Величезна кількість хромосомних перебудов, що призводять до великих інсерцій, делецій, дуплікацій, транслокацій та утворення аберантних гібридних генів, є звичайними явищами під час прогресування раку передміхурової залози [25].

1.2. Загальна характеристика, діагностика та молекулярно-генетичні особливості раку сечового міхура

Рак сечового міхура (PCM) є одним із найбільш поширених онкопатологій у світі. Він посідає 6 місце серед найпоширеніших онкологічних захворювань серед чоловіків і 17 серед жінок [26]. Більше того, захворюваність на рак сечового міхура у чоловіків у 3-4 рази вища, ніж у жінок.

Найпоширенішою формою раку сечового міхура є перехідноклітинний рак (що розвивається з перехідного епітелію сечових шляхів), більш рідко зустрічаються поверхневий рак і аденокарцинома (пухлина, яка походить з клітин залозистого епітелію). Розрізняють поверхневий рак сечового міхура (NMIBC) і рак, який інвазує м'язовий шар і навколишні тканини (MIBC) (рис 1.2). До патологічних стадій поверхневого раку сечового міхура належать Ta (сосочковий), T1 (інфільтраційний) та карцинома *in situ*. Серед пацієнтів 70% випадків мають Ta, T1 - приблизно 20%, а карцинома *in situ* спостерігається у близько 10% хворих. MIBC відомий як інвазивний рак сечового міхура;

його патологічні стадії включають T2, T3 і T4 (рис 1.2). До 80% пацієнтів з NMIBC рецидивують протягом 5 років. Важливим фактом є те, що тільки близько 30% пацієнтів з Ta через певний час розвивають MIBC, тоді як у хворих на неінвазивний рак сечового міхура, що класифікується як T1 та карцинома *in situ* інвазивний рак розвивається частіше. У результаті близько 25% вперше діагностованого раку сечового міхура – це інвазивний рак, і серед них на час діагнозу 50% пацієнтів має віддалені метастази [27]. Таким чином, рання діагностика раку сечового міхура є дуже важливою проблемою.

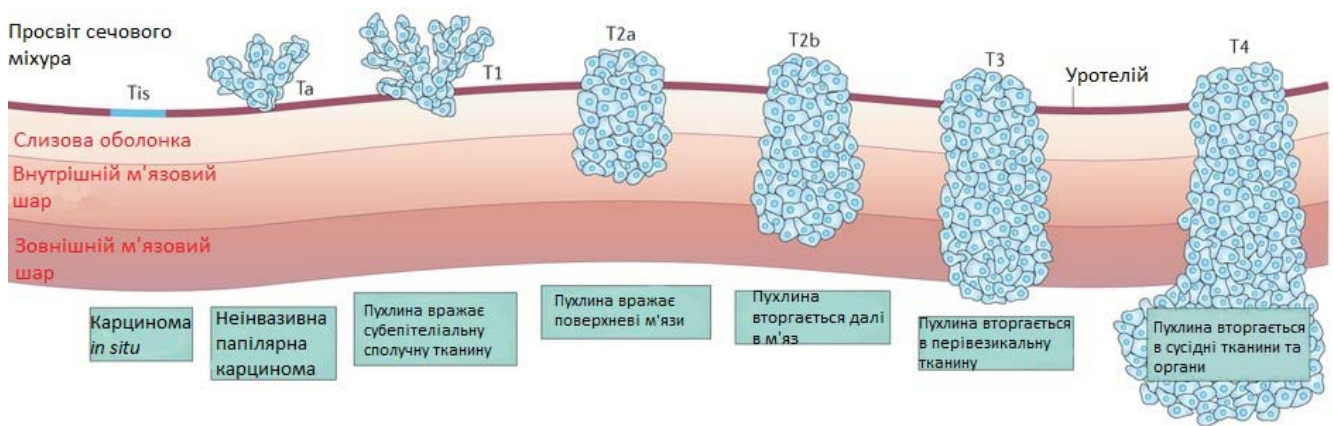


Рис.1.2. Класифікація стадій раку сечового міхура [27]

На сьогодні так званим «золотим стандартом» ранньої діагностики раку сечового міхура є аналіз сечі на присутність гематурії, цистоскопія і цитологічне дослідження сечі [28, 29]. Проте цитологічні методи є недостатньо чутливими для виявлення захворювання на ранній стадії. Процедура цистоскопії є, крім того, інвазивною і некомфортною для пацієнта. Вона може викликати такі побічні ефекти як біль, кровоточивість, інфекції сечовивідних шляхів та інші ускладнення. На додаток, цистоскопія нездатна виявити пухлини у відособлених ділянках сечового міхура, що обмежує клінічне застосування цього методу [30]. Таким чином, в останні десятиліття ведуться активні дослідження у

напрямку пошуку діагностичних маркерів, які можна виявити у сечі пацієнта.

На молекулярно-генетичному рівні визначають низку змін, які є найбільш характерними для раку сечового міхура. Серед них, зокрема, мутації деяких генів, таких як *FGFR3*, *RBI*, *HRAS*, *TP53*, *TSC1*, що відіграють важливу роль у контролі поділу клітин. Найчастіше гени, зміни у яких пов'язують з розвитком раку сечового міхура, лежать на 9-й хромосомі людини, проте були знайденні мутації і серед генів, які лежать на інших хромосомах, зокрема на 22-й. Дослідження раку сечового міхура показали, що 70% випадків цього захворювання характеризуються мутацією гена теломерази (*TERT*), що бере участь у захисті ДНК, процесах клітинного старіння та в онкогенезі. Серед протоонкогенів, активація яких характерна для раку сечового міхура, присутній *HRAS* [31].

Геномна нестабільність є характерним явищем для раку сечового міхура, особливо для перехідно-клітинного його типу. Геномну нестабільність при раку можна розділити на два типи: мікросателітну нестабільність (MSI) та хромосомну нестабільність (CIN), яка пов'язана з порушенням сегрегації хромосом. Саме вона є більш характерною для раку сечового міхура (50% випадків) і є асоційованою з поганим прогнозом захворювання. Мікросателітна нестабільність зустрічається у 9% випадків РСМ і частіше трапляється у молодих пацієнтів з даним захворюванням [32, 33].

1. 3. Неінвазивна діагностика пухлин на основі рідинних біопсій

1.3.1. Рідинні біопсії, їх різновиди і використання. Внаслідок стрімкого розвитку біотехнології в останні десятиліття стали очевидними обмеження розповсюджених методів відбору проб для діагностики онкозахворювань. Традиційні біопсії та хірургічні процедури є

інвазивними та спряженими з потенційними ускладненнями, до того ж, іноді вони не можуть бути виконані повторно, наприклад, коли клінічний стан хворого погіршується або коли пухлина є недоступною. Крім того, молекулярний профіль тканин біопсії здатен забезпечити картину, обмежену лише певним моментом часу, а також може бути малоінформативним через генетичну неоднорідність численних субклонів пухлини [34].

Кров використовувалась для виявлення низки біологічних молекул, асоційованих з певними захворюваннями, ще задовго до визначення ВООЗ у 2001 році самого терміну «біомаркер». Добре відомими прикладами такого використання можуть бути визначення рівнів різних метаболітів, таких як глюкоза або холестерин; наявність таких ферментів, як трансамінази, що надходять із відмираючих гепатоцитів; вимірювання рівнів моноклональних антитіл, альфа-фетопротейну (AFP), простат-специфічного антигену (ПСА), ракового антигену 125 (CA 125) або хоріонічного гонадотропіну людини (HCG) у крові [35].

Отже, біомаркери – це клітинні, біохімічні, молекулярні (протеомні, геномні та епігенетичні) зміни, за якими можна виявити і відрізнити різні стани певного біологічного процесу. За допомогою них можна виміряти і оцінити певні показники з метою відрізнити нормальний процес від патогенного, а також виявити реакцію хвороби на різні види лікування. Відповідно до цього у царині онкологічних досліджень біологічні маркери повинні бути такими, що інформують про присутність онкологічного захворювання в організмі. Це можуть бути молекули, що секретуються безпосередньо пухлиною або специфічна відповідь організму на присутність у ньому злякисного процесу. Біомаркери можуть бути виявлені у різних середовищах організму – тканинах, певних клітинах та у біологічних рідинах [16].

Клітини пухлини, загиблі шляхом апоптозу чи некрозу, випускають свій вміст у біологічні рідини. Як описано, у хворих на рак позаклітинна ДНК (пкДНК) з рідинних біопсій переважно складена з ДНК із нормальних клітин, і тільки менша її частина належить до дуже мінливої фракції пкДНК з ракових клітин. Сучасні технології дозволяють використовувати цільові підходи до пкДНК для пошуку специфічних генних мутацій або структурних перебудов хромосом в конкретних регіонах геному, які, як правило, піддаються генетичним змінам в даних неоплазіях; крім того, гіперметилування онкосупресорів, характерне для певних видів пухлин, також може бути виявлене у позаклітинній ДНК рідинних біопсій [36].

Ще одним джерелом біомаркерів, які можна детектувати у рідинних біопсіях, є екзосоми та інші мікроезори, малі мембранні органели, що виділяються клітинами пухлини і містять білки та нуклеїнові кислоти пухлинного походження. Зокрема, до їх складу входять некодуючі РНК, які, крім того, можуть вільно циркулювати у біологічних рідинах, або бути наявними там у комплексі з білками. Первинні та метастатичні пухлини також здатні відшаровувати клітини, які, потрапивши в кров або іншу біологічну рідину, циркулюють у ній і можуть бути виділені зі зразків рідинних біопсій [37].

Кров та продукти її фракціонування (плазма, сироватка), була першим видом рідинних біопсій, які дістали практичне застосування. Надалі було виявлено, що різноманітний матеріал для діагностики можна отримати з інших біологічних рідин, і що найбільш інформативними виявляються ту рідини, які знаходяться у безпосередній близькості о враженого органу. Для пухлин ЦНС такою біологічною рідиною може виступати ліквор, для пухлин легень – плевральна рідина, для раку гортані, ротової порожнини – слина, а для пухлин сечостатевої системи найбільше молекулярних та клітинних маркерів буде містити сеча [38].

Таким чином, рідинні біопсії є потужним джерелом інформації для моніторингу захворювання та для виявлення його молекулярних особливостей. На відміну від біоптатів тканин, рідинні біопсії можуть служити «знімком» у реальному часі, здатним відобразити гетерогенний молекулярний профіль пухлини [39]. Для ефективного використання рідинних біопсій як джерела біологічних маркерів слід враховувати потенціал кожного з типу молекул та клітин пухлинного походження.

1.3.2. Рідинні біопсії у діагностиці раку передміхурової залози та сечового міхура. Як рак передміхурової залози, так і рак сечового міхура, обидва безсимптомні на ранніх стадіях, гостро потребують маркерів для їх неінвазивної та ранньої діагностики. Рідинні біопсії є багатообіцяючим джерелом таких біомаркерів, тож в останні роки багато наукових робіт присвячено даній проблематиці.

Певний час визначення кількості циркулюючих пухлинних клітин у периферичній крові вважалося гарним біомаркером для надійного прогнозування метастатичного гормон-резистентного раку передміхурової залози. Проте чутливість та специфічність цього методу не є абсолютними і наразі триває пошукова робота з метою поліпшити його ефективність за допомогою комбінації з іншими біомаркерами. Одним із прикладів є дослідження Chang зі співавторами, які визначали експресії генів епітелійно-мезенхімного переходу (EMT) та генів стовбурових клітин у мононуклеарах периферичної крові [40]. Також було показано, що комбінування підрахунку циркулюючих пухлинних клітин з аналізом експресії у них віментину та Ki67 може підвищити точність діагностики [41]. Низка подальших досліджень показала, що саме молекулярний аналіз вмісту циркулюючих пухлинних клітин, а не простий підрахунок їх кількості, може надати більш цінну інформацію для моніторингу та прогнозування розвитку хвороби хворих на РПЗ [42].

Позаклітинні нуклеїнові кислоти (пкНК) також мають гарний потенціал виступати в якості маркерів РПЗ, зокрема тому, що за зміною їх кількісного та якісного складу можна визначати не тільки відсутність або наявність захворювання, але і поточний стан хворого протягом лікування. Серед пкРНК, що досліджувались у рідинних біопсіях як потенційні маркери для діагностики РПЗ, присутні різні класи РНК: мРНК, мікроРНК та довгі некодуючі РНК (днРНК). Зокрема, днРНК *PCAZ* є маркером, який на сьогодні затверджений FDA для діагностики пацієнтів із першою негативною тканинною біопсією [43]. Низка мікроРНК, зокрема *miR-21-5p*, *miR-200c-3p*, *miR-210-3p*, *miR-375*, *miR-30c-5p*, *miR-223-3p*, *let-7a-5p*, *miR-141-3p* та *miR-106a-5p* були запропоновані для визначення у плазмі крові для діагностики і прогнозування РПЗ [44]. Сьогодні існують комерційно доступні тести, що базуються на визначенні циркулюючих або екзосомних пкРНК у сечі. Наприклад, тест SelectMDx заснований на виявленні РНК *DLX1* та *HOXC6* в сечі після сеансу масажу передміхурової залози та допомагає виявити рак передміхурової залози високого ризику при біопсії. Тест EchoDx - це комерційно доступний тест, заснований на виявленні РНК трьох генів (*PCAZ*, *ERG* та *SPDEF*) в екзосомах сечі [45].

Щодо пк-мРНК, існують певні труднощі у застосуванні їх визначення у клінічній практиці через високу мінливість серед пацієнтів. З іншого боку, саме ця властивість робить їх потенційними кандидатами для застосування у персоналізованій терапії раку передміхурової залози [42].

Цілісність, варіація кількості копій, мутації та метилювання пкДНК також широко вивчались як біомаркери РПЗ у рідких біопсіях. Розглядаючи метилювання онкосупресорів як одну із найбільш ранніх подій при канцерогенезі, багато дослідників зосередині свою увагу на виявленні наявності метильованих генів у біологічних рідинах як засобу діагностики РПЗ. Оскільки епігенетичні зміни, як правило, багаторазові і

не обов'язково перекриваються, важливою для такої діагностики є використання панелей з кількох генів для підвищення невисокої чутливості окремих генів. Дійсно, Ellinger зі співавторами з'ясували, що за допомогою генної панелі, що включає метильовані гени *GSTP1*, *PTGS2*, *RPRM* та *TIG1* можна підвищити чутливість до РПЗ до 47%, у той час як визначення метилювання тільки *GSTP1* мало чутливість 42%. Специфічність при цьому зберігалась на рівні 93% [46]. Різні панелі, що включали різні гени та їх комбінації, були досліджені і оцінені для діагностики та прогнозування РПЗ [47].

Якщо для діагностики раку передміхурової залози часто використовуються маркери, що циркулюють у периферичній крові, то для раку сечового міхура сеча давно розглядається як основний вид рідинної біопсії. Для вирішення проблеми діагностики раку сечового міхура сьогодні використовуються новітні методи, такі як сиквенування наступного покоління (NGS) та краплинна цифрова ПЛР (ddPCR), що дозволяють виявити навіть дуже низькі рівні пухлинної ДНК серед великого надлишку непухлинної ДНК [48]. Christensen та ін. нещодавно опублікували свої дані щодо підходу ddPCR для виявлення мутацій *FGFR3* та *PIK3CA* у позаклітинній ДНК (пкДНК) сечі та циркулюючій ДНК пухлини. У цьому дослідженні було показано, що рівні мутацій у пкДНК у сечі пацієнтів з неінвазивним раком сечового міхура (NMIBC) позитивно корелюють зі стадією пухлини, ступенем та розміром і поява їх у сечі індивіда може бути використана як маркер ризику захворювання на рак сечового міхура. У групі пацієнтів з цистектомією велика кількість мутацій у пкДНК в сечі передбачала рецидив захворювання в майбутньому [49].

Некодуючі РНК, як малі (зокрема мікроРНК), так і довгі (днРНК) також пов'язують з розвитком та прогресуванням раку сечового міхура, хоча їх загальна експресія та функціональне значення остаточно не

з'ясована. В одному з досліджень чотири днРНК (LINC00355, UCA1–203, UCA1–201 та MALAT1) виявляли в екзосомах сечі, і було показано, що три з них були високо експресованими у хворих на рак сечового міхура. Комбінована діагностична модель днРНК показала вищу чутливість (92%) та вищу специфічність (91,7%) порівняно з традиційними біомаркерами [50]. Seitz зі співавторами виявили нові днРНК, асоційовані з раком сечового міхура і показали, що LINC00958 і LINC01296 можуть діяти як драйвери онкогенезу через взаємодію з білками, що беруть участь у ініціації трансляції та/або посттранскрипційній модифікації РНК [51].

Серед лабораторних досліджень, що на сьогодні проводять для ранньої діагностики раку сечового міхура, наступні: UroVysion™ (визначає хромосомні порушення у клітинах, отриманих з сечі), тест на присутність ВТА (антигена раку сечового міхура), ImmunoCyt™ (визначення у сечі присутності муцину та СЕА (канцероембріональний антиген), що є характерними для пухлинних клітин), NMP22 BladderChek® (тест на рівень у сечі білку ядерного матриксу 22) [52].

1.4. Метилування ДНК

1.4.1. Метилування промоторів та його роль у регуляції експресії генів. Метилування ДНК в геномі ссавців зустрічається переважно як ензиматична модифікація цитозину (С), розташованого у 5'-положенні до гуанозину (G) у CpG-динуклеотиді, і полягає у приєднанні метильної групи до вуглецю, призводячи до формування 5'-метилцитозину (5-mC). За своєю природою метилування ДНК – епігенетичний процес, оскільки бере участь у регуляції роботи генів без змін у структурі ДНК. Фізіологічні функції метилування в нормальній клітині полягають в інактивації Х-хромосоми у ссавців, батьківському геномному імпринтингу та виключенні певних алелів генів, захисті геному та його структурної

цілісності шляхом інактивації чужорідних і мобільних повторюваних послідовностей ДНК, а також в пригніченні транскрипції певних генів [53].

У нормальних клітинах метилювання зустрічається, в основному, в повторюваних фрагментах ДНК (сателітна ДНК, мобільні генетичні елементи, такі як LINES, SINES, ендегенні ретровіруси) та в кодуєчій частині генів, за винятком першого екзону. Крім того, у геномі ссавців зустрічаються ділянки довжиною ~500–4000 нуклеотидів, які збагачені вмістом неметилюваних CpG-динуклеотидів. Такі регіони зазвичай локалізуються в проксимальній частині регуляторної ділянки генів і дістали назву CpG-острівців. Метилювання цитозинів у цих ділянках призводить до репресії промотору, а отже й інактивації функції всього гена [54].

Для пояснення явища пригнічення експресії генів шляхом метилювання CpG-острівців у складі їх промоторів було запропоновано два механізми. Перший полягає в тому, що метилювання цитозинів у регуляторній ділянці гену, що містить CpG-острівці, безпосередньо порушує зв'язування транскрипційних факторів із їх сайтами розпізнання, що знаходяться в промоторних ділянках генів. Другий механізм пояснює пригнічення транскрипційної активності ділянок, що піддалися гіперметилюванню, через залучення метилзв'язувальних білків та/або білкових комплексів, MeCP2 та MeCP1, які, специфічно зв'язуючись з метильованими CpG-ділянками, можуть заважати зв'язуванню транскрипційних факторів, обмежуючи доступ їх до регуляторних елементів [54-56].

Ще один механізм пригнічення транскрипції генів внаслідок гіперметилювання пов'язаний з ремоделюванням хроматину. Метил-CpG-зв'язувальні білки здатні взаємодіяти з ферментами, відповідальними за модифікацію гістонів і, таким чином, ініціювати перебудову хроматину у

ділянці, де відбулось метилювання. Прикладом виступає їх взаємодія з гістоновими деацетилазами (HDAC). HDAC деацетилюють залишки лізину гістонів і сприяють взаємодії між сусідніми гістоновими білками, наслідком чого є компактизація хроматину. Порушення структури й функції метилзв'язувальних білків перешкоджає нормальному процесу репресії транскрипції генів [56].

Процеси метилювання ДНК у ссавців, включаючи людину, каталізуються незалежними ферментами класу ДНК-(цитозин-5)-метилтрансфераз (DNMT) — ДНК-метилтрансферази 1, 3a і 3b (DNMT1, DNMT3a, DNMT3b, відповідно) [53, 57].

Метилтрансферази DNMT3a та DNMT3b відповідальні за метилювання *de novo*. Вони на високому рівні експресуються в ембріональних клітинах, при цьому в соматичних клітинах дорослої особини їх експресія у нормі є низькою. DNMT1 здійснює підтримуюче метилювання *in vivo*, відповідає за правильний розвиток ембріону, відповідає за приєднання метильної групи на комплементарному ланцюзі при реплікації ДНК дочірньої клітини, а також за імпринтинг. Найбільші її кількості було виявлено в соматичних клітинах, де вона локалізується в місцях реплікації ДНК і тісно взаємодіє з ядерним антигеном проліферуючих клітин (PCNA) [57].

У клітинах більшості пухлин людини виявлене підвищення експресії DNMT1 та ферментів родини DNMT3, що призводить до порушення нормального метилювання ДНК [58].

1.4.2. Метилювання промоторів онкоасоційованих генів при канцерогенезі. Вірогідно, що зв'язки між різними видами метилтрансфераз (DNMT1, DNMT3a, DNMT3b) й процесами деметилювання, зокрема, з таким ферментом як TET, а також порушення їх взаємного балансу в клітині є важливими факторами, що передують

значним клітинним змінам і можуть призвести до ініціації канцерогенезу, росту (прогресування) пухлин і навіть до формування раковими клітинами резистентного до терапії фенотипу. До порушень нормального патерну метилювання можуть призводити мутації генів, які кодують зазначені ферменти. Наприклад, мутації у генах білків DNMT3a та DNMT3b, відповідальних за метилювання *de novo*, можуть призвести до гіпометилювання юкстацентромерного гетерохроматину, в першу чергу 1-ої, 16-ої та X-хромосом, спричинюючи численні хромосомні порушення, такі як аномальну деконденсацію хроматину, склеювання, розділення та розпад перицентромерних ділянок хромосом [59].

Порушення процесів метилювання спостерігаються також і у випадку поліморфізму 677C>T та 1298A>C гена *MTHFR*, продукт якого, фермент метилентетрагідрофолат редуктаза, є критично важливим для метилювання, синтезу та процесів репарації ДНК, нормального обміну гомоцистеїну, забезпечуючи адекватний метаболізм та доступність метильних груп. Цей фермент є необхідним для фолатзалежного синтезу 5-метилтетрагідрофолату *de novo* – основної циркуляторної форми фолатів в організмі та попередника S-аденозилметіоніну – універсального донора метильних груп для більшості біологічних реакцій метилювання, включаючи метилювання ДНК. Обумовлений такими змінами дефіцит метильних груп спричинює дисбаланс метилювання та розвиток раку, в тому числі раку сечового міхура [60].

Таким чином, порушення характеру метилювання ДНК – важливої складової частини хроматину – може спричинювати зміни структурної організації хроматину, обумовлюючи виникнення фенотипічної та генетичної нестабільності у клітині.

У пухлинних клітинах дефекти метилювання ДНК представлено гіпометилюванням геному в цілому, яке зростає зі збільшенням ступеня малігнізації, а також аберантним гіперметилюванням CpG-острівців (рис

1.3). Найвірогіднішим наслідком гіпометилювання ДНК за канцерогенезу може бути розвиток нестабільності геному. Як додаток до цього, аберантне гіперметилювання спричинює інактивацію генів, які гальмують клітинний ріст, стимулюють диференціювання й відповідають за репарацію пошкоджень ДНК, створюючи сприятливі умови для ініціації та подальшого просування пухлин [3].

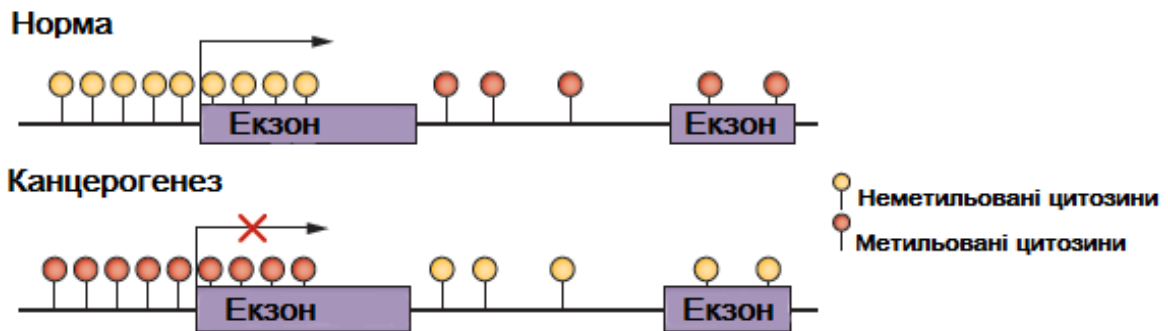


Рис.1.3. Метилювання ДНК у нормальних та ракових клітинах: стрілки вказують на активну або неактивну експресію генів [3]

Таким чином, різноманітні захворювання, в тому числі онкологічні, включаючи рак сечового міхура та рак передміхурової залози, супроводжуються аномальним гіпометилюванням ДНК і паралельним процесом гіперметилюванням CpG-острівців в промоторних областях генів-онкосупресорів, що призводить до стійкого пригнічення їх транскрипції [61]. На сьогодні відомо, що зміни у метилюванні ДНК пухлинних клітин протягом формування їх злоякісного фенотипу мають гетерогенний, стохастичний і динамічний характер. Було показано, що для виявлення різниці між пухлинами з різними характеристиками та нормальними тканинами більш інформативним є аналіз варіації профілю їх метилювання протягом захворювання, зокрема, усередині CpG острівців, а не просте кількісне порівняння середніх значень у певний момент часу [62].

Ген *MYO3A* розташований на короткому плечі 10 хромосоми і кодує білок міозин 3А, який належить до надродини міозину. Це актинзалежний моторний білок, який володіє кіназною активністю. Кілька мутацій *MYO3A* викликають домінуючу приглухуватість, що є наслідком пригнічення активності АТФази та рухливості цього білка [63]. Роль *MYO3A* та його білкового продукту в канцерогенезі залишається суперечливою. Наприклад, було продемонстровано зростання його експресії у низці випадків раку грудної залози, що корелювало з інвазивністю та прогресією пухлини [64]. Також було виявлено, що експресія *MYO3A* зростає в 3 рази в андроген-незалежних порівняно з андроген-чутливими клітинними лініями раку передміхурової залози [65]. Водночас, було виявлено аберантне гіперметилування промотору *MYO3A* у декількох видів раку, включаючи гострий лімфобластний лейкоз [66] та рак сечового міхура [67].

Ген *TMEFF2* знаходиться в положенні 2q32.3. *TMEFF2* кодує білок, який належить до сімейства томорегулінів. Це трансмембранний білок з EGF-подібним та 2-ма фолістатин-подібними доменами. Зазвичай томорегулін-2 експресується в тканинах мозку як в період ембріонального розвитку, так і в дорослих осіб, у спинному мозку та у передміхуровій залозі, в стромальних клітинах нормальної слизової оболонки товстої кишки [68,69].

Yang зі співавторами встановили, що експресія *TMEFF2* була суттєво пригнічена у зразках пухлин колоректального раку, та дослідили, що таке зниження експресії відбувається через гіперметилування промотора *TMEFF2* у цих зразках [70]. Більше того, індукція експресії *TMEFF2* в андроген-незалежних клітинних лініях раку передміхурової залози DU145 і PC3 пригнічувала їх проліферацію [71]. Онкосупресорна функція *TMEFF2* представлена пригніченням міграції та інвазії клітин, а також модуляцією апоптозу.

Однак, незважаючи на ці дані, *TMEFF2*, ймовірно, відіграє подвійну роль у канцерогенезі.

Ген *GDF15* локалізований на хромосомі 19 в локусі p13.1-13.2. Його білковий продукт *GDF15* належить до родини TGF-beta. Спочатку його було виявлено як цитокін, який інгібує вироблення TNF у макрофагах, завдяки чому він отримав назву MIF-1 (інгібуючий макрофаги цитокін-1). Але ця функція *GDF15* не була підтверджена результатами подальших досліджень [72]. Загалом, *GDF15* можна визначити як стрес-індукований секреторний білок, який бере участь у ряді патологічних станів, включаючи діабет, серцево-судинні захворювання та рак. Незважаючи на надмірну експресію в ряді пухлин [73], є дані про те, що *GDF15* відіграє дуже неоднорідну роль у розвитку ракових захворювань. Характер його впливу на процеси при канцерогенезі сильно залежить від тканини з якої походить пухлина. Наприклад, при недрібноклітинному раку легень епігенетичне придушення експресії гена *GDF15* стимулює проліферацію клітин і демонструє сильну асоціацію з поганим прогнозом [74]. Метилування промотору *GDF15* є загальною подією для злоякісних новоутворень сечовивідних шляхів, тому у низці досліджень він розглядається як потенційний біомаркер для діагностики цих пухлин [75].

RASSF1A є найпоширенішим та добре охарактеризованим геном онкосупресорів серед генів. Його експресія знижується у понад 30 видів раку [76]. Білковий продукт гена *RASSF1A* взаємодіє з мікротрубочками зв'язуючись з білками, асоційованими з мікротрубочками, такими, як MAP1B та MAP1S. Втрата такої взаємодії призводить до пригнічення онкосупресорної дії, втрати стабільності тубуліну, пригнічення апоптозу та сприянню геномної нестабільності через втрату структури веретена поділу та центромер. Втрата експресії гена *RASSF1A* за рахунок метилування його промотора є однією з найчастіших подій серед онкологічних захворювань людини, зокрема у 37 видів пухлин таких, як

абдомінальна парагангліома, рак сечового міхура, пухлина головного мозку, рак грудної залози, прямої кишки, шиї, лімфома Ходжкіна, рак нирки, дрібноклітинний рак легень, меланома, остеосаркома, рак яєчників, передміхурової залози та підшлункової, рак щитоподібної залози, лейкемія, ретинобластома та ін.[77].

KRT18 кодує цитокератин 18, що є представником родини цитокератинів та одним з мажорних структурних протеїнів епітелійних клітин. Разом з іншими цитокератинами формує гетерополімери проміжних філаментів цитоскелету. Експресія генів, що кодують цитокератини, залежить, в першу чергу, від типу епітелійних клітин та від ступеня їх диференціації. Функція білка *KRT18* полягає у формуванні пластичного цитоскелету, підтриманні нормальної структури мітохондрій та забезпеченні механічного захисту від зовнішніх стресових чинників. Цей цитокератин також є важливим учасником таких процесів, як апоптоз та прогресія клітинного циклу [78]. Його роль у розвитку раку є неоднозначною: було показано, що нокдаун *KRT18* знижує здатність до міграції і підвищує чутливість до хіміотерапевтичних препаратів, а також підвищує індуковану цитокінами клітинну смерть у різних клітинних лініях, що дає змогу припустити його онкогенні властивості, проте з іншого боку, на клітинних лініях раку грудної залози та передміхурової залози було виявлено, що його експресія сприяє процесам, пов'язаним зі зниженням агресивності пухлини [79].

Ген *PTEN* кодує білок-гомолог фосфатази і тензину (*PTEN*, phosphatase and tensin homologue). Є інгібітором PI3K/AKT/mTOR сигнального шляху, який регулює виживаність клітини, проліферацію та метаболізм. Ген *PTEN* конститутивно експресується у нормальних тканинах, зокрема у клітинах передміхурової залози. Проте, його експресія може негативно регулюватися на багатьох рівнях. Епігенетична інактивація промотора гена *PTEN* шляхом метилювання була описана у

клітинах раку щитоподібної та грудної залоз, раку легень, голови та шлунку, а також раку ендометрію та яєчників [80,81].

NKX3.1 кодує білок NKX3.1, що відіграє важливу роль у нормальному розвитку передміхурової залози, регуляції проліферації залозистого епітелію та у формуванні каналців у передміхуровій залозі. Цей фактор транскрипції функціонує як негативний регулятор росту клітин епітелію в тканині передміхурової залози. Аберантна експресія *NKX3.1* пов'язана з прогресуванням пухлини передміхурової залози [82].

Цікаво, що одним з ключових шляхів пригнічення злоякісної трансформації білком NKX3.1 є кооперація з білком PTEN [83]. У клітинах нормального епітелію передміхурової залози фосфатаза PTEN негативно регулює сигнальний шлях PI3K/AKT та позитивно модулює активність та рівень білка p53 (рис.1.3.). Окрім андрогенового рецептора, рівень транскрипції гена *NKX3.1* регулюється також білком PTEN. У свою чергу, білок NKX3.1 негативно регулює активність промотора гена *AR*, таким чином контролюючи андроген-індукований сигнальний шлях. Окрім цього, транскрипційний фактор NKX3.1 зв'язується з гістоновою деацетилазою HDAC, що призводить до порушення комплексу p53-MDM2-HDAC1, вивільнення білка p53, його подальшого ацетилювання та активації. У результаті таких функціональних взаємодій білків NKX3.1 та PTEN відбувається врівноваження таких процесів, як проліферація, диференціація та апоптоз [83,84].

За умови втрати активності білка PTEN, втрачається контроль над регуляцією усіх зазначених процесів, а активність білка NKX3.1 та сигнального шляху, який він контролює, сильно знижується (рис. 1.4).

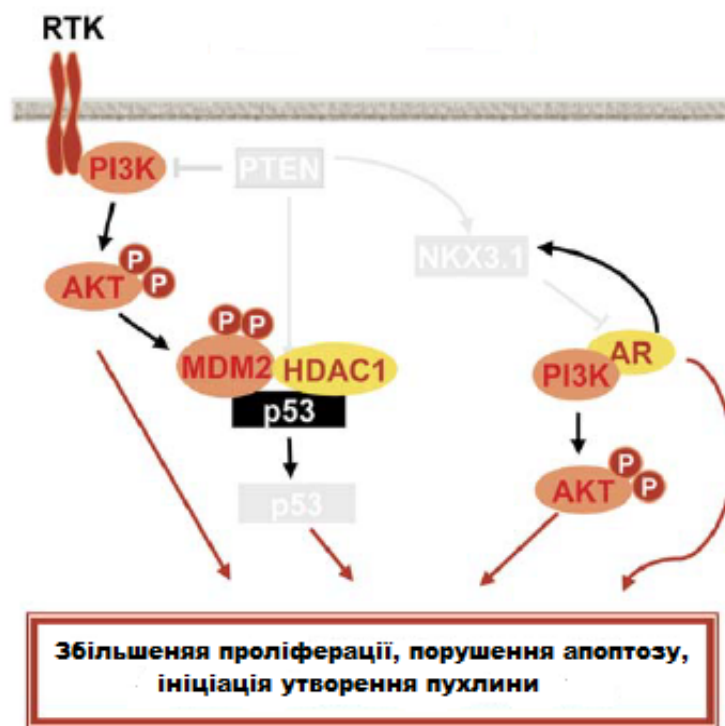


Рис.1.4. Схематичне зображення механізмів ініціації канцерогенезу за відсутності активних білків PTEN та NKX3.1. (адаптовано з [83])

За відсутності активності білка NKX3.1 відбувається надекспресія гена андрогенового рецептора, що призводить до активації цільових сигнальних шляхів, зокрема сигнального шляху PI3K/АКТ. За відсутності білка NKX3.1 транскрипційний фактор p53 заходиться переважно у комплексі p53-MDM2-HDAC1, а не у вільному вигляді, що призводить до негативної регуляції цього білка. Активація сигнального шляху PI3K/АКТ разом з негативною регуляцією p53 та збільшенням рівня андрогенового рецептора веде до активації клітинної проліферації та ініціації утворення пухлини [83].

Ген *VIM* кодує білок віментин, що бере участь у підтримці форми клітини та цілісності цитоплазми, стабілізації цитоскелету. Цей білок бере участь у нейрогенезі та транспорті холестерину, у приєднанні клітин, міграції та передачі сигналів. Експресія гена *VIM* є класичним маркером мезенхімних клітин, таких як фібробласти [85].

У порівнянні з нормальною тканиною рівень метилювання *VIM* є значно вищим у тканинах карцином сечового міхура. Аберантне гіперметилювання промотора гена *VIM* було показано для деяких видів раку, а частота такої появи дала підставу пропонувати цей ген як маркер даних пухлин [86].

Білковий продукт гену *CDH1*, E-кадгерин, локалізований у плазматичній мембрані у вигляді гомодимерів. Відіграє роль у клітинній адгезії. Молекула E-кадгерину складається з внутрішньоклітинного домену, трансмембранного домену, CAD домену та NAV мотиву, також присутні Ca^{2+} -зв'язуючі сайти. Гомодимери E-кадгеринів сусідніх клітин взаємодіють між собою за допомогою NAV мотивів. Внутрішньоклітинний адгезивний комплекс, який складається з таких білків, як α -катенін, β -катенін, γ -катенін та p120 CAS, зв'язує гомодимери E-кадгерину з актиновим цитоскелетом (рис. 1.5) [87].

Часта втрата E-кадгерин-опосередкованої клітинної адгезії у пухлинах епітеліального походження разом з онкосупресорною функцією E-кадгерину передбачає, що цей адгезивний білок є важливим блокатором розвитку пухлини. Втрата функціональної активності цього білка може бути спричиненою багатьма механізмами, зокрема шляхом вивільнення β -катеніну і активації сигнального шляху Wnt. Показовим є те, що у деяких типах раку мажорним механізмом інактивації гена *CDH1* є метилювання його промотора [88].

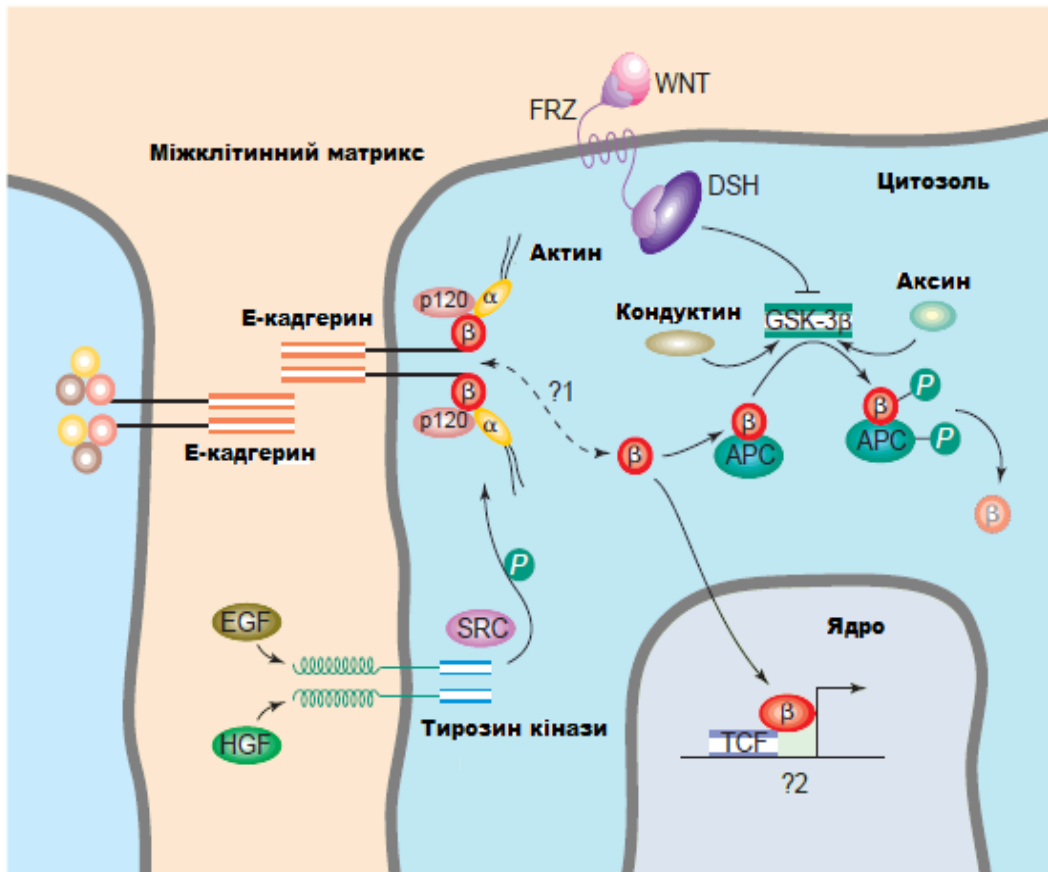


Рис.1.5. Зображення схеми функціонування Е-кадгерінового адгезивного комплексу та його зв'язок з сигнальним шляхом Wnt [87]

1.5. Кінази родини Аврора, їх фізіологічні функції та участь у канцерогенезі

Величезна кількість перебудов хромосом, що призводять до масштабних делецій та інсерцій, дуплікацій, транслокацій та утворення аберантних гібридних генів, є звичайними явищами під час прогресування раку передміхуробої залози [89]. Одним із можливих факторів геномних перебудов є аберантна експресія ключових регуляторів мітозу, до яких, зокрема, належать кінази родини Aurora [90, 91]. Кінази родини Aurora - це висококонсервативні серин/треонінкінази, одні з головних регуляторів клітинного циклу, зокрема, процесів формування веретена поділу та

сегрегації хромосом. Втрата функції та надмірна експресія їх генів може призвести до злоякісної трансформації через відхилення під час поділу клітин, які виникають як прямі чи опосередковані наслідки неадекватного функціонування кіназ Aurora [92].

Кіназа Aurora A кодується геном *AURKA*, який локалізований на хромосомі 20q13.2. Існує 14 варіантів транскриптів *AURKA*, що кодують білки від 9 до 46 кДа. Ця кіназа бере участь у кількох подіях під час поділу клітини, а саме: відділенні центросом, утворенні мікротрубочок та стабілізації мітотичного веретена, забезпечуючи точну сегрегацію хромосом. Aurora A регулює перехід від фази G2 до фази мітозу через *Weg*-опосередковану активацію *Plk1* [93]. Встановлено, що ця кіназа при надмірній експресії може трансформувати клітини NIH3T3 та фібробласти щура *in vitro* [94]. Надмірна експресія та ампліфікація гена кінази Aurora A були описані для низки злоякісних новоутворень людини, включаючи пухлини грудної залози, сечостатевої системи, кровотворної та лімфатичної системи, ураження ЦНС тощо [95]. Дослідження пухлинних тканин хворих на рак шлунку виявило, що зростання рівня експресії кінази Aurora A було пов'язано з анеуплоїдією, підвищенням виживаності клітин та стійкістю до терапії [96].

Ген *AURKB* локалізований на хромосомі 17p13.1, кодуючи другу кіназу родини Aurora, Aurora B. Aurora B складається з 344 амінокислот. Цей білок є членом хромосомного пасажирського комплексу, функціонує на початку мітозу і концентрується у безпосередній близькості від центромер та кінетохор, де відбувається прикріплення хромосом до мікротрубочок мітотичного веретена. В анафазі Aurora B транслокується до екватору веретена поділу. Aurora B регулює взаємодію кінетохор і хромосом, сегрегацію сестринських хроматид та цитокінез [97]. У попередніх дослідженнях було виявлено підвищений рівень Aurora B у

клітинних лініях раку передміхурової залози та у тканинах передміхурової залози у пацієнтів з РПЗ [98].

Aurora C є менш вивченим представником сімейства кіназ Аврора, хоча вона була виявлена ще в кінці 90-х років 20-го століття [99]. Ген *AURKC* розташований на хромосомі 19q13.43 і утворює 3 варіанти транскриптів, що кодують білки з 275–309 аміновислотних залишків. Цей білок є досить специфічним для статевих клітин і задіяний переважно під час мейотичного поділу. Було показано, що він асоційований з Aurora B та сурвівіном *in vivo* [100]. За своєю будовою він є дуже подібним на Aurora B і може перекривати функції цього білка, але, ймовірно, робота цих білків по-різному регулюється. Перекриття їх функцій також не є абсолютним. Наприклад, було продемонстровано, що Aurora C відіграє роль у прогресуванні клітинного циклу, тоді як роль Aurora B обмежена підтримкою SAC («контрольно-пропускного» пункту веретена поділу) [101]. Функціональна роль *AURKC* у канцерогенезі ще є недостатньо зрозумілою, але підвищення рівня його білкового продукту в пухлинах часто пов'язане з проліферацією клітин, міграцією та поганим прогнозом. Надмірна експресія Aurora C у клітинних лініях NIH3T3 призводить до аномального поділу клітин та появи багатоядерних клітин [102]. Ці події тісно пов'язані зі злоякісною трансформацією, тому ген *AURKC* розглядався як онкоген, а Aurora C є потенційною мішенню для протипухлинної терапії [103].

1.6. Функціональні характеристики довгої некодуючої РНК PANDAR та її роль у канцерогенезі

Довгі некодуючі РНК представляють відносно нову групу клітинних регуляторних елементів. Вони є клітино- і тканинспецифічними і чутливими до змін клітинного метаболізму та мікрооточення [104].

Механізми їх дії можуть бути різними, але одним з найкраще описаних серед них є дія як губки для мікроРНК, зв'язуючи різні мікроРНК і, таким чином, запобігаючи їх взаємодії зі своїми мішенями.

PANDAR (Promoter of CDKN1A Antisense DNA Damage-Activated RNA) - це довга некодуюча РНК, ген якої знаходиться вище за течією гена p21, на короткому плечі 6-ої хромосоми у локусі 21.2 (6p21.2). Транскрипт PANDAR сягає приблизно 1,5 т.п.о. Було виявлено, що PANDAR регулює експресію генів, які беруть участь у апоптичній реакції на пошкодження ДНК [105].

Експресія PANDAR, так само як p21, регулюється супресором пухлин p53, який зв'язується перед початком місця транскрипції p21 та активує транскрипцію генів цього локусу, розташованих нижче за течією. Було показано, що днРНК PANDAR, в свою чергу, здатна стабілізувати p53, не впливаючи при цьому на стабільність p53-мРНК [106].

Зростання рівня експресії PANDAR є характерним для тканин пухлин з на пізніх стадіях онкогенезу. Хоча різні автори висловлюють суперечливі припущення щодо ролі PANDAR у онкогенезі [107], проте багато експериментальних досліджень підтверджують ідею його онкогенності та зазначають зв'язок підвищених рівнів експресії PANDAR із пізньою стадією та поганим прогнозом захворювання. Зростання експресії PANDAR було виявлено у низці видів раку, включаючи рак прямої кишки, рак легень, рак нирки, холангіокарциному, остеосаркому, рак щитоподібної залози та інші [108]. У своїй роботі, присвяченій ролі PANDAR у розвитку колоректального раку, Лі зі співавторами помітив значну позитивну кореляцію між експресією PANDAR та стадією TNM, інвазією та метастазуванням [109]. Надмірна експресія PANDAR також була виявлена в тканинах гепатоцелюлярної карциноми та її клітинних лініях. Більше того, його високі рівні в тканинах раку корелювали з цирозом печінки, HBsAg, метастазами, стадією TNM та інвазивністю

пухлини, були пов'язані з виникненням рецидивів та поганою виживаністю [110].

Довга некодуюча РНК PANDAR задіяна у регуляції транскрипції генів-онкосупресорів, призводячи до підвищення їх експресії, зокрема, в пухлинних тканинах сечового міхура. Так, дослідження Zhan зі співавторами показали, що при раку сечового міхура тканини пухлини характеризувались значно вищою експресією PANDAR порівняно з їх парними нормальними тканинами уротелію того самого пацієнта. Подібно до CRC та НСС, надмірна експресія цієї некодуючої РНК позитивно корелювала з розвиненою стадією TNM та високою гістологічною оцінкою. Сайленсинг PANDAR призводив до пригнічення проліферації та індукції апоптозу в клітинних лініях раку сечового міхура, тоді як надмірна експресія PANDAR спричинювала протилежні наслідки [111]. Припускається, що для раку сечового міхура PANDAR може виступати у якості онкогену, що, зокрема, робить його потенційним прогностичним біомаркером та мішенню для таргетної терапії цього захворювання.

Серед досліджених механізмів дії PANDAR найкраще описаними є наступні. Було виявлено, що дана днРНК виступає «приманкою» для ядерного транскрипційного фактору NF- κ B, таким чином заважаючи NF- κ B зв'язувати промотори низки активаторів апоптозу (APAF1, BIK, FAS, LDD), таким чином, пригнічуючи їх транскрипцію [112]. Крім того, було показано, що PANDAR може регулювати старіння клітин шляхом рекрутингу SAFA та PRC1 [113]. PANDAR контролює транскрипцію гена *CDKN1A* шляхом конкурентного зв'язування з білком p53. Було виявлено, що у поєднанні з активатором p53 нокаут PANDAR за технологією CRISPR/Cas9 синергійно пригнічує ріст пухлини шлунку *in vivo* [114].

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Хімічні реактиви та реагенти

В роботі використовувались хімічні реактиви компаній NEB (Великобританія), “Sigma-Aldrich” (США), Zymo Research (США). Використовувались ферменти компанії Solis BioDyne (Естонія), а саме 5x FIREPol® Master Mix Ready to Load, HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix, зворотня транскриптаза. Інгібітор РНКаз, Random hexamer і Oligo(dT) праймери. Праймери для проведення полімеразно-ланцюгових реакцій були синтезовані виробником “Invitrogene” (США).

2.2. Біологічні матеріали

2.2.1. Клітинні лінії. Клітинні лінії раку передміхурової залози DU145, PC3, LNCaP і клітинна дінія нормального залозистого епітелію передміхурової залози PNT2 були отримані з Банку клітинних ліній Каролінського університету, м. Стокгольм, Швеція.

2.2.2. Зразки тканин пухлин сечового міхура та передміхурової залози. Зразки тканини карциноми та парної умовно нормальної тканини (УНТ) передміхурової залози та сечового міхура заморожували в рідкому азоті відразу після хірургічної резекції, проведеної в Національному інституті раку (Київ, Україна). Доброякісні пухлини передміхурової залози (зразки аденоми простати) були зібрані в Інституті урології (Київ, Україна)

після радикальної простатектомії; зразки заморожували і транспортували в рідкому азоті і зберігали при температурі -80°C до виділення РНК та ДНК. Усі зразки були зібрані відповідно до Гельсінської декларації та вказівок, виданих Етичним комітетом Інституту урології, Національним інститутом раку та Етичним комітетом Інституту молекулярної біології та генетики. Зразки пухлин характеризувались згідно з Міжнародною системою класифікації пухлин та критеріями Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ).

Всього було зібрано 34 зразки пухлин і парних умовно нормальних тканин пацієнтів з РПЗ. З них 1 зразок був представлений пухлиною першої стадії, 26 належали пацієнтам з другою стадією РПЗ, 6 – пацієнтам з третьою стадією і один – пацієнту з четвертою стадією цього захворювання. Клініко-патологічні характеристики (КПХ) зразків тканин раку передміхурової залози та раку сечового міхура представлені у Додатку А, таблиця 1.

Було збрано і використано в даній роботі 24 зразки пухлинних та парних умовно нормальних тканин раку сечового міхура. З них 8 зразків пацієнтів з РСМ на другій стадії, 7 зразків пацієнтів з третьою стадією раку сечового міхура, 5 зразків отримано від пацієнтів з 4 стадією, для 6 ми не отримали КПХ. Клініко-патологічні характеристики (КПХ) зразків тканин раку передміхурової залози та раку сечового міхура представлені у Додатку Б.

2.2.3. Зразки сечі пацієнтів та умовно здорових донорів. Забір зразків проводили серед хворих із підтвердженим раком передміхурової залози та сечового міхура, а також у пацієнтів з запаленням. Серед пацієнтів були присутні як хворі з нещодавно вперше діагностованими онкологічними захворюваннями, так і хворі, що вже підлягали лікуванню. Усі зразки були набрані перед операційним втручанням. Забір зразків відбувався відповідно до Гельсінської декларації та вказівок, виданих

Етичним комітетом Інституту урології, Національним інститутом раку та Етичним комітетом Інституту молекулярної біології та генетики.

По 50–100 мл сечі збирали перед хірургічним втручанням у пацієнтів відділення пластичної та реконструктивної онкоурології Національного інституту раку і третього урологічного відділення Інституту урології НАМН України. Було зібрано 59 зразків сечі пацієнтів, хворих на рак передміхурової залози, з них двоє мали рак на першій стадії, 22 пацієнти мали другу стадію РПЗ, 18 – третю і 8 – четверту стадію раку. Для дев'яти пацієнтів КПХ не були надані. Кількість зібраних зразків раку сечового міхура, що увійшли у дослідження, становила 65. З них 14 були отримані від пацієнтів, що мали першу стадію РСМ, 22 – від пацієнтів з другою стадією раку, 13 пацієнтів з вибірки мали третю стадію і 8 четверту стадію РСМ. Для 7 пацієнтів КПХ не були отримані. Клініко-патологічні характеристики пацієнтів хворих на рак передміхурової залози і сечового міхура предствавлені в у Додатку А, таблиця 2 і у Додатку Б, відповідно.

Крім того, було зібрано 12 зразків пацієнтів з різноманітними не раковими захворюваннями сечостатевої системи, що супроводжувались запаленням, і зразки 16 осіб, що не мали симптоматики з боку сечостатевих органів та жодних діагностованих захворювань сечостатевої системи.

2.3. Культивування клітинних ліній

Три клітинні лінії раку передміхурової залози людини, PC3, DU145 та LNCaP і клітинна дінія нормального залозистого епітелію передміхурової залози PNT2, вирощували в середовищі DMEM, з додаванням 10% FBS при 37 ° С у зволоженій атмосфері 5% CO₂ / 95% повітря.

2.4. Первинна обробка зразків

2.4.1. Отримання кондиційованого середовища культивованих клітин. Клітини культивували до 70-80% конфлуентності на 100 мм культуральних чашках. З кожної чашки відбирали середовище у 2 мл центрифужну пробірку і центрифугували на $+4^{\circ}\text{C}$ на швидкості 850 g протягом 15 хвилин. Після цього супернатант обережно відбирали і переносили в іншу пробірку, ще раз центрифугували на 1000 g щоб позбутись залишків клітин та апоптичних тілеці. Після цього середовище заморожували на -80°C для зберігання, або одразу виділяли пкРНК.

2.4.2. Первинна обробка сечі. Сечу переливали у 50 мл центрифужні пробірки з кришкою і центрифугували 20 хвилин при температурі 4°C на швидкості 850 g. Після цього супернатант сечу відбирали у чисті 50 мл пробірки, а осаджені клітини разом з невеликим залишком супернатанту переносили у пробірки типу епендорф і центрифугували на швидкості 850 g 15 хв при температурі 4°C . Утворений супернатант зливали, клітини заморожували у низькотемпературному морозильнику на -80°C .

Сечу ще раз центрифугували на 1000 g щоб повністю позбутись клітин. Відбирали 1 мл безклітинної сечі у епендорфи (по 500 мкл в кожен) і заморожували на -80°C для подальшого використання.

Для преципітації циркулюючої ДНК із сечі використовували модифіковану методику, розроблену для преципітації олігонуклеотидів з розчину з використанням цетилметиламонію броміду (cetyltrimethylammonium bromide, СТАВ). У кожний зразок додавали СТАВ фінальною концентрацією 0,2 %. Після цього інкубували у холодильнику (20-30 хв) до утворення видимого осаду і центрифугували

на 2000 обертах. Відцентрифуговану сечу зливали, а осад, що залишився, розчиняли у лізувальному буфері з таким складом: додецилсульфат натрію (SDS) – 2 %, 10 мМ Tris (основа), 1,2 мМ ЕДТА, рН 8,0. Після цього переносили у пробірки ємністю 1,5 мл (по 400–500 мкл у пробірку) і додавали 10 мкл протеїнази К. Інкубували з протеїназою К при температурі 56 °С протягом 1–2 годин.

2.5. Виділення ДНК

2.5.1. Виділення пкДНК. Виділення ДНК проводили із застосуванням суміші фенол/хлороформ/ізоаміловий спирт (25:24:1).

Першим чином до осадів, сформованих 1% СТАБом, додавали 1,5-3 мл лізуючого буфера. Склад лізуючого буфера: 2%-ий додецилсульфат натрію (SDS); 10 мМ Tris; 1,2 мМ ЕДТА; рН 8,0. Лізис відбувається при кімнатній температурі до 1 години. Потім вміст переносили у пробірки типу епандорф (500 мкл у пробірку) і додавали до кожного 20 мкл протеїнази К. Залишали пробірки зі зразками у термостаті при температурі 50°C на 1 годину.

З метою позбутись нерозчинного осаду, який залишився після хімічного лізису та обробки протеїназою К, зразок центрифугували на 10 000 g протягом 10 хв. Супернатант відбирали у чисту пробірку і додавали суміш фенолу з хлороформом та ізоаміловим спиртом у співвідношенні 25:24:1 (рН 8.0), відповідно, для виділення ДНК. Потім перемішували вміст шляхом постійного перевертання протягом 10 хвилин та центрифугували 20 хвилин при 13 000 g.

Після центрифугування відбирали верхню фазу (супернатант) в окрему пробірку, не зачіпаючи нижню фазу. Для осадження ДНК додавали 10 мкл 3М ацетату натрію 500 мкл ізопропілового спирту. Інкубували зразки протягом 12 годин при температурі -20°C.

Для осадження ДНК пробірки центрифугували 15 хвилин при 13 000g, супернатант зливали та додавали до осаду 300 мкл 70%-ого етилового спирту для того, щоб відмити ДНК від залишкових домішків. Перемішували та центрифугували на максимальній швидкості 5 хвилин. Процедуру відмивання повторювали ще раз. Після цього супернатант зливали, а осад висушували при кімнатній температурі й розчиняли у 20 мкл TE-буфера. Зберігали зразки при -20°C у TE-буфері. Концентрацію ДНК оцінювали спектрофотометрично на спектрофотометрі NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific, Inc.).

2.5.2. Виділення геномної ДНК. Тканини попередньо подрібнювали у рідкому азоті до стану порошкоподібної маси. Клітини осаджували центрифугуванням.

Для попереднього лізису клітин та тканин використовували буфер складом 10 мМ Tris, 0,1 мМ ЕДТА, 0,5 % SDS, рН 8,0. Лізис відбувався при кімнатній температурі протягом 30 хв. Далі до зразків додавали протеїназу К (100мг/мл фінальна концентрація у зразку) і інкубували 3 години при температурі 50°C. Після цього додавали суміш фенолу з хлороформом та ізоаміловим спиртом у співвідношенні 25:24:1 (рН 8.0) і діяли відповідно до протоколу, описаного у пункті 2.5.1.

2.6. Виділення РНК

2.6.1. Попередня підготовка зразків. 50–70 мг заморожених тканин подрібнювали до стану порошку в рідкому азоті. Безклітинну сечу і кондиційоване середовище клітинних ліній розморожували на льоду.

2.6.2. Виділення тотальної РНК з клінічних зразків тканин і сечі, клітин та кондиційованого середовища. Загальну РНК екстрагували з

допомогою TRI-реагента (SIGMA), згідно з протоколом виробника. До зразків додавали 750 мкл Три-Реагента, ретельно перемішували і залишати при кімнатній температурі на 3-5 хв. Після цього додавали 200 мкл хлороформу і знову перемішували. Центрифугували на 12 000 G 15 хв. Верхню фазу, що містить РНК, відбирали в нові пробірки і додавали 750 - 1000 мкл ізопропанолу. Зразки добре перемішували і залишали на -20С на 12 год.

Наступного дня пробірки центрифугували і осаджували РНК. Супернатант зливали і двічі промивали осад 75% етиловим спиртом. Після цього давали РНК підсохнути (при кімнатній температурі) і розчиняли у вільній від нуклеаз воді.

Загальну концентрацію РНК аналізували спектрофотометром (NanoDrop Tech Experimental Technologies Inc., США).

2.7. Синтез першого ланцюга кДНК

кДНК синтезували з 1 мкг загальної РНК після обробки ДНКазою (Thermo Fisher Scientific, США), використовуючи RevertAid H-Minus M-MuLV Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific, США), згідно з протоколом виробника . Для синтезу використовували суміш oligoDT/random hexamer праймерів для покращення виходу реакції.

2.8. Кількісна ПЛР у реальному часі

Рівні експресії досліджуваних генів були виявлені за допомогою кількісної ПЛР у реальному часі з використанням HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus (Solis BioDyne, Естонія) на приладі CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, США) з наступними умовами реакції: 95 °С — 12 хв, 40 циклів: 95 °С — 15 сек, 60 °С — 20 сек, елонгація 72 °С — 20 сек.

TBP і *beta-Actin* використовувались у якості референсних генів. Усі послідовності праймерів наведено в таблиці. Методи $2^{-\Delta CT}$ і $2^{-\Delta\Delta CT}$, описані у [115] були використані для підрахунку результатів.

Таблиця 2.1

Послідовності праймерів, що використовувались для кількісної ПЛР

<i>AURKA</i> [116]	Прямий 5'-CTGCATTTTCAGGACCTGTТАAGG-3'
	Зворотній 5'-AACGCGCTGGGAAGAATTT-3'
<i>AURKB</i> [116]	Прямий 5'-AACTCCTACCCCTGGCCCTA-3'
	Зворотній 5'-ACAAGTGCAGATGGGGTGAC-3'
<i>AURKC</i> [116]	Прямий 5'-CGCATCCTCAAGGTAGATGTG-3'
	Зворотній 5'-GAACACACACAAAGGGAACAGAG-3'
<i>BRAF</i> [117]	Прямий 5'-GTGGATTATGCTCCCCACC-3'
	Зворотній 5'-CTGCCATTCCGGAGGAG-3'
<i>PANDAR</i> [118]	Прямий 5'-CTGTТАAGGTGGTGGCATTG-3'
	Зворотній 5'-GGAGGCTCATACTGGCTGAT-3'
<i>Beta-Actin</i> [119]	Прямий 5'-TGACGTGGACATCCGCAAAG-3'
	Зворотній 5'-CTGGAAGGTGGACAGCGAGG-3'
<i>TBP</i>	Прямий 5'- TGCACAGGAGCCAAGAGTGAA -3'
	Зворотній 5'- CACATCACAGCTCCCCACCA -3'

2.9. Бісульфитна обробка ДНК

Метод полягає у попередній денатурації ДНК та перетворенні неметильованих цитозинових нуклеотидів (C) в урацилові (U) (рис. 2.1).

Бісульфітна обробка:

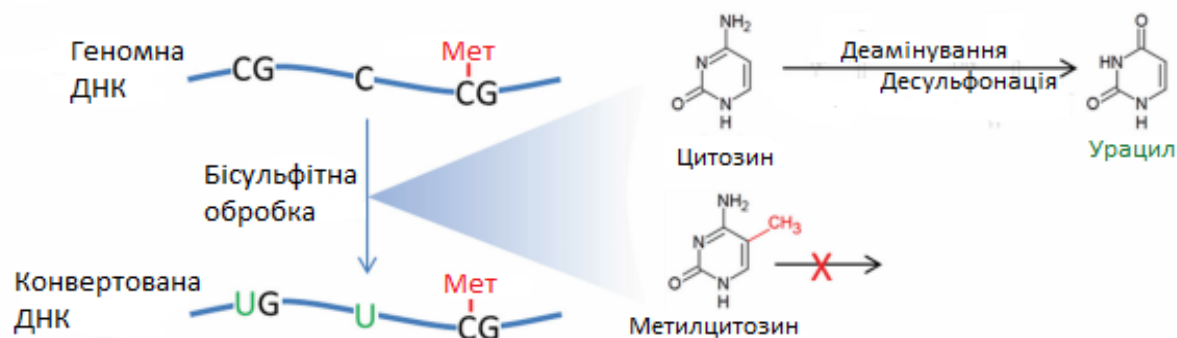


Рис.2.1. Схема бісульфітної обробки ДНК [114]

Попередня бісульфітна обробка зразків ДНК була виконана за допомогою реagentів набору EZ DNA Methylation-Lightning™ Kit (Zymo Research) згідно з протоколом виробника.

Приготовляли розчин M-Wash Buffer: додавали 24 мл 100% етилового спирту до 6 мл комерційного M-Wash Buffer концентрату, або 96 мл 100% етилового спирту до 24 мл комерційного M-Wash Buffer концентрату.

Додавали 130 мкл, приготованого заздалегідь, CT Conversion Reagent до 20 мкл зразку ДНК в ПЛР-пробірку, таким чином в сумарному отримали 150 мкл суміші. Такі дії повторювали з усіма зразками.

Перемішували та інкубували наступним чином: 98⁰С – 8 хв., 54⁰С – 60 хв., 4⁰С – зберігання (до 20 год.). Додавали 600 мкл M-Binding Buffer у колонку Zymo-Spin IC Column та поміщали колонку у збиральну пробірку. До M-Binding Buffer додавали зразок після інкубації та перемішували.

Центрифугували на максимальній швидкості 30 сек. та зливали рідину у збиральній пробірці. Додавали 100 мкл M-Wash Buffer у колонки, центрифугували на максимальній швидкості 30 сек. Додавали 200 мкл L-Desulphonation Buffer у колонки та залишали за кімнатної температури 15-20 хв. Після інкубації центрифугували на максимальній швидкості 30 сек.

Після цього до зразків додавали 200 мкл M-Wash Buffer та центрифугували за тих же умов. Етап відмивання повторювали двічі. Колонку поміщали у 1,5 мл еппендорф та додавали 10 мкл L-Elution Buffer залишали на 5-10 хв. та центрифугували на максимальній швидкості 30 сек. Концентрацію ДНК вимірювали спектрофотометрично (NanoDrop™ 2000, Thermo Fisher Scientific, Inc.).

Зберігали зразки при температурі -20°C (для довготривалого зберігання зразків ДНК – при температурі -80°C).

2.10. Створення повністю метильованої ДНК

Повністю метильована ДНК для контролю якості праймерів створювалась за допомогою MSSI метилтрансферази компанії NEB (Великобританія). До 1 мкг виділеної ДНК додавали 5 мкл реакційного буферу, 5 мкл попередньо приготованого 1600 мкМ S—аденозилметіоніну (донор метильної групи), 1 мікролітр ферменту метилтрансферази і доводили водою, вільною від нуклеаз, до об'єму 50 мкл.

Після цього суміш ретельно перемішували і інкубували у термостаті при температурі 37°C протягом 1 години. Реакцію зупиняли прогріванням до 65°C протягом 10 хв.

2.11. Метил-специфічна ПЛР

2.11.1. Дизайн праймерів для метил-специфічної ПЛР. Праймери до метильованої (M-Methylated) та неметильованої (U-Un methylated) форм досліджуваних генів розробляли за допомогою програмного забезпечення Methyl Primer Express® Software v1.0.

Програмне забезпечення Methyl Primer Express Software v1.0 дає можливість створювати праймери до послідовностей ДНК, які

використовуватимуться в подальшому в ПЛР, та бісульфітно конвертованої ДНК. Воно є багатофункціональним, оскільки знаходить CpG-острівці, може імітувати бісульфітну конверсію, і використовує отриману інформацію для дизайну праймерів.

Для дизайну праймерів для метил-специфічної ПЛР були застосовані наступні критерії (відповідно до рекомендацій, наданих у [120]):

1. Праймери повинні містити принаймні один (за можливості більше одного) сайт CpG у своїй послідовності, і сайт CpG повинен бути бажано розташований у самому 3'-кінці їх послідовності, щоб розрізнити максимально метильовану ДНК проти неметильованої ДНК.

2. Праймери повинні мати достатню кількість не-CpG 'цитозинів у своїй послідовності, щоб ампліфікувати лише бісульфітно модифіковану ДНК. Проте при виборі перевагу слід надавати приймам з більшою кількістю цитозинів у складі CpG

3. Праймери для метильованої ДНК (пара M) та для неметильованої ДНК (пара U) повинні містити однакові сайти CpG у своїй послідовності, але можуть відрізнятися довжиною і початковим положенням.

4. Бажано, щоб пара M і U пара мали подібну температуру гібридизації.

2.11.2. Метил-специфічна ПЛР (МСП). ПЛР бісульфітно обробленої ДНК із сечі проводили за допомогою 5X FIREPol® Master Mix Ready to Load (Solis BioDyne). Умови реакції були наступні: 95 ° C протягом 12 хв, 40 циклів дисоціації при 95 ° C 20 секунд, гібридизація праймерів при 60 ° C протягом 20 секунд і подовження при 72 ° C протягом 20 секунд, з подальшим остаточним подовженням 72 ° C протягом 7 хвилин. Послідовності праймерів наведено у таблиці 2.2.

Таблиця 2.2

Послідовності праймерів,
що використовувались для МСП та кількісної МСП

<i>NKX3.1-M</i>	Forward 5' CGGAGCGGGGTAGTGTTTAGGGTTC 3'
	Reverse 5' TCCCATTAACCGCGAAACGAACC 3'
<i>NKX3.1-U</i>	Forward 5' GTAGTGTTTAGGGTTTGTAGATT 3'
	Reverse 5' CCACAAAACAAACCACACC 3'
<i>PTEN-M</i>	Forward 5' AGGTTTAGTTCGTTATTTTCGTTTCGC 3'
	Reverse 5' TAAAАCTTACTCGAACCGATTCCCAA 3'
<i>PTEN-U</i>	Forward 5' TAGTTTGTTATTTTTGTTTTGT 3'
	Reverse 5' CAAACCAATTCCCAACCACCAA 3'
<i>CDH1-M</i>	Forward 5' AGGTTAGAGGGTTATCGCGTTTATGC 3'
	Reverse 5' ACCACAACCAATCAACAACGCGAA 3'
<i>CDH1-U</i>	Forward 5' TTATTGTGTTTATGTGAGGTTGGGT 3'
	Reverse 5' TTATTGTGTTTATGTGAGGTTGGGT 3'
<i>GDF15-M</i>	Forward 5' TGTTGTTGGTGTTTTTCGTGGTTGTC 3'
	Reverse 5' AAATCCCGAAAACTTACGCGACTC 3'

<i>GDF15-U</i>	Forward 5' GTTTTTGTGGTTGTTGTATGGGGGT 3'
	Reverse 5' AAAAАCTTACACAАCTCACCTCA 3'
<i>KRT18-M</i>	Forward 5' GGATGGTTTCGATTTTTTGATTTC 3'
	Reverse 5' TAACCGAACGCAATAАCTCACGCCT 3'
<i>KRT18-U</i>	Forward 5' GTTTTGATTTTTTGATTTTGTGATTT 3'
	Reverse 5' CACAATAАCTCACACCTAT 3'
<i>RASSF1A-M</i>	Forward 5' GGTTTTGCGAGAGCGCGTTTAGTTTC 3'
	Reverse 5' CTAAAAAAAACCGCGCAATAAAAAAC 3'
<i>RASSF1A-U</i>	Forward 5' GTGAGAGTGTGTTTAGTTTT 3'
	Reverse 5' ACCACACAATAAAAAACCTAAATA 3'
<i>MYO3A -M</i>	Forward 5' CGTCGGGTTTCGGGTТАAGGAAGCGC 3'
	Reverse 5' ACCCGCAAATAAAAAACCGCGCCATC 3'
<i>MYO3A-U</i>	Forward 5' GTTTTGGGTTAAGGAAGTGT 3'
	Reverse 5' AAAAACCACACCATCCACA 3'
<i>TMEFF2-M</i>	Forward 5' GTGAGAGTGTGTTTAGTTTT 3'

	Reverse 5' ACCACACAATAAAAACCTAAATA 3'
<i>TMEFF2-U</i>	Forward 5' GTGAGAGTGTGTTTAGTTTT 3'
	Reverse 5' ACCACACAATAAAAACCTAAATA 3'
<i>VIM-M</i>	Forward 5' CGGTGAGTTATCGTCGGTGATTAAGC 3'
	Reverse 5' CCAACTTCGAACGACGAAAATTACG 3'
<i>VIM-U</i>	Forward 5' GTTATTGTTGGTGATTAAGT 3'
	Reverse 5' CAACAAAAATTACAAAACAACAA 3'
<i>COL2A1</i>	Forward 5' GTAATGTTAGGAGTATTTTGTGGGTA 3'
	Reverse 5' CTACCCCAAAAAACCCAATCCTA 3'

2.12. Електрофорез в агарозному гелі

Продукти МСП аналізували електрофоретично із використанням 2,5% агарозного гелю, 100 мА, у буферній системі ТБЕ на наявність або відсутність метильованих та неметильованих фрагментів.

2.13. Кількісна метил-специфічна ПЛР

Для проведення кількісної метил-специфічної ПЛР використовуючи HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus (Solis BioDyne, Естонія) та CFX96 система виявлення в реальному часі PCR (Bio-Rad, США) при таких

умовах: 95 ° C - 12 хв, наступні 40 циклів 95 ° C —15 с, 60 ° C - 20 с, елонгація 72 ° C - 20 с, і етап плавлення ПЛР продукту від 65°C до 95 °C з кроком 0,5°C, 5 msec, 60 циклів. У якості референчного гену для кількісної МСП використовували *Col2A1*. Кількісне визначення відносної кількості метильованої та неметильованої форми генів проводили методом $2^{-\Delta Ct}$, де $\Delta Ct = Ct (Col2A1) - Ct (гену-інтересу (метильований або неметильований))$. Потім рівень метилювання розраховували за допомогою рівняння: [відносна кількість метильованого гена] / [відносна кількість метильованого + відносна кількість неметильованого гена].

2.14. Методи біоінформатичного аналізу

У нашому дослідженні було використано наступні алгоритми і бази даних:

LncBook, <https://bigd.big.ac.cn/lncbook/index>, база даних, що надає інформацію про мікроРНК, які можуть взаємодіяти з довгою некодуючою РНК інтересу. У пошукове поле головної сторінки вводили загально-прийнятту назву довгої некодуючої РНК. В результаті пошуку отримали таблицю, що містила наступну інформацію: ідентифікаційний номер транскрипту у базі, ідентифікаційний номер гену у базі, загально-прийнята назва гену, класифікацію, біологічну роль, та доведені патологічні стани в розвитку яких може приймати участь. При натисканні на ідентифікаційний номер отримали загальну характеристику та номенклатуру, сиквенс, кодуєчий потенціал, посилання на літературу, рівні експресії, рівні метилювання, варіації, взаємодії, функції, участь у розвитку патологічних станів. У вкладці "Interaction" (взаємодії) ми отримуємо інформацію щодо передбачених мікро РНК, які здатні взаємодіяти з довгою некодуючою РНК інтересу. Всі передбачені мікро РНК розташовані в таблиці, в якій також зазначена така інформація як:

ідентифікаційний номер в базі даних, імовірність можливості зв'язування довгою некодуючою РНК інтересу цієї мікро РНК, енергія зв'язку, координати ділянок зв'язування. Отримані мікроРНК відсортовували за критерієм сили взаємодії від більшого до меншого і відібрали 50 результатів. Експортування даних проводила вручну у робочі файли формату xls;

Oncomir, dbDEMС 2.0 та miRCancer - бази даних які містять інформацію, щодо участі мікро РНК у розвитку раку;

DIANAtools (TarBase v.8), особливістю якого є використання найбільш релевантної моделі термодинамічних взаємодій між ланцюгами РНК. Цей алгоритм передбачає взаємодію по усім можливим ділянкам матричної РНК, що розширює поле результатів. Він має доступ до баз даних як мікроРНК так і генів, що дозволяє йому аналізувати масиви даних а не окремі взаємодії. Нами було використано його доступ до бази даних експериментально підтверджених взаємодій. Алгоритм є загальнодоступним за посиланням: http://carolina.imis.athena-innovation.gr/diana_tools/web/index.php?

miRNAs		Genes				
hsa-miR-1976 ✕ hsa-miR-6761-5p ✕ hsa-miR-6893-5p ✕ Show all Clear all		PTK2 ✕ NUDCD1 ✕ DECR1 ✕ Show all Clear all				
1	2	3	4	5	6	7
↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
Interactions: 3, Experiments: 3 (low: 0, high: 3, unknown: 0)	Genes: 1, Tissues: 1, Publications: 1					
Gene name	miRNA name	Experiments throughput	Publications	Cell lines	Tissues	Pred. Score
SCRIB ⓘ	hsa-miR-1976 ⓘ	low: 0 high: 1	1	1	1	0.531
ZNF7 ⓘ	hsa-miR-940 ⓘ	low: 0 high: 1	1	1	1	-
OSGIN2 ⓘ	hsa-miR-940 ⓘ	low: 0 high: 1	1	1	1	0.451

Рис. 2.2. Результати аналізу алгоритмом TarBase v.8: 1 - назва гену, 2 - назва мікро РНК, 3 - якість взаємодії в експерименті, 4 - посилання на публікації, 5 - клітинні лінії на яких проводилось дослідження, 6 - тканини в яких проводилось дослідження, 7 - імовірність взаємодії передбачена алгоритмом DIANAtools

ToppMiR – алгоритм, створений в 2015 році, використовує базу даних toppGene, яка має 22000 генів та отримує доступ до 5 альтернативних баз даних мікро РНК. Може як аналізувати вже експериментально підтверджені взаємодії, так і передбачати взаємодії базуючись на алгоритмі TargetScan. Алгоритм є загальнодоступним за посиланням: <https://toppmir.cchmc.org/>

miRNet є найбільшою базою алгоритмів для аналізу молекулярних взаємодій в клітинах. Його особливістю є можливість побудови карт взаємодій. Окрім експериментально підтверджених взаємодій цей алгоритм автоматично визначає можливість інших інтеракцій та моделює їх. Для побудови точної карти взаємодій алгоритм використовує найбільш просунуті технології моделювання, що дозволяє покращити вихідний

результат аналізу. Алгоритм є загальнодоступним за посиланням: <https://www.mirnet.ca/miRNet/home.xhtml>

2.15. Методи статистичної обробки

Для аналізу нормальності розподілу використовували тест Колмогорова - Смірнова. Тест Крускала-Волліса та пост-hoc тест Данн-Бонфероні були проведені для визначення різниці відносної експресії між групами зразків. Для порівняння пар пухлина/умовно нормальна тканина використовувався тест Вілкоксона для попарних порівнянь. Точний тест Фішера проводили для відстеження відмінностей між групами зразків. Тест рангової кореляції Спірмена був використаний для виявлення передбачуваних кореляційних зв'язків. Для порівняння незалежних виборок проводили тест Манна-Вітні. MDR, аналіз логістичної регресії та ROC-аналіз були використані для виявлення можливих асоціацій між наявністю потенційних маркерів раку передміхурової залози та раку сечового міхура у різних комбінаціях. Для виконання всіх перелічених тестів та візуалізації даних використовувались програми STATISTICA 10, Microsoft Excel, Sigma Plot, Displayr (<https://app.displayr.com/>) та Prism by GraphPad.

РОЗДІЛ 3

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

3.1. Метилювання потенційних генів-онкосупресорів у клінічних зразках пацієнтів та клітинних лініях раку передміхурової залози

3.1.1. Метилювання *VIM*, *PTEN*, *RASSF1A*, *NKX3.1*, *KRT18* і *CDH1* у клітинних лініях раку та у тканинах раку передміхурової залози. Нами було проведено кількісний аналіз метилювання генів *VIM*, *PTEN*, *RASSF1A*, *NKX3.1*, *KRT18* і *CDH1* і визначено відносні рівні їх метилювання у трьох клітинних лініях раку передміхурової залози і у 15 парах аденокарцином та прилеглих умовно-нормальних тканин пацієнтів з раком передміхурової залози.

3.1.1.1. Метилювання промоторів генів *PTEN*, *CDH1*, *NKX3.1* і *KRT18*, *RASSF1A* і *VIM* у клітинних лініях раку передміхурової залози. Було проаналізовано рівні метилювання промоторів генів *PTEN*, *CDH1*, *NKX3.1* і *KRT18*, *RASSF1A* і *VIM* у клітинних лініях раку передміхурової залози, а саме PC3, LNCaP і DU145, за допомогою кількісної метил-специфічної ПЛР.

Ми виявили, що серед досліджуваних генів найвищий рівень метилювання спостерігався у гена *NKX3.1* (Рис.3.1(А)). Натомість, рівень метилювання промотора гена *CDH1* був стабільно низький у всіх досліджуваних клітинних лініях, при чому найнижчий рівень його метилювання спостерігався у клітин лінії DU145. Промотор гена *KRT18*, що також наряду з *CDH1* вважається одним з маркерів епітелійних клітин, мав найвищий рівень метилювання у DU145 і найнижчий у PC3.

Метилування промотору гена *PTEN* мало контрастні показники у клітинних лініях PC3 і LNCaP. У PC3 рівень метилування промоторних послідовностей *PTEN* перевищував 0,9, у той час як у LNCaP цей показник складав близько 0,2. Промотор гену *RASSF1A* був практично повністю гіперметильований у клітинній лінії PC3 і демонстрував середні рівні метилування у двох інших клітинних лініях (0,688 у клітинах лінії LNCaP і 0,692 у DU145). Для гену *VIM* ми виявили тотальне метилування промоторних послідовностей (відсутність неметильованої форми).

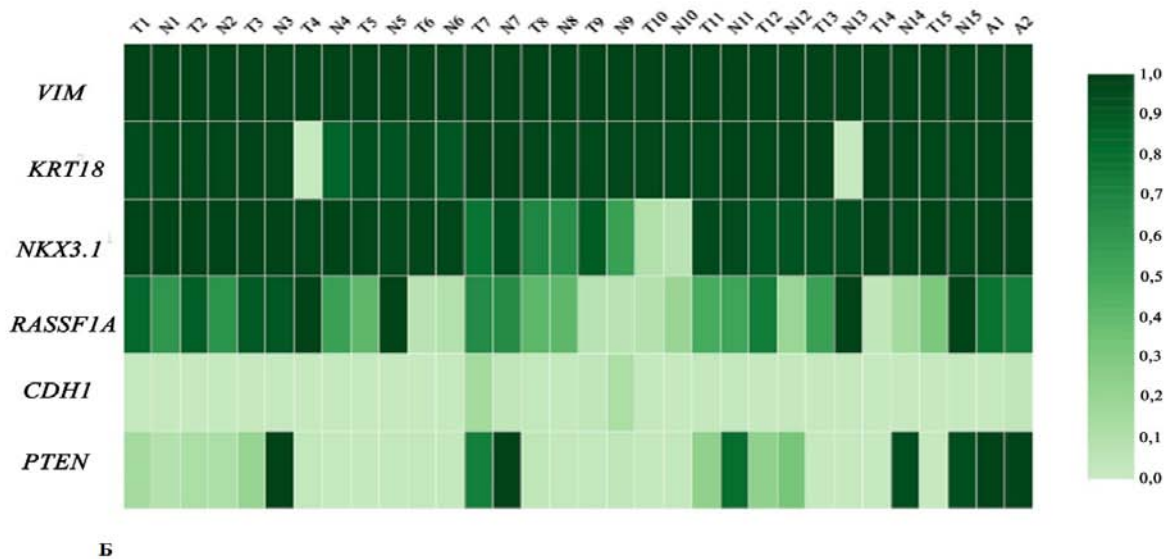
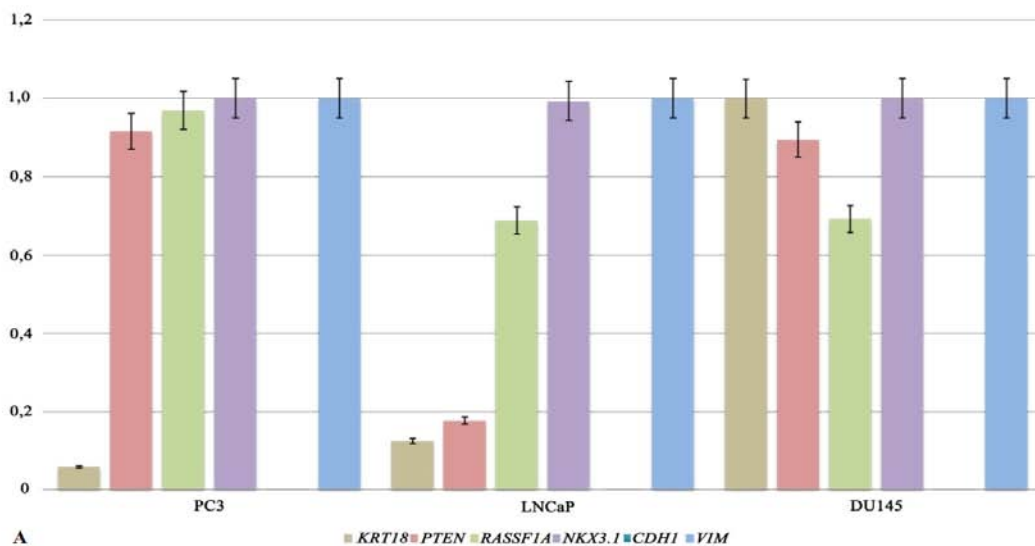


Рис 3.1. Метилування *VIM*, *PTEN*, *RASSF1A*, *NKX3.1*, *KRT18* і *CDH1* у клітинних лініях РПЗ (А) та у тканинах раку передміхурової залози (Б)

3.1.1.2. Метилування промоторів генів у зразках тканин пацієнтів з РПЗ. Всі гени з набору, крім *VIM*, при аналізі методом кількісної метил-специфічної ПЛР, виявили різні рівні метилування промоторів у зразках аденокарцином передміхурової залози і парних прилеглих зразках нормальних тканин (рис. 3. 1 (Б)). Ген, що кодує віментин, був повністю заметильований у всіх зразках. Інші гени продемонстрували наступні патерни метилування: промотори *NKX3.1* і *KRT18* були майже тотально метильовані (медіана становила 0,98 для обох генів), проте були поодинокі зразки з дуже низьким відносним рівнем метилування промоторів цих генів. Рівні метилування промотора гена *CDH1* були низькими у всіх досліджуваних зразках (максимальне значення спостерігалось у одному зі зразків аденокарцином і становило 0,15). Для гену *PTEN* високими відносними рівнями метилування його промотору відзначились контрольні зразки аденом А1 і А2 (1 і 0,98 відповідно). З проаналізованих зразків тканин хворих на РПЗ 6 мали рівень метилування гену *PTEN* більше 0,5. Серед них тільки один зразок належав до групи аденокарцином, а решта 5 були представлені прилеглими УНТ. Промотор *RASSF1A* продемонстрував найбільшу різноманітність рівнів метилування серед досліджуваних генів, що коливався від 0,03 до 1 у різних зразках (рис. 1 (Б)).

3.1.1.3. Різниця у відносних рівнях метилування між пухлинами та парними умовно нормальними тканинами. Для порівняння відносних рівнів метилування промоторів досліджуваних генів у злоякісних пухлинах РПЗ та прилеглих до них нормальних тканинах передміхурової залози був використаний тест відповідності пар Вілкоксона. У результаті ми не виявили статистично достовірних відмінностей між групами, що аналізувались. Також ми не виявили суттєвих відмінностей у рівнях метилування промоторів досліджуваних

генів між ранньою (1-2) та пізньою (3-4) стадіями зразків раку передміхурової залози.

3.1.1.4. Кореляція відносних рівнів метилювання досліджуваних генів між пухлиною, парними умовно нормальними тканинами, експресією генів та клініко-патологічними характеристиками. Ми спостерігали позитивні кореляційні зв'язки між показниками метилювання промоторів трьох генів, а саме *CDH1*, *PTEN* та *NKX3.1*, у пухлинах та парних гістологічно нормальних тканинах. Аналіз було проведено з використанням кореляційного тесту Спірмана. Кореляція відносних рівнів метилювання промотору *CDH1* між парами TN становила $r_s = 0,771$, $p = 0,000231$, а кореляція між парами TN у метилюванні промотору *PTEN* становила $r_s = 0,668$, $p = 0,00614$. Для *NKX3.1* коефіцієнт кореляції становив $r_s = 0,851$ з $p = 0,0000002$. Ці результати означають, що більш високе метилювання *CDH1*, *PTEN* та *NKX3.1* у пухлині відповідає вищому метилюванню в прилеглій нормальній тканині передміхурової залози того самого пацієнта.

Раніше ми вивчали відносну експресію досліджених генів в аденокарциномах передміхурової залози і у прилеглих нормальних тканинах. Це дало можливість проаналізувати вибірку на предмет виявлення можливих кореляційних зв'язків між метилюванням промоторів цих генів та їх експресією. Нами було проведено кореляційний аналіз з використанням критерію Спірмана як для усіх зразків (аденокарцином і парних УНТ), так і окремо для аденокарцином (таблиця 3.1. і таблиця 3.2 відповідно). Аналіз кореляційних зв'язків між метилюванням та експресією досліджуваних генів показав відсутність статистично достовірних кореляцій між цими показниками для одного і того ж гена. Натомість, ми виявили деякі кореляційні зв'язки між рівнями метилювання та відотною експресією різних генів всередині нашого набору. У тканинах аденокарцином рівні метилювання промоторів *NKX3.1* і *CDH1*

негативно корелювали між собою ($r_s = -0,686$, $p < 0,01$), тоді як їх відносні рівні експресії корелювали позитивно ($r_s = 0,696$, $p < 0,01$). Метилування промотора *RASSF1A* негативно корелювало з експресією гена *PTEN* ($r_s = -0,789$, $p < 0,01$) (таблиця 3.2).

Крім того, для зразків аденокарцином ми проаналізували кореляцію між даними щодо метилування у зразках пухлин і клініко-патологічними характеристиками пацієнтів. Оцінюючи кореляцію між сумою балів за шкалою Глісона (СГ) та рівнем метилування досліджуваних генів, ми виявили тільки одну статистично достовірну при $p < 0,05$ кореляцію, а саме: рівень метилування промотора *KRT18* у тканинах раку передміхурової залози негативно корелював з СГ ($s = -0,593$) (таблиця 3.2).

Не було виявлено жодних кореляційних зв'язків між метилуванням промоторів досліджуваних генів та іншими клініко-патологічними характеристиками пацієнтів, такими як вік пацієнта, стадія раку та рівень ПСА в крові. Усі дані кореляції для зразків групи аденокарцином наведені в таблиці 3.2.

Таблиця 3.1.

Кореляції між кількісними показниками метилювання промоторів та експресією досліджуваних генів у тканинах аденокарцином та УНТ

	<i>KRT18</i> _M	<i>PTEN</i> _M	<i>RASSF</i> _M	<i>NKX</i> _M	<i>CDH</i> _M	<i>VIM</i> _M	<i>CDH1</i>	<i>NKX3</i>	<i>KRT18</i>	<i>VIM</i>	<i>PTEN</i>
<i>KRT18</i> _M	1,00	0,46	-0,16	0,06	0,29	0,01	0,09	0,19	0,10	0,27	0,21
<i>PTEN</i> _M	0,46	1,00	0,32	0,03	0,28	-0,03	-0,11	0,22	-0,06	0,02	0,03
<i>RASSF</i> _M	-0,16	0,32	1,00	0,23	-0,29	-0,20	-0,13	0,05	0,18	-0,42	-0,53
<i>NKX</i> _M	0,06	0,03	0,23	1,00	-0,64	0,11	0,37	0,43	0,21	-0,33	-0,07
<i>CDH</i> _M	0,29	0,28	-0,29	-0,64	1,00	-0,30	-0,23	-0,12	-0,08	0,26	0,16
<i>VIM</i> _M	0,01	-0,03	-0,20	0,11	-0,30	1,00	-0,06	-0,13	-0,08	0,25	-0,10
<i>CDH1</i>	0,09	-0,11	-0,13	0,37	-0,29	-0,06	1,00	0,76	0,32	-0,41	0,14
<i>NKX3</i>	0,19	0,22	0,05	0,43	-0,12	-0,13	0,76	1,00	0,34	-0,59	-0,06
<i>KRT18</i>	0,10	-0,06	0,18	0,21	-0,08	-0,08	0,32	0,34	1,00	-0,17	-0,42
<i>VIM</i>	0,27	0,02	-0,42	-0,33	0,26	0,25	-0,41	-0,56	-0,17	1,00	0,30
<i>PTEN</i>	0,21	0,03	-0,53	-0,07	0,16	-0,10	0,14	-0,06	-0,42	0,30	1,00

Примітка: червоний – $p < 0,05$, червоний напівжирний – $p < 0,01$. СГ- сума за шкалою Глісона

Таблиця 3.2.

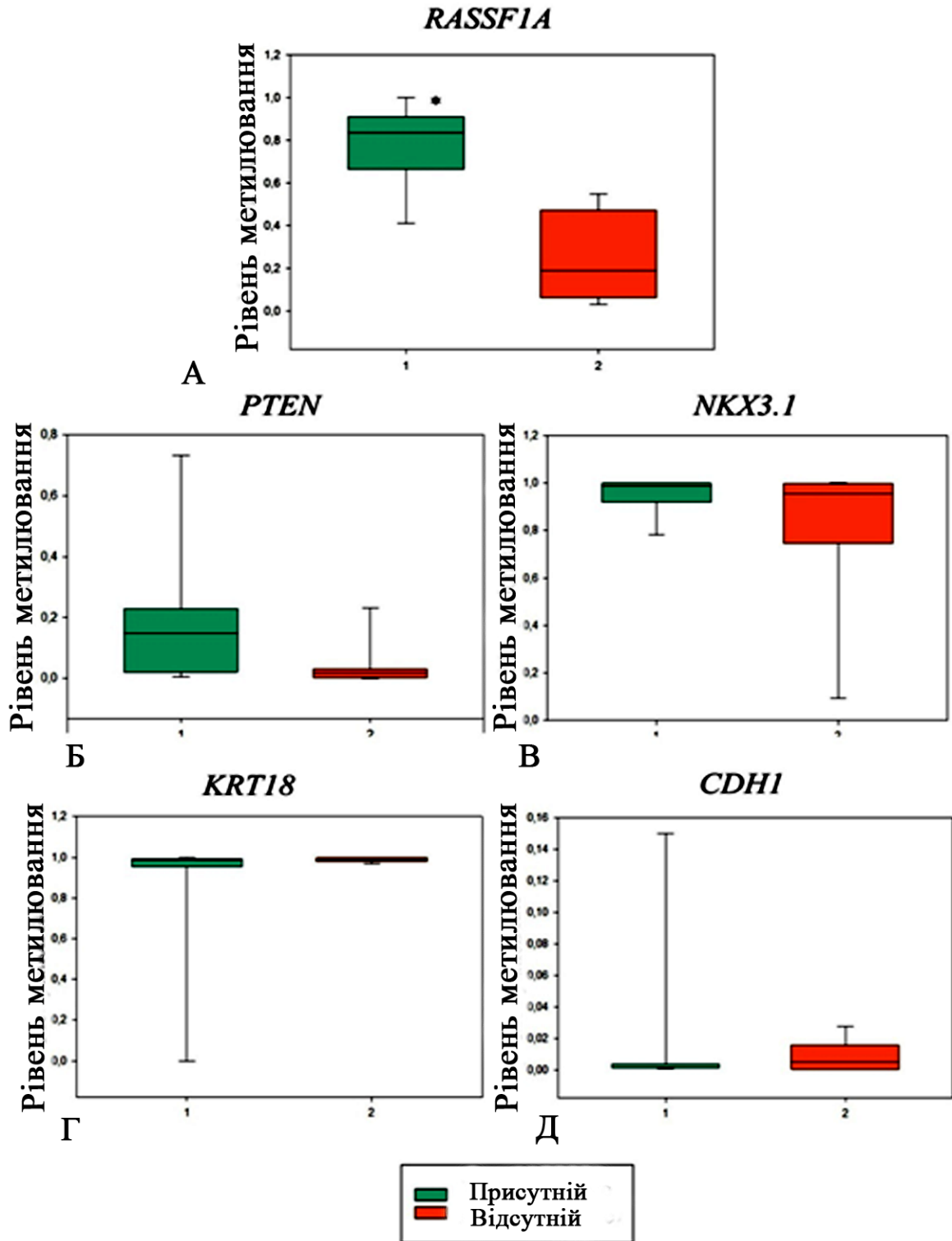
Кореляції між кількісними показниками метилювання промоторів, експресією досліджуваних генів та КПХ у тканинах аденокарцином

	KRT18_M	PTEN_M	RASSF_M	NKX_M	CDH_M	VIM_M	CDH1	NKX3	KRT18	VIM	PTEN	СГ	ПСА нг/мл	Стадія	Вік
KRT18_M	1,00	-0,05	-0,06	0,12	0,04	0,08	0,16	-0,06	-0,16	0,23	0,14	-0,59	-0,04	-0,26	-0,14
PTEN_M	-0,05	1,00	0,61	-0,14	0,33	-0,05	-0,29	0,02	0,11	-0,14	-0,28	0,16	0,31	-0,07	0,02
RASSF_M	-0,06	0,61	1,00	0,05	-0,12	0,01	-0,14	0,19	0,60	-0,29	-0,79	-0,12	0,35	0,01	0,10
NKX_M	0,12	-0,16	0,05	1,00	-0,69	0,16	0,34	0,43	0,10	0,03	0,04	-0,45	0,08	-0,18	0,25
CDH_M	0,04	0,33	-0,12	-0,69	1,00	-0,30	-0,08	-0,11	-0,01	-0,05	0,26	0,31	-0,06	0,11	0,16
VIM_M	0,08	-0,05	0,01	0,16	-0,30	1,00	-0,17	-0,34	-0,29	0,33	-0,22	0,03	0,28	0,12	-0,21
CDH1	0,16	-0,29	-0,14	0,34	-0,08	-0,17	1,00	0,70	0,31	-0,25	-0,03	-0,56	-0,39	-0,69	0,48
NKX3.1	-0,06	0,02	0,19	0,43	-0,11	-0,34	0,70	1,00	0,50	-0,56	-0,24	-0,38	-0,43	-0,49	0,60
KRT18	-0,16	0,11	0,60	0,10	-0,01	-0,29	0,31	0,50	1,00	-0,09	-0,61	-0,12	-0,03	-0,19	0,18
VIM	0,23	-0,14	-0,29	0,03	-0,05	0,33	-0,25	-0,56	-0,09	1,00	0,29	-0,06	0,18	0,01	-0,48
PTEN	0,14	-0,28	-0,79	0,04	0,26	-0,22	-0,03	-0,24	-0,61	0,29	1,00	0,01	-0,05	0,05	0,12
СГ	-0,59	0,16	-0,12	-0,45	0,31	0,03	-0,56	-0,38	-0,12	-0,06	0,01	1,00	0,07	0,50	-0,31
ПСА нг/мл	-0,04	0,31	0,35	0,08	-0,06	0,28	-0,39	-0,43	-0,03	0,18	-0,05	0,07	1,00	0,14	-0,13
Стадія	-0,29	-0,07	0,01	-0,18	0,11	0,12	-0,69	-0,49	-0,19	0,01	0,05	0,50	0,14	1,00	-0,14
Вік	-0,14	0,02	0,10	0,25	0,16	-0,21	0,48	0,60	0,18	-0,48	0,12	-0,31	-0,13	-0,14	1,00

Примітка: червоний – $p < 0,05$, червоний напівжирний – $p < 0,01$. СГ- сума за шкалою Глісона

3.1.1.5. Різниця в патерні метилювання між TMPRSS2:ERG позитивними та негативними аденокарциномами. Гібридний транскрипт TMPRSS2:ERG є однією з найпоширеніших і широко вивчених генетичних змін при раку передміхурової залози, хоча його функціональна роль до кінця не вивчена. Проте було показано його зв'язок з наявністю метастазів, кількома прогностичними маркерами РПЗ, високим балом за системою оцінки Глісона та змінами в стромі пухлини. Цей аномальний гібридний транскрипт є характерним для раку передміхурової залози з більш агресивним фенотипом.

Ми провели кількісний аналіз метилювання промоторів всіх досліджених генів аденокарциноми передміхурової залози (рис. 3.2), згрупованих за наявністю або відсутністю транскрипту TMPRSS2:ERG. Для визначення значущих відмінностей між тканинами раку з гібридним транскриптом та без нього був використаний тест Манна-Вітні. Ми виявили статистично достовірну різницю у рівнях метилювання промотора *RASSF1A* між цими групами з вищим рівнем його метилювання у зразках, у яких було визначено присутність гібридного транскрипту ($t = 4,98$, $p < 0,001$) (рис. 3.2 (А)). Інших відмінностей у рівнях метилювання промоторів досліджуваних генів між даними групами не було виявлено (рис. 3.2 (Б-Д)).



Наявність гібридного транскрипту

Рис. 3.2. Метилювання досліджуваних генів у групах з присутнім та відсутнім гібридним транскриптом TMPRSS2:ERG

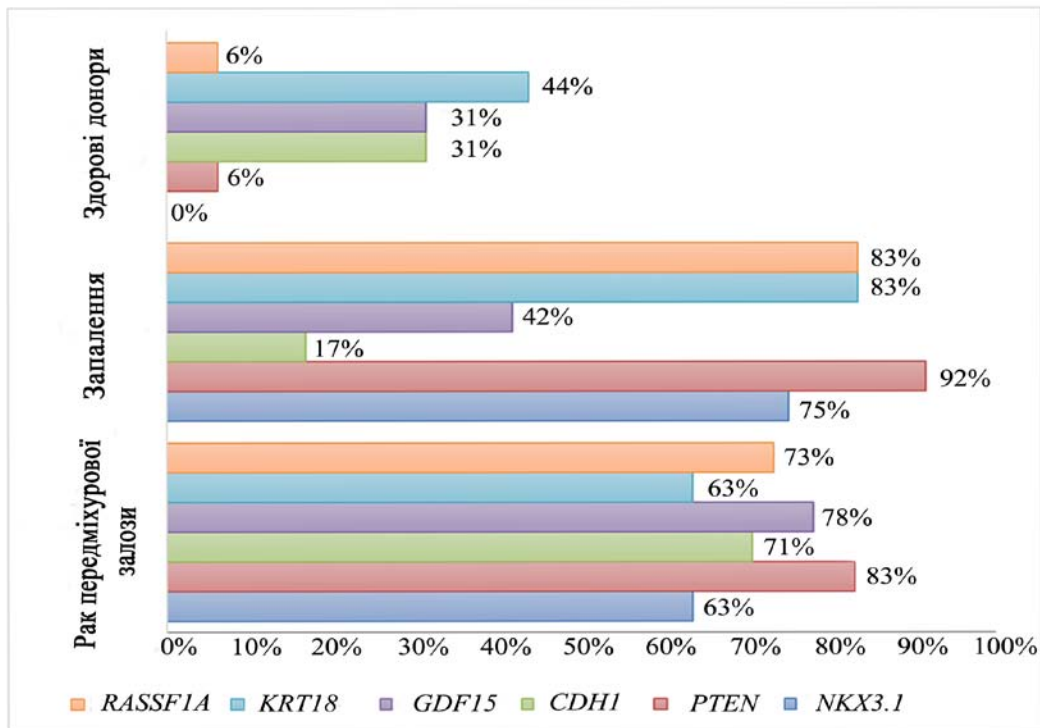
3.1.2. Метилування *PTEN*, *RASSF1A*, *NKX3.1*, *KRT18*, *CDH1* та *GDF15* у сечі пацієнтів з раком передміхурової залози. Позаклітинна ДНК (пкДНК) із сечі незалежної вибірки хворих на рак передміхурової залози аналізували на наявність метилування промоторів *PTEN*, *CDH1*, *KRT18*, *NKX3.1* та *RASSF1A*. *VIM* був виключений з набору як, можливо, менш інформативний згідно з даними, отриманими на клітинних лініях та тканинах. Натомість ми додали до набору ген *GDF15*, який є потенційним маркером пухлини згідно з нашими попередніми результатами та даними світової літератури.

Ми вивчали три групи пацієнтів: одну групу з підтвердженим раком передміхурової залози (n = 41), одну групу із запальними захворюваннями сечостатевої системи (n = 12) та контрольну групу вільних від раку осіб, які не виявляли жодних симптомів з боку сечостатевих органів (n = 16).

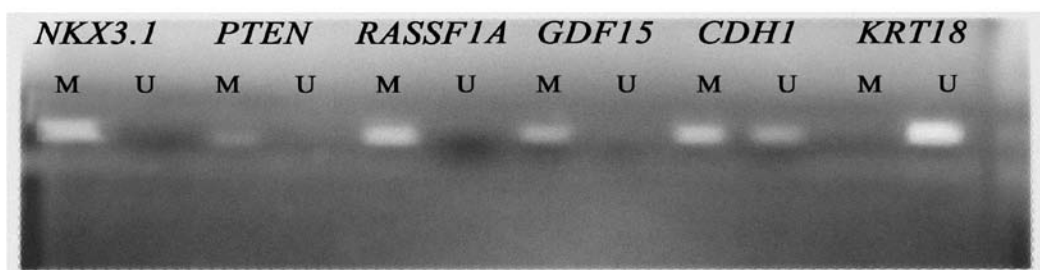
3.1.2.1. Якісна оцінка метилування промоторів досліджуваних генів у позаклітинній ДНК із зразків сечі. Ми спостерігали метилування 5 з 6 досліджуваних генів у всіх групах пацієнтів. Тільки метилування *NKX3.1* не було виявлено у позаклітинній ДНК із сечі жодного здорового донора. Примітно, що метилування промотора *NKX3.1* частіше виявлялось пацієнтів із запаленням, ніж у хворих на РПЗ (75% проти 63%) (рис. 3.3, (а)).

Як для запалення, так і для раку найбільш часто було виявлено метилування промотору *PTEN* (92% та 83% відповідно). Метилування *CDH1* та *GDF15* було менш характерним для пацієнтів із запаленням (17% і 42% відповідно), проте у пацієнтів з РПЗ ці локуси часто виявлялись заметильованими (метильована форма *CDH1* була виявлена у 71%, а *GDF15* – у 78% досліджених зразків). Промотор *RASSF1A* був метильований у більшості хворих на РПЗ та запальні захворювання (73% і 83% відповідно), тоді як тільки 6% осіб із групи здорових донорів мали метилування промотора цього гена. Метилування *KRT18* спостерігалось у

44% індивідів з контрольної групи, демонструвало помірну частоту (63%) у пацієнтів з РПЗ, у той час як у пацієнтів із запаленням органів сечостатевої системи даний ген був знайдений заметильваним у 83% випадків (рис. 3.3 (А)). Приклад електрофорезу ампліконів представлений на рис. 3.3.(Б).



А



Б

Рис 3.3. Метилування промоторів генів *PTEN*, *CDH1*, *KRT18*, *NKX3.1* та *RASSF1A* у пкДНК з сечі хворих на РПЗ, пацієнтів із запаленням органів сечостатевої системи та умовно здорових осіб. А – Частки метилування (у відсотках) досліджуваних генах у групах хворих і здорових осіб. Б – приклад електрофореграми продуктів ампліфікації метил-специфічної ПЛР

У таблиці представлені дані щодо розрахунків різниці у метилюванні генів онкосупресорів між досліджуваними групами, обраховані із застосуванням критеріїв Крускала-Уолеса та методу Дан-Бонфероні.

Таблиця 3.3.

Дані порівняльної статистики щодо різниці у частоті метилювання генів

PTEN, CDH1, KRT18, NKX3.1 та RASSF1A

у сечі хворих на РПЗ, пацієнтів з запаленням і здорових осіб

Ген/Групи	Норм/Запал	Норм/РПЗ	Запал/РПЗ
<i>NKX3.1</i>	0,002196	0,000648	
<i>PTEN</i>	0,000141	0,000007	
<i>CDH1</i>		0,013848	0,013848
<i>GDF15</i>		0,018992	
<i>KRT18</i>			
<i>RASSF1A</i>	0,001555	0,000284	

3.1.2.2. Аналіз комбінації потенційних маркерів для діагностики РПЗ на основі наявності метилювання промоторів досліджуваних генів у сечі. Основною метою ефективних маркерів діагностики пухлини є здатність диференціювати хворих на рак від осіб без онкологічних захворювань. Слід враховувати можливість якогось іншого захворювання, особливо такого, що супроводжується запаленням, оскільки такі симптоми і перші симптоматична маніфестація РПЗ можуть бути подібними. Враховуючи таку необхідність, ми мали на меті дослідити здатність кожного з проаналізованих генів (таблиця 3.4) відзняти РПЗ від усіх пацієнтів без раку, включаючи умовно здорових донорів з контрольної групи та пацієнтів з діагностованим запаленням органів сечостатевої системи.

Ми розрахували коефіцієнт OR для кожного гена, метилювання якого ми досліджували, який визначає рівень шансів бути хворим на рак

передміхурової залози за умови наявності метилювання цього гена (відносно групи для порівняння).

Таблиця 3.4.

Відношення шансів для асоціації присутності метилювання досліджених генів у безклітинній сечі осіб і наявності у них РПЗ

Назва гену	Пацієнти з РПЗ	Пацієнти з	Здорові донори	OR для пацієнтів з РПЗ та здорових	95% ДІ	OR для пацієнтів з РПЗ і пацієнтів з запаленням	95% ДІ	OR для пацієнтів з РПЗ і групи без	95% ДІ
<i>NKX3.1</i>									
Метилювання присутнє	26	9	0	NA	-	0.5778	0.1351-2.47	4.815	1.785-12.98
Метилювання відсутнє	15	3	16						
<i>PTEN</i>									
Метилювання присутнє	34	11	1	72.86	8.224-645.5	0.4416	0.04879-3.996	6.476	2.144-19.56
Метилювання відсутнє	7	1	15						
<i>CDH1</i>									
Метилювання присутнє	29	2	5	5.317	1.519-18.61	12.08	2.296-63.58	7.25	2.442-21.52
Метилювання відсутнє	12	10	11						
<i>GDF15</i>									
Метилювання присутнє	32	5	5	7.822	2.153-28.42	4.978	1.27-19.5	6.4	2.196-18.65
Метилювання відсутнє	9	7	11						

Продовження таблиці 3.4.

<i>KRT18</i>									
Метилування присутнє	26	10	7	2.229	0.6886-7.212	0.3467	0.06686-1.797	1.122	0.417-3.017
Метилування відсутнє	15	2	9						
<i>RASSF1A</i>									
Метилування присутнє	30	10	1	40.91	4.819-347.3	0.5455	0.1029-2.891	4.215	1.511-11.76
Метилування відсутнє	11	2	15						

Для оцінки здатності всього набору досліджуваних генів диференціювати рак передміхурової залози від інших фізіологічних станів ми використали метод простої логістичної регресії. Результати продемонстрували, що, використовуючи всі гени в поєднанні, можна розрізнити пацієнтів з РПЗ та осіб, які не є хворими на рак передміхурової залози. Площа під кривою ROC (AUC), сформована на основі проведеного аналізу, становила 0,7905, $p < 0,0001$ (рис. 3.4, (A)).

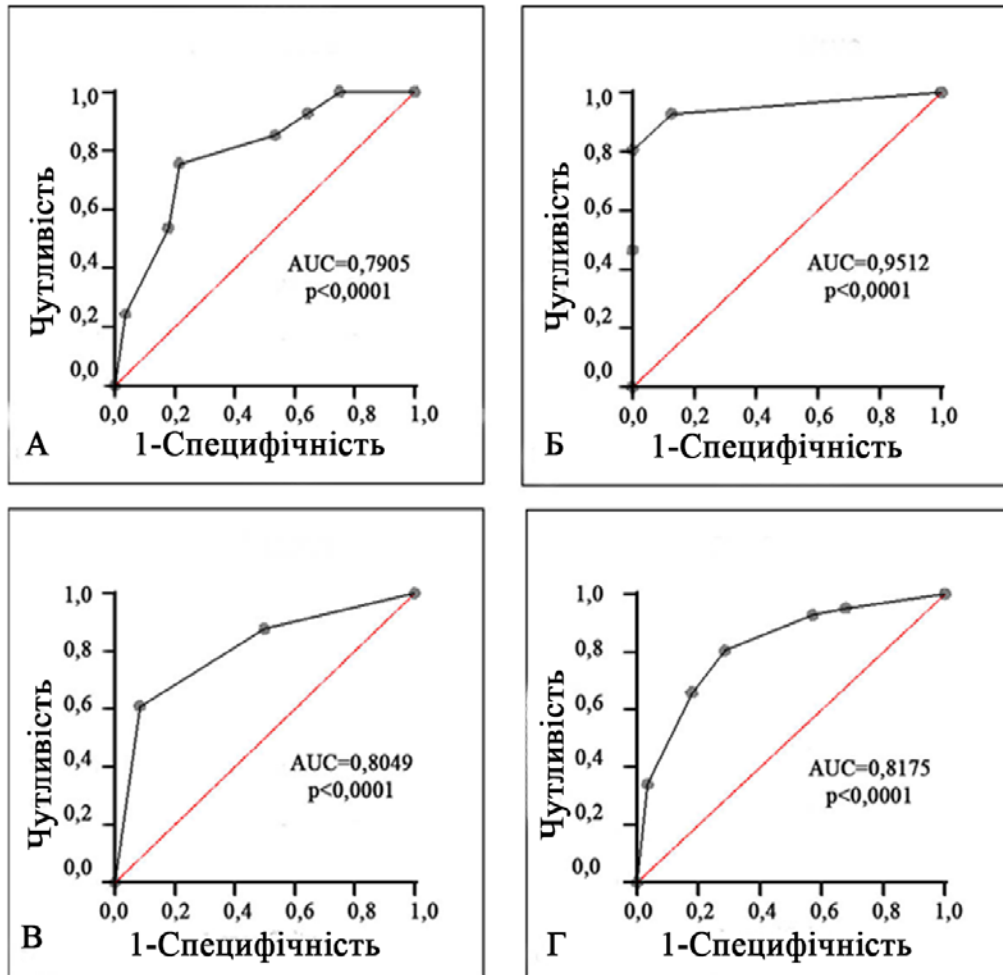


Рис. 3.4. Криві ROC для оцінки ймовірності наявності РПЗ на основі присутності метилювання досліджуваних генів: а) на основі метилювання *PTEN*, *CDH*, *KRT18*, *NKX3.1*, *RASSF1A* та *GDF15* (референсна група* - особи без раку (здорові донори та пацієнти із запаленням)); б) на основі метилювання *PTEN*, *RASSF1A* та *NKX3.1* (референсна група – здорові донори); в) на основі метилювання *CDH1* та *GDF15* (референсна група - пацієнти із запаленням); г) на основі метилювання *PTEN*, *CDH1*, *NKX3.1*, *RASSF1A* та *GDF15* (референсна група – особи без раку (здорові та хворі із запаленням)). *За хибно позитивні результати приймалось метилювання у референсній групі

Наступним кроком було знайти гени, метилювання промоторів яких можна використати для диференціації хворих на рак передміхурової залози та здорових донорів. Використовуючи метод MDR, ми обрали *PTEN*, *RASSF1A* та *NKX3.1* для подальшого аналізу. Площа під ROC кривою для цих генів становила 0,9512, $p < 0,0001$ (рис.3. 4, Б).

Як ми можемо спостерігати на рис.3.3 та з таблиці 3.4, метилювання промоторів деяких генів було більш характерним для пацієнтів із запаленням, ніж для пацієнтів з РПЗ. Тому використання такої комбінації могло б мати ефективність тільки для людей без будь-яких симптомів з боку сечостатевої системи. Врахувавши ці результати, ми проаналізували весь набір досліджуваних генів, використовуючи MDR-аналіз, щоб знайти гени, які в поєднанні можуть з найкращою точністю диференціювати РПЗ та запалення та виявили, що це пара *CDH1* та *GDF15*. Логістична регресія та аналіз ROC підтвердили здатність цієї комбінації розрізняти рак передміхурової залози та запалення, не пов'язане з онкологією. Площа під ROC для цих генів становила 0,8049 (рис. 3.4, (В)).

Поєднуючи отримані результати, ми створили криву ROC для поєднання метильованих *PTEN*, *RASSF1A*, *NKX3.1* та *CDH1* з *GDF15*, щоб визначити їх потенціал для диференціації між раком передміхурової залози та індивідами без раку (здорові донори та пацієнти із запаленням). Площа під кривою ROC становила 0,8175, $p < 0,0001$ (рис. 4 (Г)).

Підсумки:

1. Клітинні лінії раку передміхурової залози демонструють різні патерни метилювання генів *KRT18*, *RASSF1A* і *PTEN*, і подібні за рівнем метилювання *VIM*, *NKX3.1*, *CDH1*.

2. Прилеглі гістологічно нормальні тканини передміхурової залози не виявляють різниці у метилюванні досліджуваних генів у порівнянні з парними аденокарциномами, натомість рівні метилювання

генів *CDH1*, *PTEN* та *NKX3.1* позитивно корелюють у пухлинах та парних гістологічно нормальних тканинах. Рівень метилювання *RASSF1A* у TMPRSS2:ERG позитивних пухлинах є достовірно вищим ($p < 0,001$), ніж у пухлинах без гібридного транскрипту.

3. Метилювання генів *KRT18*, *RASSF1A*, *NKX3.1* і *PTEN* з високою частотою виявляється як у пацієнтів з раком передміхурової залози, так і у пацієнтів з запаленням органів сечостатевої системи, проте не є характерним для умовно здорових осіб. Метилювання промоторів *GDF15* і *CDH1* зустрічається рідше у пацієнтів з запаленням, ніж у хворих на РПЗ, тож включення їх до набору маркерів є необхідним. Набір метильованих *PTEN*, *CDH1*, *NKX3.1*, *RASSF1A* та *GDF15* на основі отриманих розрахунків може бути придатним для дискримінації хворих на РПЗ від осіб без раку (AUC=0,8175).

Основні результати, представлені в розділі, опубліковані у:

1. Mankovska O.S., Korsakova A., Chernyavskyy K., Mevs L., Bondarenko, Kononenko, Stakhovskyy E.O., Kashuba V.I., Gerashchenko G.V. Tumor-suppressor genes promoter methylation in prostate cancer as potential noninvasive tumor markers ,

2. GV Gerashchenko, Mankovska, AA Dmitriev, LV Mevs, EE Rosenberg, MV Pikul, MV Marynychenko, OP Gryzodub, EO Stakhovsky, VI Kashuba Expression of epithelial-mesenchymal transition-related genes in prostate tumours// Biopolymers and Cell – 2017. – 33(5). – с. 335-355.

3.2. Метилювання потенційних генів-онкосупресорів у клінічних зразках пацієнтів з раком сечового міхура.

3.2.1. Метилювання *VIM*, *TMEFF2*, *NKX3.1*, *MYO3A* та *GDF15* у сечі пацієнтів з раком сечового міхура. Зразки позаклітинної ДНК,

отриманої з сечі хворих на рак сечового міхура, було проаналізовано на присутність метилювання генів *VIM*, *TMEFF2*, *GDF*, *RASSF1A*, *NKX3.1* і *MYO3A*. З цією метою конвертовані бісульфітом натрію зразки ДНК перевіряли методом метил-специфічної ПЛР, після чого продукти ампліфікації розділяли методом електрофорезу в агарозному гелі (рис.3.5).

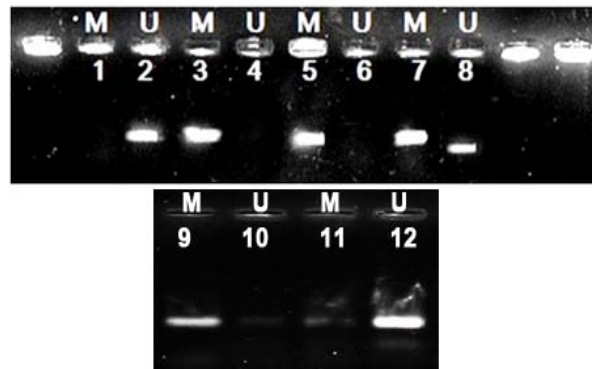


Рис.3.5. Приклад розділення продуктів метил-специфічної ПЛР на елеклектрофорезі в агарозному гелі. 1,2 – *GDF15*, 3,4- *RASSF1A*, 5,6 – *NKX3.1*, 7,8 – *MYO3A*, 9,10 – *VIM*, 11,12 – *TMEFF2*

Позитивними результатами вважалась наявність як тільки метильованої, так і обох форм гену, оскільки нульова гіпотеза полягала у тому, що метилювання асоційоване з наявністю злоякісної пухлини, а неметилювані фрагменти могли бути присутні у ДНК з неракових клітин, що також циркулює у сечі.

У дослідження було включено дві контрольні групи: вибірка умовно-здорових осіб (n=15), з повною відсутністю патологічної симптоматики з боку сечостатевої системи, та група пацієнтів з клінічно діагностованими запальними захворюваннями сечостатевої системи різної природи, проте таких, що не мають онкологічних захворювань (n=12). Кількість проаналізованих зразків пацієнтів з раком сечового міхура становила 32 зразка.

За результатами аналізу метилювання промоторів у хворих на рак сечового міхура було виявлено метилювання усіх досліджуваних генів з різною частотою. Найчастіше заметильованим у групи хворих на РСМ був ген *RASSF1A* (96,88%), у той час як метилювання промотору гену *TMEFF2* було найбільш рідкісним явищем (46,88%). Загалом гіперметлювання промоторів усіх інших генів було виявлено у більше ніж в половини хворих на рак з наступними показниками: *VIM* – 68,75%, *GDF15* – 87,50%, *NKX3.1* – 87,50%, *MYO3A* – 65,63% (рис 3.6).

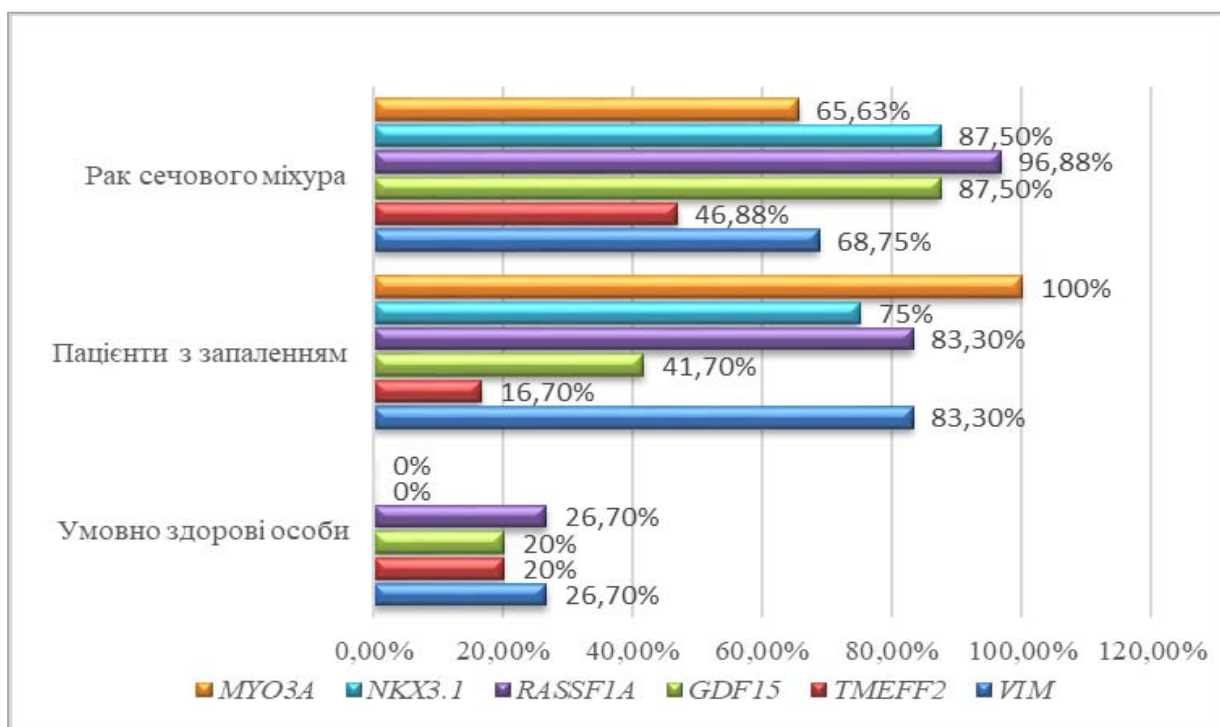


Рис 3.6. Частота метилювання промоторів генів *VIM*, *TMEFF2*, *GDF*, *RASSF1A*, *NKX3.1* і *MYO3A* у пкДНК з сечі хворих на рак сечового міхура, пацієнтів із запаленням органів сечостатевої системи та умовно здорових осіб

З метою виявити, чи була різниця у метилюванні окремих генів у пацієнтів на різних стадіях захворювання, ми розділили пацієнтів, хворих

на рак сечового міхура, на 2 групи: пацієнтів з 1-2 стадією і пацієнтів з 3-4 стадією раку. Результати у відсотках представлені на рис.3.7.

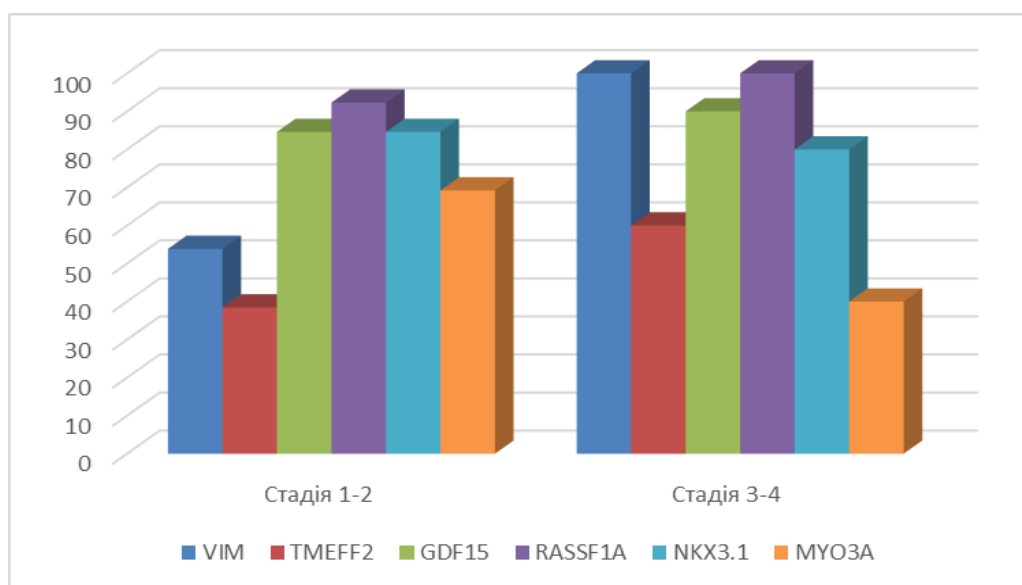


Рис 3.7. Метилування промоторів генів-онкосупресорів у хворих з різними стадіями раку сечового міхура

На діаграмі видно, що в залежності від стадії існує різниця у частоті метилування певних генів, при чому частота метилування *VIM*, *TMEFF2*, *GDF15*, *RASSF1A* на пізніх стадіях є вищою, ніж на ранніх, а *NKX3.1* і *MYO3A* – нижчою.

У результаті нашого дослідження метилування промоторів генів *VIM*, *TMEFF2*, *GDF*, *RASSF1A*, *NKX3.1* і *MYO3A* було виявлено, що це явище є характерним також для хворих з запаленням. Зокрема, промотор гену *MYO3A* був гіперметильований у всіх пацієнтів із запальними захворюваннями сечостатевої системи. Висока частота виявлення метилування промоторів генів *NKX3.1* (75%), *RASSF1A* (83,3%) і *VIM* (83,3%) також спостерігалась для цієї групи осіб. При цьому метилування промоторів досліджуваних генів у групі умовно-здорових осіб була рідкісним явищем (рис 3.6). Гіперметильованих форм генів *NKX3.1* і

МУОЗА не було виявлено у жодному зразку, отриманому у здорових донорів.

На основі отриманих даних для кожного з генів було пораховано OR як показник ймовірності наявності у особи раку сечового міхура за присутності метилювання даного гену. Результати аналізу наведено у таблиці 3.5.

Таблиця 3.5

Відношення шансів для асоціації присутності метилювання досліджених генів у безклітинній сечі осіб і наявності у них раку сечового міхура

	Хворі на рак сечового міхура	Хворі з запаленням сечового міхура	Умовно здорові	OR Рак/норма	ДІ 95%	OR Рак/запалення	ДІ 95%	OR Рак/не рак	ДІ 95%
<i>VIM</i>									
Метилювання присутнє	22	10	4	6.05	1.542-23.73	0.44	0.08102-2.39 ¹	2.043	0.7061-5.91 ¹
Метилювання відсутнє	10	2	11						
<i>TMEFF2</i>									
Метилювання присутнє	15	2	3	3.529	0.8337-14.94 ¹	4.412	0.8311-23.42 ¹	3.882	1.177-12.81
Метилювання відсутнє	17	10	12						
<i>GDF15</i>									
Метилювання присутнє	28	5	3	28	5.418, 144.7	9.8	2.072, 46.35	16.63	4.379, 63.12
Метилювання відсутнє	4	7	12						
<i>RASSF1A</i>									
Метилювання присутнє	31	10	4	85.25	8.576-847.4	6.2	0.5069-75.83	28.79	3.423-242.1
Метилювання відсутнє	1	2	11						

Продовження таблиці 3.5

НКХ3.1									
Метилування присутнє	28	9	0	-	-	2.333	0.4372-12.45	14	3.747-52.31
Метилування відсутнє	4	3	15						
МУОЗА									
Метилування присутнє	21	12	0	-	-	0.0	0.0 -'?	2.386	0.8328-6.838
Метилування відсутнє	11	0	15						

З отриманих даних ми спостерігаємо, що, враховуючи наявність гіперметилування усіх генів у хворих із запаленням, на основі даних про метилування промотора певного окремого гена з вибірки неможливо зробити однозначний висновок про наявність чи відсутність у пацієнта онкологічного захворювання.

Ми використали метод простої логістичної регресії для оцінки здатності наявності гіперметилування всіх досліджуваних генів відрізнити хворих на рак сечового міхура від умовно здорових осіб, а також хворих на рак сечового міхура від хворих із запаленням (дані наведені у таблиці 3.6) і побудували ROC криві (рис. 3.8). При порівнянні вибірки пацієнтів з раком і здорових донорів площа під ROC кривою (AUC) становила 1. Таким чином метилування даних генів з високою достовірністю ($p < 0,01$) є більш характерним явищем для хворих на рак сечового міхура ніж для здорових осіб. Проте це твердження не є вірним у випадку хворих із запаленням, де площа під ROC кривою становила 0,6315 з $p = 0,1833$ (рис 3.8 (A)). Результати логістичної регресії (таблиця 3.6) також вказують на недостовірність результатів. Тим не менш, при аналізі метилування промоторів генів у групах пацієнтів з раком сечового міхура та пацієнтів без раку (об'єднана група здорових донорів та пацієнтів з запальними захворюваннями) метод простої логістичної регресії оцінює даний набір

генів як такий, що здатен виявити різницю між цими двома групами (рис 3.8 (Б), таблиця 3.6).

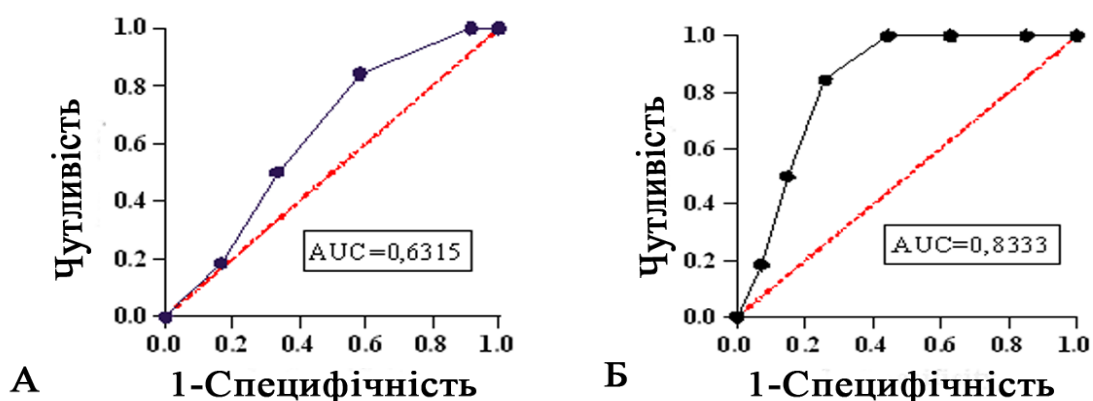


Рис. 3.8. Криві ROC для оцінки ймовірності наявності РСМ на основі присутності метилювання досліджуваних генів: А) на основі метилювання *VIM*, *TMEFF2*, *GDF15*, *RASSF1A*, *NKX3.1*, *MYO3A* (референсна група* – хворі з запаленням); Б) на основі метилювання *VIM*, *TMEFF2*, *GDF15*, *RASSF1A*, *NKX3.1*, *MYO3A* (референсна група - особи без онкологічних захворювань) *За хибно позитивні результати приймалось метилювання у референсній групі

Таблиця 3.6

Результати простої логістичної регресії для наявності метилювання промоторів генів *VIM*, *TMEFF2*, *GDF15*, *RASSF1A*, *NKX3.1*, *MYO3A*

Тип вибірки	OR	95% ДІ	P
Пацієнти з раком сечового міхура	1,62	0,8582-3,303	0,1519
Пацієнти з запаленням сечостатевої системи	Референсна група	-	-
Пацієнти з раком сечового міхура	2,736	1,734-5,007	<0,001
Пацієнти без онкологічних захворювань (здорові донори і хворі з запаленням)	Референсна група		

Не зважаючи на це, з отриманих результатів очевидно, що статистично достовірної різниці у частоті метилування промоторів досліджуваних генів онкосупресорів немає між хворими з запаленням і хворими з раком сечового міхура. Дані, наведені у таблиці 3.4, можуть пояснити це явище, оскільки тільки для гену *GDF15* було виявлено статистично достовірну різницю у метилуванні між цими групами. При цьому найрідше у хворих з запаленням було виявлено метилування промотору гену *TMEFF2* (16,7%), але цей ген в той самий час був метильований менше ніж у половини осіб з раком сечового міхура. Проаналізувавши дану комбінацію, ми виявили, що шанс у індивіда з виявленим у пкДНК з сечі метилуванням промоторів даних генів мати онкологічне захворювання перевищує шанс його не мати (OR=3,933, $p<0,01$). Площа під ROC кривою, побудованої на основі даного аналізу становила 0,7539, $p=0,012$ (рис.3.9 (А)). Крім того, беручи до уваги той факт, що метилування гену *MYO3A* був виявлено в усіх зразках хворих із запаленням, ми припустили, що його метилування може бути пов'язане саме з цим патологічним процесом. Можливо, епігенетичне вимкнення цього гену певним чином характеризує реакцію імунної системи на наявність хвороби. Тим не менш, інформативність наявності його метилування у пкДНК з сечі піддослідної особи є низькою, якщо ми маємо на меті виявити онкологічне захворювання у осіб з симптомами чи без. Таким чином, було вирішено виключити *MYO3A* з набору генів. Дані логістичної регресії продемонстрували, що метилування у пкДНК з сечі генів *VIM*, *TMEFF2*, *GDF15*, *RASSF1A* і *NKX3.1* вказує на шанси мати онкологічне захворювання з OR = 3,4, $p<0,001$. Площа під ROC кривою становила 0,8553 (рис 3.9, Б).

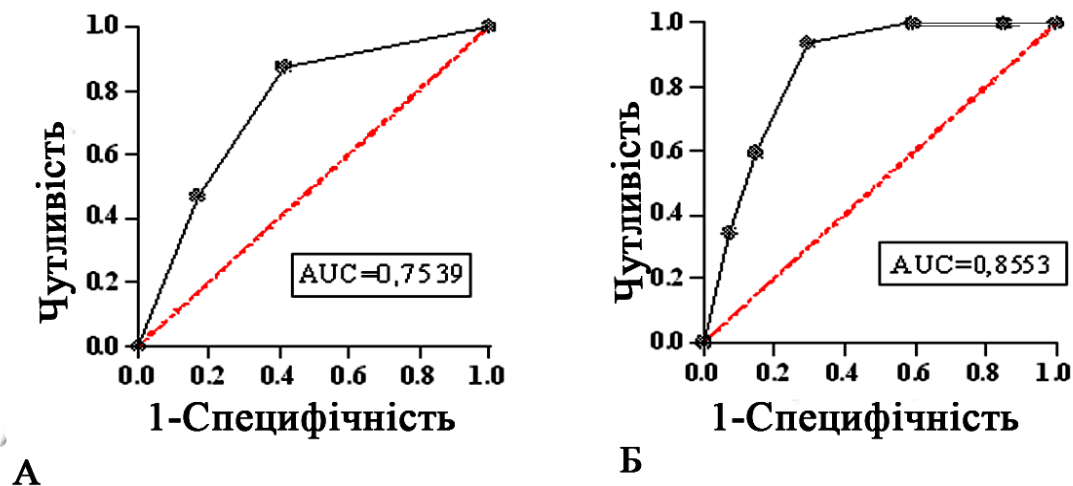


Рис 3.9. Криві ROC для оцінки ймовірності наявності РСМ на основі присутності метилювання досліджуваних генів: А) на основі метилювання *TMEFF2* і *GDF15* (рефенсна група - пацієнти з запаленням); Б) на основі метилювання *VIM*, *TMEFF2*, *GDF15*, *RASSF1A* і *NKX3.1* (рефенсна група - особи без раку). *За хибно позитивні результати приймалось метилювання у референсній групі

До того ж, нами було проаналізовано можливість наявності метилювання генів *VIM*, *RASSF1A* і *NKX3.1* у пацієнта з симптомами спрогнозувати ймовірність наявності у нього онкологічного захворювання. У результаті було з'ясовано, що різниця у частоті метилювання цих генів практично відсутня у групах з раком сечового міхура і пацієнтів з запаленням ($AUC=0,5417$), при тому що для осіб без симптомів цей показник становив 0,9479 при $p<0,001$. Таким чином, відкритим питанням залишається те, яким чином слід інтерпретувати наявність метилювання даних генів у пацієнтів без ознак запалення сечостатевої системи, крім того, потребує подальшого дослідження питання, що пов'язує наявність метилювання даних генів з запальним процесом.

Підсумок:

Метилування генів *VIM*, *TMEFF2*, *GDF15*, *RASSF1A* і *NKX3.1* є більш характерним і здатне відрізнити хворих на рак сечового міхура від осіб без раку, незалежно від наявності чи відсутності у них симптоматики з боку сечостатевої системи.

Основні результати, представлені в розділі, опубліковані у:

1. Скрипнікова О. С., Панасенко Г. В., Вікарчук М. В., Кононенко О. А., Стаховський Е. О., Кашуба В. І. Виявлення метилування генів *VIM*, *TMEFF2* і *GDF15* у сечі пацієнтів, хворих на рак сечового міхура в українській популяції// Наукові записки НАУКМА . – 2016. – т.184. – с. – 23-29.

2. Mankovska OS, Skrypnikova O.S., Panasenko G.V., Slivka U.S., Vikarchuk M.V., Kononenko O.A., Stakhovskyy E.O., Kashuba V.I.Characterization of methylated *VIM*, *TMEFF2* and *GDF* as potential set of epigenetic markers for bladder cancer. International scientific conference “Integrated Clinacal and Pathogenetic Approaches in Diagnosis and Therapy of Cancer

3. OS Mankovska, K.R. Cherniavskiy , A.L. Savitskyu , S.L. Semko, B.O. Grechko , Yu.M. Bondarenko , V.I. Kashuba Epigenetic markers of bladder cancer: can we distinguish cancer from non-cancerous inflammation using urine as source of DNA? Науково-практичний журнал ОНКОЛОГИЯ, Т. 21 , № 3, 2019. с. 268.

3.3. Відносна експресія генів кіназ родини Aurora та кінази BRAF у клітинних лініях і клінічних зразках раку передміхурової залози

3.3.1. Відносна експресія генів кіназ родини Aurora у клітинних лініях РПЗ. Ми дослідили відносну експресію генів кіназ родини Aurora та кінази BRAF на клітинних лініях раку передміхурової залози (LNCaP та PC3), одна з яких є гормон-чутливою, а друга гормон-резистентною, відповідно. Також ми проаналізували експресію цих генів у клітинній лінії нормальних клітин передміхурової залози людини PNT2 (Рис.3.10).

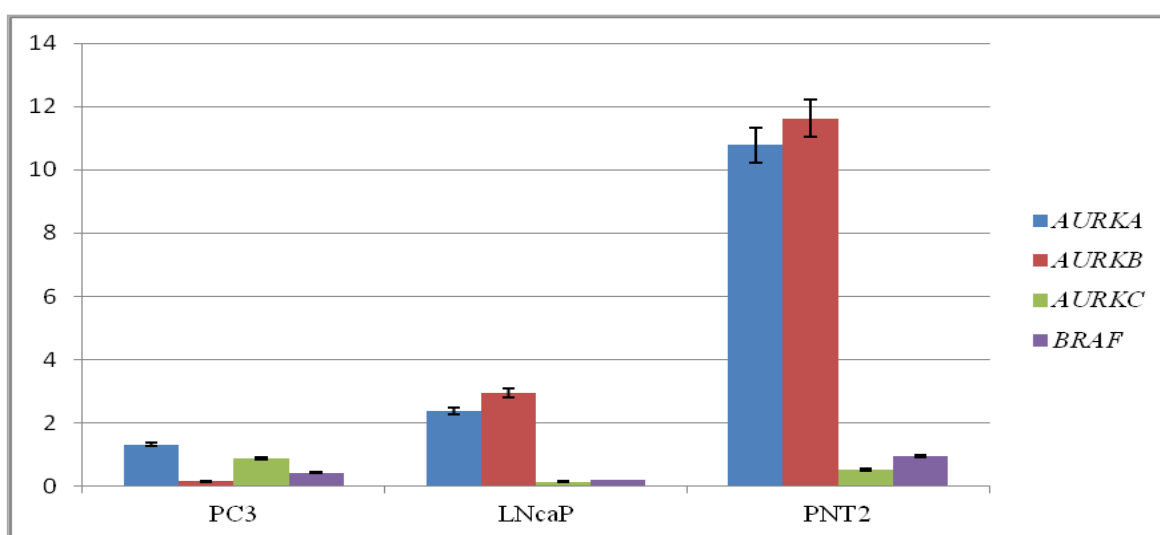


Рис. 3.10. Відносні рівні експресії генів кіназ родини Aurora і кінази BRAF у клітинних лініях

Як видно з діаграми, андрогенрезистентні клітини лінії PC3 характеризуються нижчою експресією генів *AURKA* і *AURKB* у порівнянні з андрогенчутливою лінією LNCaP і нормальними клітинами передміхурової залози. При цьому, рівень експресії *AURKC* у даної клітинної лінії є найвищим з-поміж усіх інших. Рівень експресії *BRAF* вищий у PC3 ніж у LNCaP. За даними поточного дослідження *AURKA* і *AURKB* найсильніше експресуються у PNT2. Крім того, привертає увагу

характер взаємного співвідношення рівнів експресії *AURKA* і *AURKB* у РСЗ у порівнянні з двома іншими клітинними лініями: у РСЗ рівень експресії *AURKA* у 8,8 разів вищий за рівень відносної експресії *AURKB*, а у LNCaP і PNT2 експресія *AURKB* незначно перевищує експресію *AURKA* (у 1,2 і 1,1 рази, відповідно).

3.3.2. Відносна експресія генів кіназ родини Auroga в аденокарциномах та суміжних нормальних тканинах пацієнтів, хворих на РПЗ. В результаті дослідження відносної експресії генів кіназ родини Auroga на рівні мРНК нами було виявлено, що експресія *AURKA*, *AURKB* і *AURKC* детектується у як в аденокарциномах передміхурової залози, так і в парних умовно нормальних тканинах передміхурової залози тих самих пацієнтів, а також у доброякісних пухлинах – аденомах передміхурової залози. Відносна експресія *AURKA*, *AURKB* і *AURKC* у аденокарциномах, умовно нормальних тканинах передміхурової залози і в аденомах зображена графічно на рис.3.11.

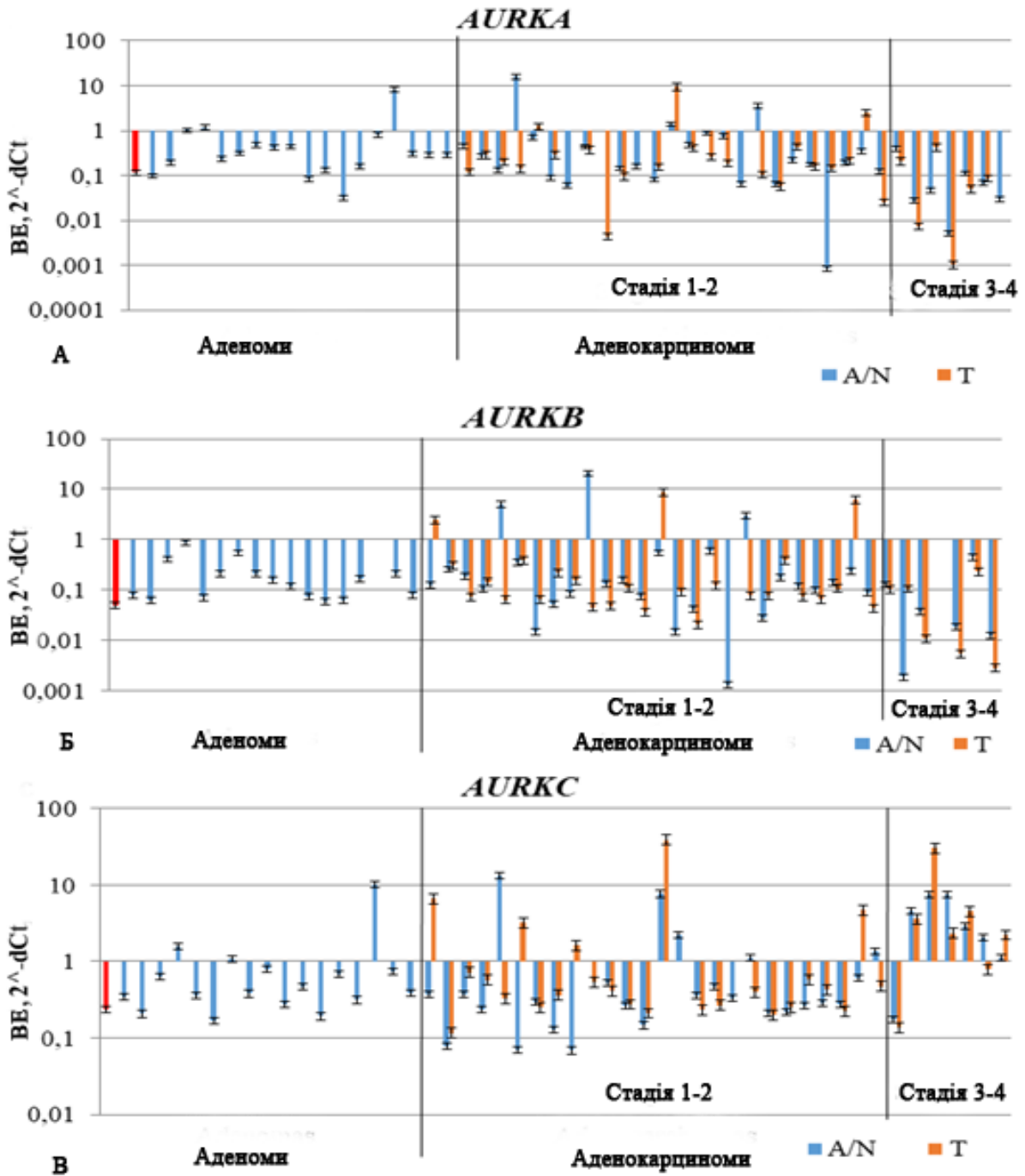


Рис 3.11. Відносна експресія *AURKA* (А), *AURKB* (Б) і *AURKC* (В) у аденокарциномах, умовно нормальних тканинах передміхурової залози і в аденомах. Пари Т/Н розподілені відповідно до стадії. Аденоми розташовані у довільному порядку. Умовні позначення: А - аденоми; Н- умовно нормальні тканини передміхурової залози; Т- аденокарциноми. Перший стовпчик (червоний) – відносна експресія генів *AURK* у периферичній крові (додатковий контроль)

Ми виявили статистично достовірну відмінність у показниках відносної експресії гену *AURKA* у злоякісних пухлинах та аденомах ($p=0,047$). Цікаво, що нижча відносна експресія цього гену спостерігалась у злоякісних новоутвореннях (Рис. 3.12 а(1)). Ми припустили, що врахувавши стадію пухлини і на основі цього розділивши зразки на групи, ми виявимо ще більш помітну різницю у експресії даного гена. Всього було виділено 5 груп зразків: аденокарциноми стадії 1/2 і 3/4 (Т1/2 і Т3/4 відповідно), парні умовно нормальні тканини N1/2 і N3/4 стадій (у залежності від стадії відповідної пухлини) і група аденом А (Рис. 3.12). Після статистичної обробки результати показали, що відносна експресія гену *AURKA* була відчутно нижчою у аденокарциномах 3-4 стадій, ніж у аденомах ($p=0,036$). Експресія гену *AURKC* відрізнялась у групах умовно-нормальних тканин ранніх (N1/2) та пізніх стадій (N3/4), із вищими показниками відносної експресії у тканинах N3/4 ($p=0,021$). Для гену *AURKB* використаними методами обробки даних не було виявлено статистично значущих відмінностей між вказаними групами зразків.

Ми порівняли експресію генів кінази родини Auroga з уже дослідженні раніше у нашому відділі характеристиками даних зразків. Зокрема, оскільки наявність або відсутність гібридного транскрипту TMPRSS2:ERG а також рівень експресії гена *PTEN* є важливим характеристиками для пухлин передміхурової залози, нами було проведено порівняння груп зразків, відмінних за цими критеріями.

Ми розділили аденокарциноми та парні умовно нормальні тканини на групи з гібридним транскриптом і без нього. Порівнявши кожную групу з іншою та з аденомами ми виявили, що експресія гену *AURKA* була нижчою групі аденокарцином, у яких був відсутній гібридний транскрипт TMPRSS2:ERG у порівнянні з його експресією у аденомах ($p=0,0325$).

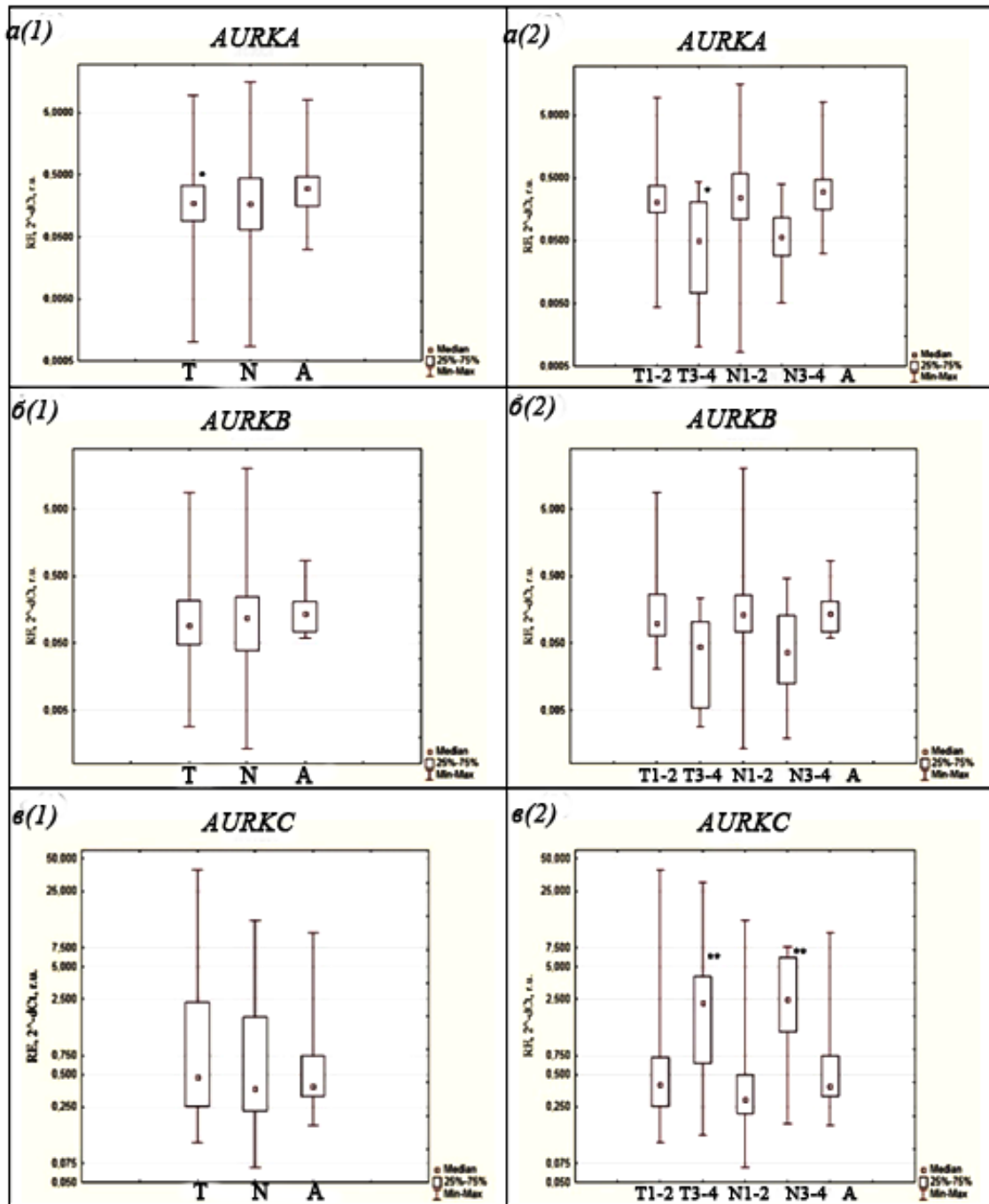


Рис 3.12. Відносна експресія генів *AURKA*, *AURKB* і *AURKC* у аденокарциномах, умовно нормальних тканинах передміхурової залози і в аденомах . *a* – експресія *AURKA*; *б* – експресія *AURKB*; *в* – експресія *AURKC*; (1) – зразки розділено на 3 групи: злоякісні пухлинні тканини (Т), парні умовно нормальні тканини (N) і аденоми (A); (2) – зразки розділено на 5 груп, стадія 1-2 (Т1-2), стадія 3-4 (Т3-4), парні умовно нормальні тканини від пацієнтів з раком на 1-2 стадії(N1-2), парні умовно нормальні

тканини від пацієнтів з раком на 3-4 стадії (N3-4), і аденоми (A). * - значуща різниця відносної експресії у T в порівнянні з групою A; ** - значуща різниця відносної експресії у T1-2 і N 1-2 у порівнянні з T3-4 і N 3-4 відповідно

На наступному етапі ми розділили зразки аденокарцином, нормальних тканин та аденом на групи з високим і низьким рівнем експресії *PTEN*. У результаті було виявлено, що відносна експресія *AURKA* у аденокарциномах з високою відносною експресією *PTEN* була значно нижчою за таку в аденомах з низьким рівнем *PTEN* ($p= 0,033$) (таблиця 3.7).

Таблиця 3.7

Кореляція між експресією генів кіназ родини Аурога та клінічними характеристиками пацієнтів (показники r_s)

Гени \ КПХ	<i>AURKA</i>	<i>AURKB</i>	<i>AURKC</i>
СТ	-0.093	-0.219	0.119
Стадія	-0.201	-0.344	0.372
ПСА нг/мл	-0.067	0.010	0.039
Вік	-0.026	0.176	0.204
Гібридний транскрипт (+/-)	0.278	0.106	-0.056
ВЕ <i>PTEN</i>	0.142	-0.112	-0.020

Примітки: Червоний напівжирний – $p < 0,01$

Крім того, провівши кореляційний аналіз залежності відносної експресії кіназ родини Аурога від клінічних характеристик пацієнта (група аденокарцином) (таблиця 3.6.) ми виявили позитивну кореляцію між

стадією пухлини та експресією *AURKC* ($r_s=0.372$, $p<0.01$) і негативну кореляцію між стадією та експресією *AURKB* ($r_s=-0.344$, $p<0.01$).

На наступному етапі ми дослідили кореляцію експресії генів *AURK* між собою та з генами, які пов'язані з розвитком раку передміхурової залози (**PCAG**) (раніше досліджені у відділі) і з'ясували, що показники умовної експресії *AURKB* і *AURKA* у групі аденокарцином позитивно корелюють між собою ($r_s=0.365$, $p<0.05$). Крім того, експресія генів *AR 1 isof*, *CASP3* і *OCLN* позитивно корелювали з експресією *AURKA*, експресія *AURKB* позитивно корелювала з експресією гену *VDR*, а відносна експресія *MKI67* і *NKX3.1* корелювала як з експресією *AURKA*, так і *AURKB*. В той самий час експресія гену *AURKC* позитивно корелювала з експресією *CYP17A1* ($r^s =0.370$, $p<0.05$) і негативно з експресією гена *INSRA* ($r_s =-0.397$, $p<0.05$). Результати аналізу кореляцій генів *AURKA*, *AURKB* і *AURKC* з іншими генами, дослідженими раніше на цій вибірці, представлені у таблиці 3.8.

Таблиця 3.8

Кореляція між експресією генів, асоційованих з раком передміхурової залози та кіназ родини Аурога (показники r_s)

<i>Гени AURK</i>	<i>AURKA</i>	<i>AURKB</i>	<i>AURKC</i>
<i>Гени PCAG</i>			
<i>AR 1 isof</i>	0.561	0.331	-0.109
<i>CASP3</i>	0.361	0.234	0.065
<i>MKI67</i>	0.562	0.647	-0.025
<i>NKX3.1</i>	0.358	0.349	-0.113
<i>OCLN</i>	0.355	0.210	-0.221
<i>VDR</i>	0.296	0.488	0.025
<i>INSR A</i>	0.162	0.006	-0.397
<i>CYP17A1</i>	0.104	0.159	0.370

Примітки: **Червоний** – $p<0,05$, **Червоний напівжирний** – $p<0,01$

3.3.3. Відносна експресія кіназ родини Aurora і кінази BRAF у клітинах, осаджених з сечі хворих на рак передміхурової залози. Матрична РНК довгий час залишалась поза увагою як біологічний матеріал, який можна визначати у рідких біопсіях і використовувати у якості маркеру. Дійсно, при виході з клітини і потрапивши під дію численних ендонуклеаз, малозахищена мРНК легко руйнується і її рівні у позаклітинному середовищі можуть бути мало репрезентативними. У той самий час, біологічні рідини є джерелом циркулюючих клітин, зокрема клітин пухлини, а також клітин імунної системи, і при ретельному аналізі та вивчення вмісту цих клітин та їх складу такий матеріал може стати ефективним джерелом біологічних маркерів.

У своєму дослідженні ми мали на меті провести аналіз відносної експресії генів кіназ родини Аврора та кінази BRAF у клітинах, осаджених зі зразків сечі пацієнтів з раком передміхурової залози та контрольних груп індивідів, що не мають діагностованих онкологічних захворювань, для того, щоб визначити, чи є статистично значуща різниця між цими групами за експресією досліджуваних генів, чи є кореляція цієї експресії у клітинах з сечі пацієнтів з РПЗ з іншими клініко-патологічними характеристиками хворого.

3.3.3.1. Рівні відносної експресії кіназ родини Aurora та кінази BRAF у клітинах, осаджених з сечі пацієнтів та умовно здорових донорів. Ми дослідили відносну експресію на рівні мРНК генів кіназ родини Aurora та кінази BRAF у клітинах, осаджених з сечі трьох груп індивідів, а саме: хворих на рак передміхурової залози (n=39), умовно здорових осіб (n=10) та осіб, у яких були діагностовані запальні захворювання сечостатевої системи (n=5). Експресія усіх чотирьох досліджуваних генів відзначалась високою гетерогенністю. У низки осіб ми не виявили експресії генів однієї або кількох кіназ, що, можливо, могло

б бути пояснене малою кількістю клітин у зразку, оскільки якість та кількість клітинного осаду, отриманого нами під час первинної обробки клінічних зразків сечі, сильно варіювала.

Кількісні показники відносної експресії генів кінази родини Auroga та кінази BRAF у проаналізованих вибірках зображено на рисунку 3.13.

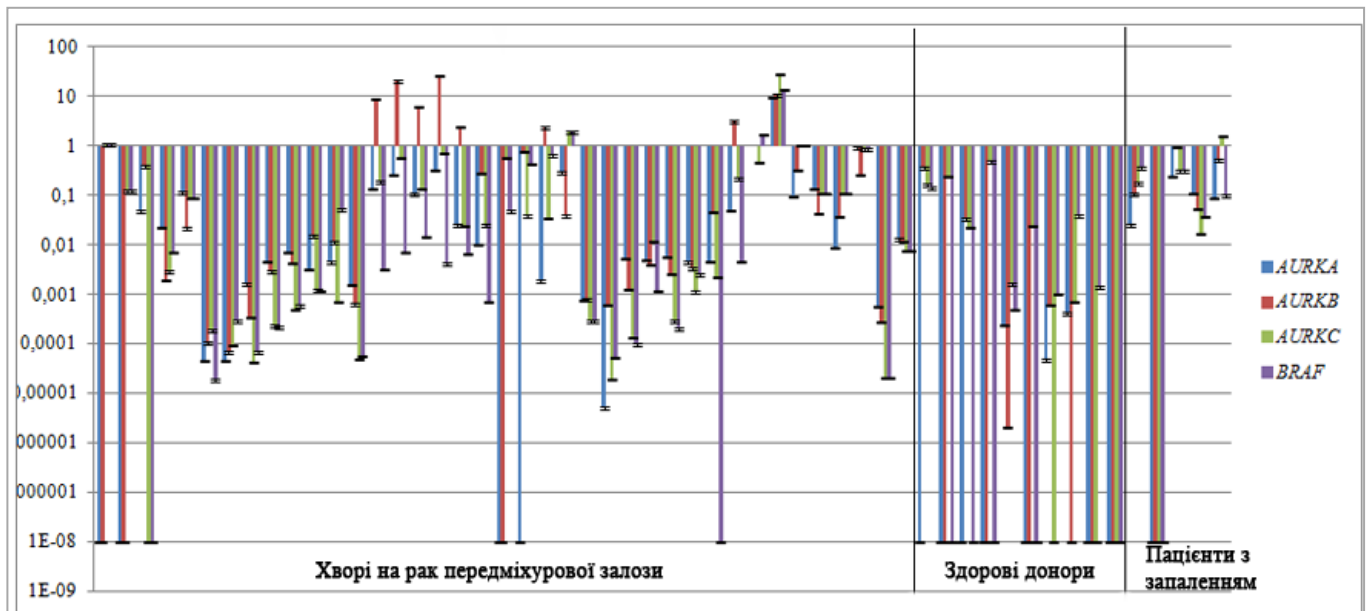


Рис 3.13. Рівні відносної експресії генів кіназ родини Auroga та кінази BRAF виявлені у клітинах, осаджених з сечі пацієнтів з РПЗ, умовно нямиздорових осіб та пацієнтів з запальними захворюваннями сечостатевої системи

У даному дослідженні брало участь тільки 5 пацієнтів, хворих на запальні захворювання сечостатевої системи. Враховуючи сильну гетерогенність експресії досліджуваних генів у клітинах отриманих з сечі як пацієнтів, так і донорів, відсутність статистично достовірної різниці (згідно тесту Манна-Вітні) між групами здорових донорів і хворих із запаленням, а також те, що у даному дослідженні нас, передусім, цікавив діагностичний та прогностичний потенціал досліджуваних генів саме для злоякісних новоутворень передміхурової залози, надалі ми аналізували

різницю за допомогою непараметричного критерія Манна-Вітні з поправкою Йейтса для двох груп пацієнтів, а саме: (1) – пацієнтів з раком і (2) - осіб без онкологічних захворювань.

Провівши обрахунок даних для кожного з досліджуваних генів, ми виявили, що відносні рівні експресії гена *AURKA* у циркулюючих клітинах з сечі досліджуваних осіб були статистично достовірно вищими у групі з РПЗ, ніж у групі осіб без онкозахворювань ($t = 285$, $p = 0,014$) (Рис 3.14, (А)). Різниця у експресії гена *AURKB* не сягла статистичної значущості, опинившись на межі з $p=0,05$ ($t = 311$, $p = 0,05$) (Рис 3.14, (Б)). Різниця у рівні експресії усіх інших генів була відсутня між двома досліджуваними вибірками (рис. 3.14 (В), (Г)).

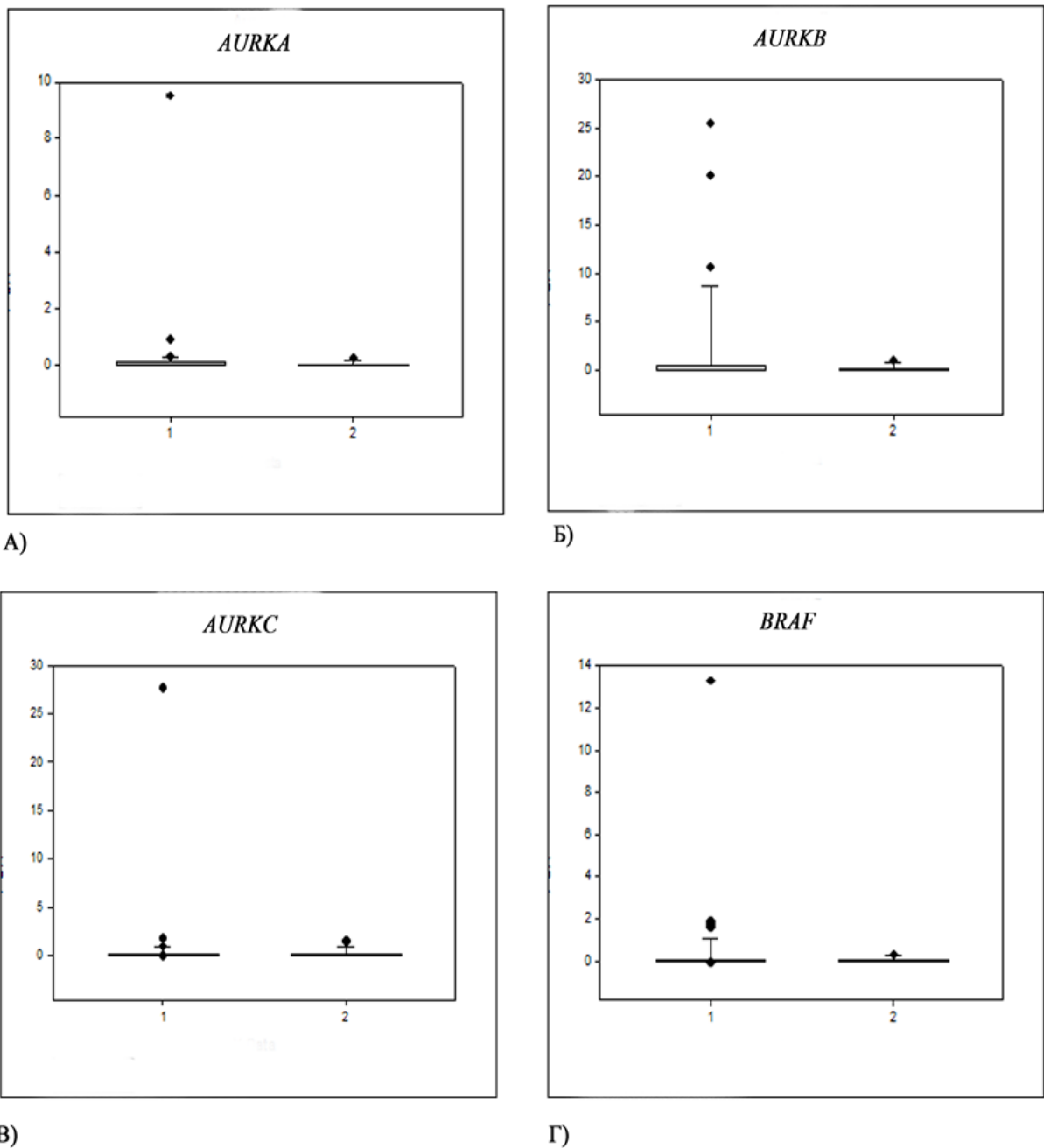


Рис. 3.14. Рівні відносної експресії генів кіназ Aurora A (А) Aurora B (Б), Aurora C (В) та кінази BRAF (Г) у клітинах, осаджених з сечі пацієнтів з РПЗ (1), та пацієнтів без онкологічних захворювань (2)

Наступним кроком ми здійснили пошук потенційної різниці між ранніми (1-2) та пізніми (3-4) стадіями захворювання на аденокарциному передміхурової залози у експресії досліджуваних генів. Використавши

непараметричний критерій Манна-Вітні, ми не виявили статистично достовірної різниці між цими двома групами. Відсутність достовірного взаємозв'язку експресії генів досліджуваних кіназ у сечі хворих на РПЗ і стадії захворювання з іншого боку була підтверджена відсутністю кореляцій (за Спірманом) між ВЕ генів *AURKA*, *AURKB*, *AURKC* і *BRAF* зі стадією раку у пацієнтів.

3.3.3.2. Кореляційний аналіз досліджуваних генів та клініко-патологічних характеристик пацієнтів. Для пошуку наявності кореляцій між показниками експресії досліджуваних генів у клітинах, отриманих з сечі пацієнтів з раком передміхурової залози та їх клініко-патологічних характеристик ми використали непараметричний критерій Спірмана.

Першим чином було проаналізовано кореляції відносної експресії досліджуваних генів між собою. На початку ми проаналізували усю вибірку, включно зі здоровими донорами та хворими з запаленням (таблиця 3.9). Було виявлено, що експресія генів *AURKA* і *AURKB* а також *AURKC* і *BRAF* позитивно корелювали між собою.

Таблиця 3.9

Кореляція між експресією генів кіназ родини Auroga та кінази BRAF у циркулюючих клітинах з сечі хворих на РПЗ, пацієнтів з запаленням і умовно здорових осіб (показники r_s)

Символ гена	<i>AURKB</i>	<i>AURKC</i>	<i>BRAF</i>
<i>AURKA</i>	0,769	0,379	0,389
<i>AURKB</i>		0,433	0,403
<i>AURKC</i>			0,668

Примітки: Червоний – $p < 0,05$

Враховуючи той факт, що при канцерогенезі суттєво порушується регуляція роботи геному, ми припустили, що саме зразки аденокарцином роблять найбільший внесок у такий результат. Для того, щоб з'ясувати, чи відрізняється кореляція між цими генами у групі хворих на рак пацієнтів та осіб, які не мають онкологічних захворювань, ми проаналізували окремо ці групи індивідів (таблиця 3.10 і таблиця 3.11)

Таблиця 3.10

Кореляція між експресією генів кінази родини Аугога та кінази BRAF у циркулюючих клітинах з сечі хворих на РПЗ (показники r_s)

Символ гена	<i>AURKB</i>	<i>AURKC</i>	<i>BRAF</i>
<i>AURKA</i>	0,774	0,43	0,237
<i>AURKB</i>		0,429	0,244
<i>AURKC</i>			0,844

Червоний напівжирний – $p < 0,01$

Результати проведеного аналізу у групі онкохворих пацієнтів продемонстрували незначне підвищення показника кореляції за Спірманом для генів *AURKA* і *AURKB* у порівнянні з результатами попереднього аналізу. Слід наголосити, що відносні експресії цих генів корелювали також і у тканинах аденокарцином передміхурової залози. Коефіцієнт кореляції Спірмана для генів *AURKC* і *BRAF* виріс з 0,668 для всієї вибірки до 0,844 для вибірки хворих на рак передміхурової залози.

При цьому у осіб, що не мали діагностованих онкологічних захворювань, статистично достовірною виявилась кореляція експресії *BRAF* з відносною експресією генів кінази Аугога А і Ауорога В ($r_s = 0,73$ і $0,738$ відповідно), але не з кіназою Ауорога С (таблиця 3.11).

Таблиця 3.11

Кореляція між експресією генів кінази родини Ауорога та кінази BRAF у циркулюючих клітинах з сечі осіб без онкологічних захворювань (показники r_s)

Символ гена	<i>AURKB</i>	<i>AURKC</i>	<i>BRAF</i>
<i>AURKA</i>	0,659453	0,315366	0,730146
<i>AURKB</i>		0,525691	0,738735
<i>AURKC</i>			0,303292

Примітки: **Червоний напівжирний – $p < 0,01$**

Ми провели аналіз кореляцій рівнів експресії досліджених нами кіназ з такими важливими клінічними показниками для РПЗ як ПСА і бал за шкалою Глісона. В результаті аналізу не було виявлено статистично достовірних кореляцій відносної експресії генів кіназ Ауорога А, Ауорога В, Ауорога С та кінази BRAF у клітинах, осаджених з сечі пацієнтів хворих на РПЗ та рівнями ПСА у їх крові. Бал за шкалою Глісона не корелював з експресією жодного гена крім гена кінази Ауорога А, проте і в цьому випадку коефіцієнт кореляції був низький (0,378, $p=0,0429$).

Підсумки:

1. Експресія генів *AURKA* і *AURKB* позитивно корелює у тканинах аденокарцином ($r_s=0.365$, $p<0.05$). З огляду на отримані дані щодо експресії генів *AURKA*, *AURKB* і *AURKC* у тканинах РПЗ, кінази родини Ауорога можуть відігравати різні ролі і діяти на різних етапах розвитку раку передміхурової залози.

2. Вищий рівень експресії *AURKC* у андрогенрезистентній клітинній лінії РСЗ ніж у інших клітинних лініях і позитивна кореляція експресії гену *AURKC* з експресією гену стероїдогенного ферменту

CYP17A1 у тканинах аденокарцином ($r^s = 0.370$, $p < 0.05$) може свідчити про можливий зв'язок кінази AuroraC з формуванням андроген-резистентного РПЗ.

3. Вища експресія гена кінази Aurora A у циркулюючих клітинах з сечі пацієнтів з РПЗ, ніж у групі осіб без онкозахворювань ($p = 0,014$) і кореляція ВЕ цього гена з балом за шкалою Глісона дає можливість розглядати показники експресії *AURKA* у клітинах з сечі як потенційний прогностичний маркер для РПЗ.

4. Сильна позитивна кореляція ($r_s = 0,844$, $p < 0.01$) рівнів відносної експресії *AURKC* і *BRAF* у клітинах з сечі хворих на РПЗ за відсутності такої кореляції у контрольній групі може вказувати на зміну регуляції сигнальних шляхів з залученням білкових продуктів цих генів при РПЗ.

Основні результати, представлені в розділі, опубліковані у:

1. Mankovska G. Gerashchenko, E. Rozenberg, E. Stakhovsky, O. Kononenko, Yu. Bondarenko, V. Kashuba/ Analysis of Aurora kinases genes expression points on their distinct roles in prostate cancer development.// Ukr.Biochem.J. 2019; Volume 91, Issue 6, Nov-Dec, pp. 15-26.

2. Маньковська, Асатрян О. Е., Вікарчук М. В., Кононенко О. А., Стаховський Е. О., Кашуба В. І. Визначення експресії генів кіназ AURORA A, AURORA B, AURORA C, BRAF і EGFR у сечі пацієнтів, хворих на рак передміхурової залози // Наукові записки НаУКМА . – 2016. – т.184. – с. – 16 -23.

3. Mankovska OS, Asatryan O. E., Vikarchuk M.V., Kononenko O. A., Stakhovsky E. O., Kashuba V. I. AURORA A, AURORA B, AURORA C AND BRAF KINASES GENE EXPRESSION IN SAMPLES OF URINE FROM PATIENTS WITH PROSTATE CANCER The 16th FEBS Young Scientists' Forum (YSF). - Kuşadası, Turkey, from 31st August – 3d of September, 2016.

3.4. Дослідження можливої участі довгої некодуєчої РНК PANDAR у канцерогенезі передміхурової залози та сечового міхура

3.4.1. Біоінформатичний аналіз взаємодії довгої некодуєчої РНК PANDAR з мікроРНК та генами, асоційованими з раком передміхурової залози та сечового міхура. Оскільки одним із найкраще описаних механізмів регуляції роботи генів довгими некодуєчими РНК є їх конкурентне зв'язування з мікроРНК, що залучення до регуляції даних генів, ми зосередили свою увагу на пошуці можливої участі PANDAR у канцерогенезі раку передміхурової залози та сечового міхура саме за цим механізмом.

Для передбачення мікроРНК, що можуть зв'язуватись з днРНК PANDAR, ми використали базу даних LncBook. В результаті нами було отримано список мікроРНК, які потенційно могли взаємодіяти з днРНК PANDAR. Було отримано 448 потенційних мікроРНК, які вона може зв'язувати і обрано серед них 50 найбільш ймовірних.

3.4.1.1. Визначення мікроРНК, які відіграють роль у розвитку раку сечового міхура та передміхурової залози. Отримані на минулому етапі мікроРНК були проаналізовані з використанням баз даних OncoPrint, dbDEMC 2.0 та miRCancer, які містять інформацію щодо участі мікро РНК у розвитку раку, проте через відмінність в джерелах, які використовують бази, результати аналізу за ними також відрізняються. Отримані результати аналізу баз даних вбудованими інструментами одразу проходили відбір за певними критеріями. Оскільки на основі попереднього огляду літератури ми припустили, що днРНК PANDAR функціонує як онкоген і її експресія зростає зі збільшенням ступеня злоякісності пухлини, для подальшого аналізу ми відбирали виключно ті випадки, в яких експресія передбачених мікроРНК була зменшена відносно норми.

При дослідженні мікроРНК, що можуть взаємодіяти з PANDAR, виявилось, що участь у розвитку передміхурової залози та сечового міхура доведена серед них лише для 14 мікроРНК. Результати дослідження наведені в таблиці 3.12.

Таблиця 3.12.

Список мікро РНК, що відіграють роль у розвитку РПЗ і РСМ і можуть зв'язуватись з PANDAR.

Назва мікроРНК	Участь у розвитку раку	
	Передміхурової залози	Сечового міхура
<u>hsa-miR-3934-3p</u>	-	+
<u>hsa-miR-3619-5p</u>	+	+
<u>hsa-miR-493-3p</u>	+	+
<u>hsa-miR-599</u>	-	-
<u>hsa-miR-612</u>	-	-
<u>hsa-miR-708-5p</u>	+	+
<u>hsa-miR-139-3p</u>	+	+
<u>hsa-miR-10b-3p</u>	+	+
<u>hsa-miR-28-5p</u>	+	-
<u>hsa-miR-376c-3p</u>	+	+
<u>hsa-miR-1827</u>	-	-
<u>hsa-miR-497-3p</u>	+	+
<u>hsa-miR-584-5p</u>	+	+
<u>hsa-miR-7-5p</u>	+	+

Для продовження роботи потрібно було визначити гени, підвищена експресія яких пов'язана з канцерогенезом сечового міхура та передміхурової залози і регулюються визначеними мікроРНК, і включити їх у подальший аналіз.

3.4.1.2. Визначені взаємодії передбачених мікроРНК та генів за допомогою алгоритму DIANAtools. Використання цього методу надало вичерпну інформацію щодо експериментально підтверджених взаємодій мікроРНК та генів. Саме через наявність експериментального підтвердження взаємодій ми брали ці результати надалі за основу для порівняння з іншими методами аналізу. Всього було проаналізовано 50 генів, окремо передбачених для кожного виду раку. Результати дослідження цим методом наведені в таблиці 3.13. При дослідженні виявилось, що більшість мікроРНК мають багато альтернативних мішеней, що робить їх вплив більш вагомим.

Таблиця 3.13.

Експериментально доведені взаємодії генів та мікроРНК, що можуть зв'язуватись з PANDAR і задіяні в розвитку РПЗ та РСМ

Рак передміхурової залози		Рак сечового міхура	
<i>MRPL15</i>	hsa-miR-7-5p	<i>BCL2L1</i>	hsa-miR-7-5p
<i>TPD52</i>	hsa-miR-7-5p	<i>ANP32E</i>	hsa-miR-708-5p
<i>TMEM65</i>	hsa-miR-7-5p	<i>POGZ</i>	hsa-miR-7-5p
<i>YWHAZ</i>	hsa-miR-708-5p	<i>BLCAP</i>	hsa-miR-3619-5p
<i>PTK2</i>	hsa-miR-7-5p	<i>APH1A</i>	hsa-miR-10b-3p
<i>TMEM65</i>	hsa-miR-497-3p	<i>AMOT</i>	hsa-miR-3619-5p

Продовження таблиці 3.13.

<i>MAL2</i>	hsa-miR-28-5p	<i>SF3B4</i>	hsa-miR-3619-5p
<i>PABPC1</i>	hsa-miR-3619-5p	<i>NECAB3</i>	hsa-miR-497-3p
<i>YWHAZ</i>	hsa-miR-497-3p	<i>PI4KB</i>	hsa-miR-708-5p
<i>ESRP1</i>	hsa-miR-7-5p	<i>BLCAP</i>	hsa-miR-708-5p
<i>NUDCD1</i>	hsa-miR-7-5p	<i>AMOT</i>	hsa-miR-7-5p
<i>POLR2K</i>	hsa-miR-7-5p	<i>ZNF337</i>	hsa-miR-7-5p
<i>OTUD6B</i>	hsa-miR-7-5p	<i>PI4KB</i>	hsa-miR-7-5p
<i>RNF139</i>	hsa-miR-7-5p	<i>DEDD</i>	hsa-miR-7-5p
<i>ANKRD46</i>	hsa-miR-376c-3p	<i>NDUFS2</i>	hsa-miR-376c-3p
<i>KIF16B</i>	hsa-miR-7-5p	<i>HIST2H2BE</i>	hsa-miR-7-5p
		<i>SKP2</i>	hsa-miR-7-5p
		<i>SF3B4</i>	hsa-miR-7-5p
		<i>SLC35C2</i>	hsa-miR-7-5p
		<i>PAK4</i>	hsa-miR-7-5p

Виходячи з цього аналізу можна визначити, що найбільш перспективними біомаркерами можуть слугувати мікроРНК у тандемі з PANDAR, які можуть з ним взаємодіяти і мають найбільшу кількість генів-мішеней, що надмірно експресуються при різних типах раку. Такими мікроРНК для раку передміхурової залози є hsa-miR-7-5p, для раку сечового міхура - hsa-miR-7-5p, hsa-miR-3619-5p і hsa-miR-708-5p. Спільною мікро РНК для цих типів раку сечостатевої системи виявилась hsa-miR-7-5p.

3.4.1.3 Визначені взаємодії передбачених мікро РНК та генів за допомогою алгоритму TorpMiR. Аналіз з використанням цього алгоритму доповнив отримані результати. Згідно з отриманими даними, при раку передміхурової залози, найкращою тандемною мікроРНК, яка впливає на експресію генів, пов'язаних з раком та може взаємодіяти з PANDAR, є hsa-miR-28-5P. До генів, пов'язаних з раком передміхурової залози і у регуляцію яких вона залучена, належать *COP55*, *YWHAZ*, *DERL1* і *PTDSS1*. Для раку сечового міхура було виділено мікроРНК hsa-miR-139-3p, яка регулює експресію гена *REM1*.

3.4.1.4. Визначені взаємодії передбачених мікро РНК та генів за допомогою алгоритму miRNet. Результати аналізу цим алгоритмом мають специфічну візуалізацію, і для визначення мікроРНК інтересу відбувається побудова усіх можливих взаємодій з передбаченими генами та передбаченими мікроРНК. Нами було проаналізовано кожен з передбачених мікроРНК, що можуть взаємодіяти з PANDAR при раку сечового міхура та передміхурової залози. Результати аналізу наведені у таблиці 3.14.

Таблиця 3.14.

Найбільш ймовірні мікроРНК, що можуть зв'язуватись з днРНК PANDAR і беруть участь у розвитку РПЗ та РСМ

Передміхурова залоза	Сечовий міхур
hsa-miR-28-5p	hsa-mir-708-5p
hsa-miR-7-5p	hsa-miR-7-5p
	hsa-mir-3619-5p

Примітка: **червоним** позначена мікроРНК, яка є спільною для цих типів раку

3.4.1.4. Визначення генів, експресія яких регулюється передбаченими мікро РНК. Задля повного розуміння мішеней опосередкованої взаємодії довгих некодуючих РНК треба було визначити, які гени більше всього піддаються регулюванню через мікроРНК. В цьому дослідженні ми вирішили визначити по 10 генів для кожного типу раку, що відіграють роль у розвитку пухлин сечостатевої системи і для яких є експериментально доведена регуляція передбаченими мікроРНК. В результаті ми обрали тільки ті гени, які регулюються більше ніж 2 передбаченими мікроРНК, що має посилювати опосередкований вплив днРНК PANDAR на їх експресію (таблиця 3.15).

Таблиця 3.15.

Гени, експресія яких регулюється 2 і більше з передбачених мікроРНК, що взаємодіють з днРНК PANDAR

Рак сечового міхура	Рак передміхурової залози
<i>PAK4</i>	<i>YWHAZ</i>
<i>ANP32E</i>	<i>UBE2V2</i>
<i>ENSA</i>	<i>ELOC</i>
<i>SKP2</i>	<i>ZNF7</i>
<i>RNF11</i>	<i>RMDN1</i>
	<i>GRINA</i>
	<i>PTK2</i>

3.5.2. Відносна експресія довгої некодуючої РНК PANDAR у клітинних лініях раку предміхурової залози та її відносні рівні у кондиційованому середовищі клітинних ліній та у сечі пацієнтів, хворих на рак предміхурової залози. У дослідження було включено три клітинні лінії раку предміхурової залози – PC3, LNCaP та DU145.

Довгі некодуючі РНК часто знаходяться у складі мікровезикул та екзосом і виділяються клітинами назовні, беручи таким чином участь зокрема у міжклітинній комунікації.

3.4.2.1. Експресія довгої некодуючої РНК PANDAR у клітинних лініях раку передміхурової залози та їх живильному середовищі. Нас цікавила наявність довгої некодуючої РНК PANDAR у кондиційованому середовищі клітинних ліній та співвідношення її рівнів з експресією у клітинах. Рівні довгої некодуючої РНК PANDAR визначали у клітинах та у їх кондиційованому середовищі, попередньо позбавленому залишків клітин та апоптичних тілець (рис.3.15).

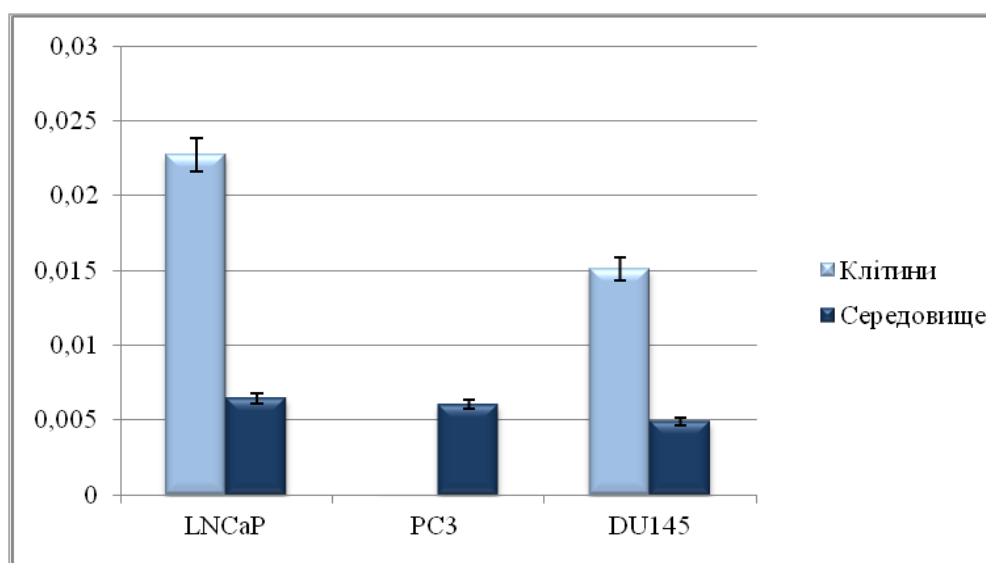


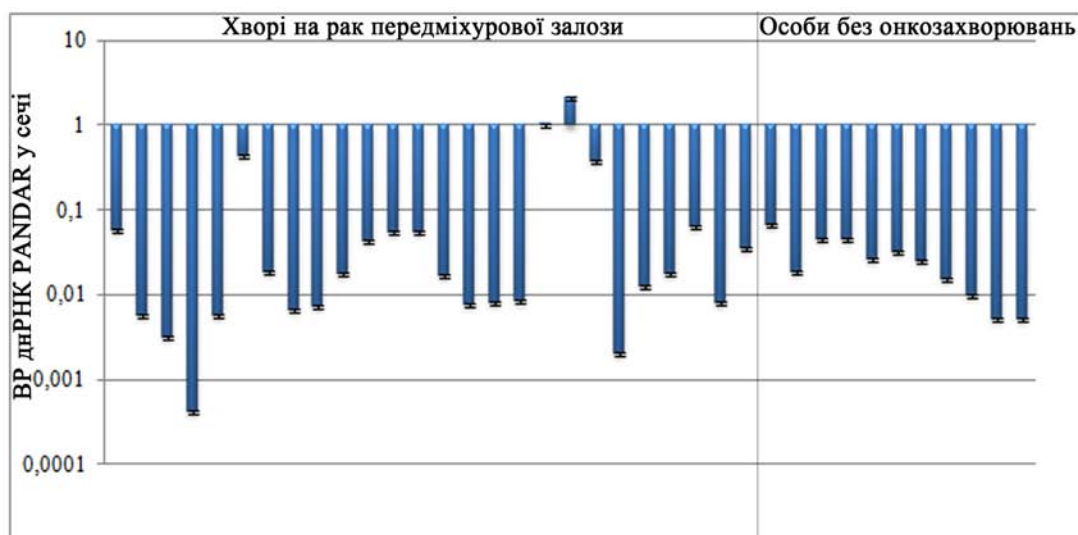
Рис. 3.15. Відносна експресія довгої некодуючої РНК PANDAR у клітинах та її відносні рівні у кондиційованому середовищі клітинних ліній раку передміхурової залози

Ми виявили, що досліджені клітинні лінії сильно відрізняються за рівнями внутрішньоклітинної та позаклітинної днРНК PANDAR. У клітинній лінії LNCaP рівень PANDAR у клітинах був найвищий серед інших клітинних ліній, у той час як найнижча відносна експресія PANDAR була у клітинах PC3. При цьому рівень позаклітинної днРНК PANDAR у

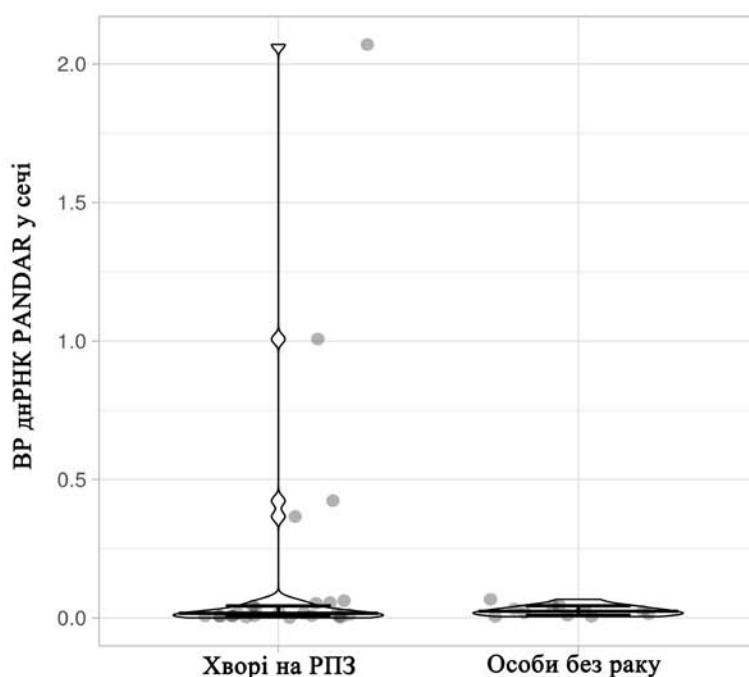
PC3 і LNCaP були майже ідентичні, у той час як у DU145 вони мали дещо нижчі показники. Співвідношення позаклітинних рівнів до внутрішньоклітинної експресії днРНК PANDAR для клітинних ліній LNCaP і LNCaP мало близькі значення і становило 0,28 і 0,32 відповідно, у клітинах лінії PC3 це значення сягало 1704,6.

3.4.2.2. Рівні днРНК PANDAR у сечі пацієнтів з раком передміхурової залози. Нами було визначено відносні рівні довгої некодуючої РНК PANDAR у безклітинній сечі пацієнтів з раком передміхурової залози (n=26), а також у групі осіб без онкологічних захворювань (n=11). Ми виявили, що дана некодуюча РНК присутня у сечі як хворих на РПЗ, так і осіб без раку (рис 3.16 (А)).

Провівши тест Манна-Вітні для виявлення можливої різниці між цими двома групами за критерієм рівнів у їх сечі позаклітинної днРНК PANDAR ми з'ясували, що статистично достовірної різниці між цими двома групами відсутня (рис. 3.16 (Б)). При цьому у групі хворих на рак спостерігався помітно більший розкид значень між індивідуальними зразками, у той час як що у групі здорових донорів цей показник був значно меншим. Стандартне відхилення для групи з раком сечового міхура становило 0,4434, тоді як для групи здорових донорів цей показник мав значення 0,0119.



А



Б

Рис. 3.16. Відносні рівні (BP) днРНК PANDAR у безклітинній сечі пацієнтів з раком передміхурової залози та в осіб без онкозахворювань: А) розраховані показники відносних рівнів днРНК PANDAR у безклітинній сечі; Б) Порівняння груп хворих на РПЗ та осіб без раку

Оскільки довга некодуюча РНК PANDAR була описана у літературі як прогностичний маркер розвитку пухлини, ми перевірили, чи є статистично достовірною різниця у рівнях даної некодуючої РНК у сечі

пацієнтів з ранньою (1-2) і пізньою (3-4) стадіями захворювання на рак передміхурової залози. Для цього ми використали непараметричний метод Манна-Вітні для порівняння двох незалежних виборок. Результати показали, що статистично значуща різниця між цими групами відсутня (рис. 3.17).

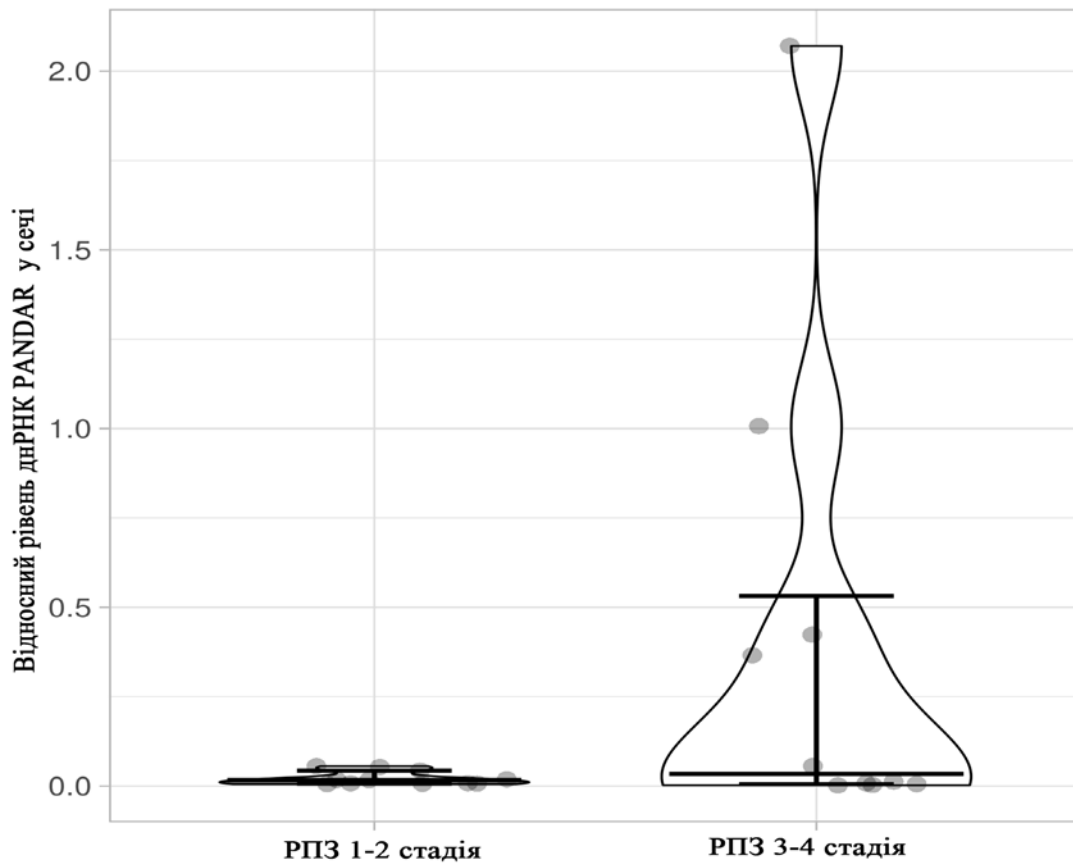


Рис 3.17. Рівні днРНК PANDAR у сечі хворих на рак передміхурової залози на різних стадіях захворювання

Для раку передміхурової залози важливими діагностичними критеріями є показник рівня ПСА у крові та ступінь пухлинної тканини за шкалою Глісона. Крім того, певні клінічні показники можуть мати залежність від віку пацієнта. Ми провели кореляційний аналіз рівнів днРНК PANDAR у сечі досліджуваної групи і цими клініко-патологічними

характеристиками хворих на РПЗ, що потрапили до нашої вибірки (рис 3.18).

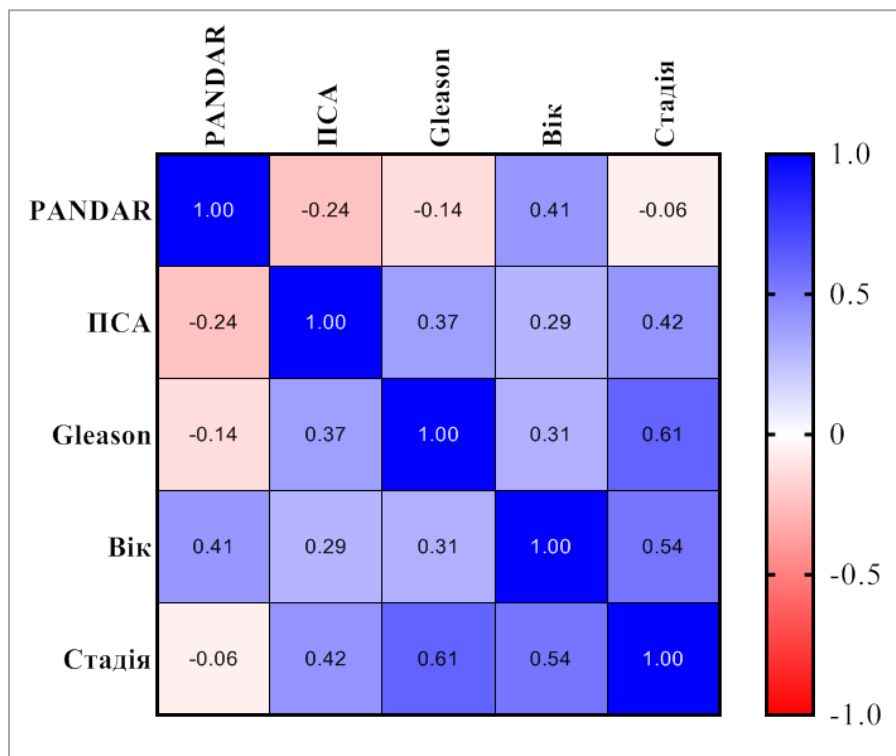


Рис 3.18. Мапа кореляцій між рівнем днРНК PANDAR та клініко-патологічними характеристиками пацієнтів з РПЗ

Результат аналізу не виявив статистично достовірних при $p < 0,05$ кореляцій між рівнем днРНК PANDAR та клініко-патологічними характеристиками пацієнтів з РПЗ. Статистично достовірними виявились кореляція балу за шкалою Глісона і стадії пухлини ($p=0,01$), а також стадії пухлини і віку ($p=0,026$).

3.4.3. Експресія довгої некодуючої РНК PANDAR у тканинах пухлин та прилеглих нормальних тканинах та її відносні рівні у сечі пацієнтів з раком сечового міхура.

Нами було доліджено експресію днРНК PANDAR у клінічних зразках тканин пацієнтів з раком сечового міхура. У сечі хворих на РСМ

ми визначали кількісні показники відносних рівнів циркулюючої PANDAR з метою оцінити співвідношення цих рівнів хворих на рак і контрольної групи без онкозахворювань і оцінити потенційну можливість її використання як неінвазивного маркеру РСМ.

3.4.3.1. Експресія днРНК PANDAR у тканинах пацієнтів, хворих на рак сечового міхура. Експресію довгої некодуючої РНК PANDAR вже визначали у пухлинних тканинах сечового міхура інші дослідники і ними було зроблено припущення про те, що ця довга некодуюча РНК може бути прогностичним маркером для даного злоякісного новоутворення. Ми провели аналіз експресії днРНК PANDAR на зразках пухлин раку сечового міхура та прилеглих гістологічно нормальних тканинах (n=24) методом кількісної ПЛР (рис 3.19).

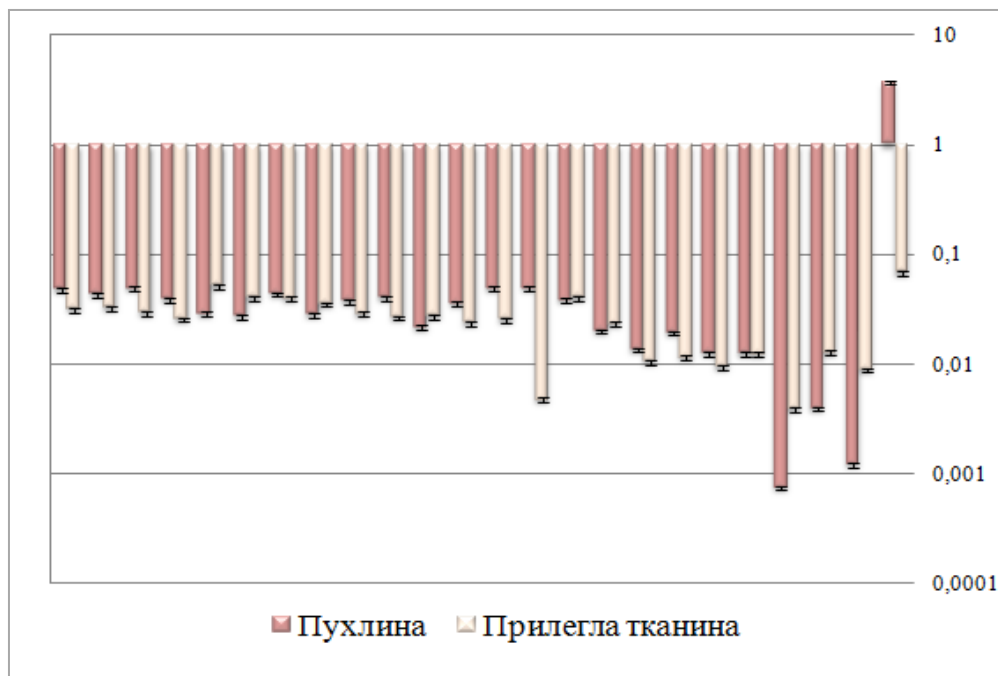


Рис 3.19. Рівні відносної експресії днРНК PANDAR у пухлинах і прилеглих гістологічно нормальних тканинах пацієнтів з раком сечового міхура

Першим чином ми перевірили наявність різниці у експресії довгої некодуючої РНК PANDAR між пухлинними та гістологічно нормальними

прилеглими тканинами пацієнтів. Для її визначення ми використали непараметричний тест для попарних порівнянь Вілкоксона. Результат тесту показав, що статистично достовірної різниці між порівнюваними групами не спостерігалось ($p=0,08$). Після проведеного нами аналізу кореляцій з застосуванням критерія Спірмана було виявлено, що відносна експресія днРНК PANDAR достовірно позитивно корелювала ($r_s=0,548$, $p=0,006$) у зразках пухлин і у прилеглих до них нормальних тканинах.

Наступним кроком було виявлення можливої різниці у ВЕ днРНК PANDAR у пухлинних тканинах у пацієнтів з раком сечового міхура на різних стадіях. З цією метою ми використали непараметричний тест Манна-Вітні для порівняння двох незалежних виборок. Результати аналізу показали відсутність статистично достовірної різниці між досліджуваними групами.

Дані описової статистики щодо ВЕ днРНК PANDAR у пухлинних тканинах пацієнтів з 1-2 і 3-4 стадіями показали, що для зразків, взятих у пацієнтів на пізніх стадіях РСМ коефіцієнт варіації і розкид значень суттєво вищі ніж у групи з ранніми стадіями захворювання (таблиця 3.14)

Таблиця 3.16

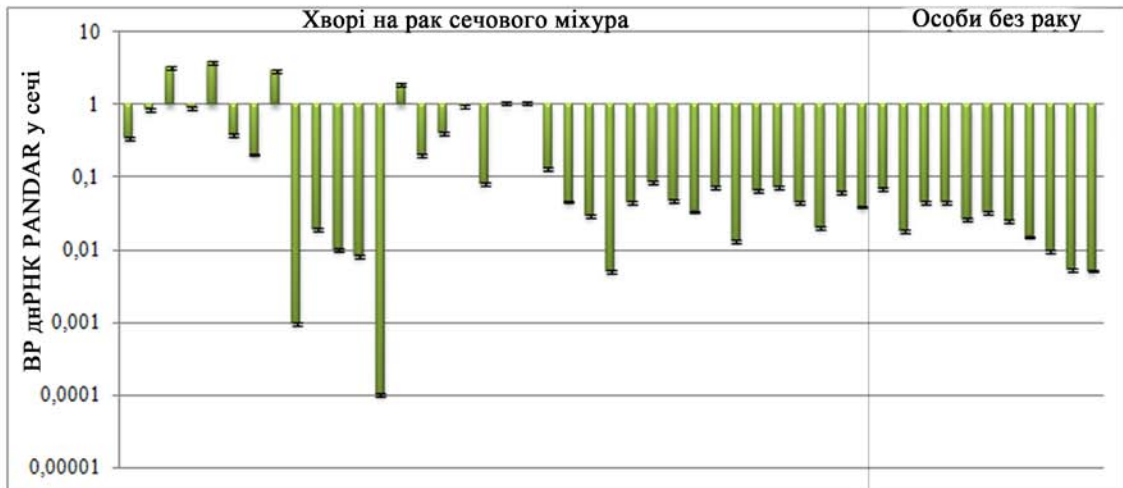
Описова статистика ВЕ днРНК PANDAR у пухлинних тканинах раку сечового міхура на 1-2 і 3-4 стадіях

Показник	1-2 стадія РСМ	3-4 стадія РСМ
Мінімум	0,001219	0,0007450
25% процентіль	0,01958	0,02084
Медіана	0,02876	0,04299
75% процентіль	0,04022	0,04887
Максимум	0,04904	3,732

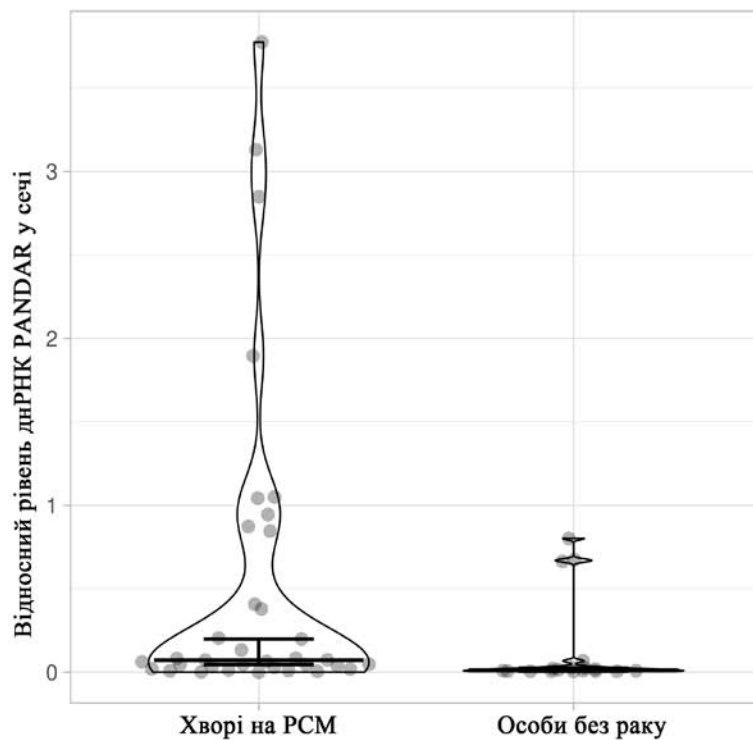
Продовження таблиці 3.16.

Розмах	0,04782	3,731
10% процентіль	0,001219	0,0007450
90% процентіль	0,04904	3,732
Середн. значення	0,02902	0,4446
Стандартне відхилення	0,01443	1,233
Стандартна похибка середнього	0,004810	0,4110
Коефіцієнт варіації	49,72%	277,3%

3.4.3.2. Визначення відносних рівнів довгої некодуючої РНК PANDAR у сечі хворих на рак сечового міхура. Ми перевірили відносні рівні довгої некодуючої РНК PANDAR у сечі хворих на рак сечового міхура (n=36). Для порівняння була створена вибірка осіб без раку (змішана «сліпа» група пацієнтів з запаленням і умовно здорових донорів) (n=11). днРНК PANDAR була виявлена у 35 з 36 зразків РНК, виділеної з безклітинної сечі пацієнтів, хворих на рак сечового міхура. Також вона визначалась у осіб з контрольної групи (рис 3.20).



А



Б

Рис. 3.20. Відносні рівні днРНК PANDAR у сечі хворих на рак сечового міхура і осіб без онкозахворювань: А) розраховані показники відносних рівнів днРНК PANDAR у безклітинній сечі; Б) Порівняння груп хворих на РСМ та осіб без раку.

Першим чином нас цікавило, чи існує статистично достовірна різниця між рівнями днРНК PANDAR у сечі хворих на рак і осіб, що не мали діагностованих онкологічних захворювань (рис. 3.20). Для того, щоб

з'ясувати це, ми провели аналіз отриманих даних, використовуючи критерій Манна-Вітні.

Результати тесту Манна-Вітні показали наявність статистично значущої різниці у рівнях довгої некодуючої РНК PANDAR у кондиційованій сечі пацієнтів з раком сечового міхура і умовно здорових осіб ($t=87$, $p=0,0043$). При цьому описова статистика, як і для раку передміхурової залози, виявила великий коефіцієнт варіації у групі хворих на рак у порівнянні з контрольною групою.

Для оцінки потенційної можливості рівня днРНК PANDAR у сечі відрізнити пацієнтів з раком від здорових осіб ми використали ROC-аналіз (рис 3.21.) Результати виявили, що за відносними рівнями довгої некодуючої РНК PANDAR у безклітинній сечі можна відрізнити між собою досліджувані групи. Площа під ROC кривою становила 0,7803, $p = 0,0053$.

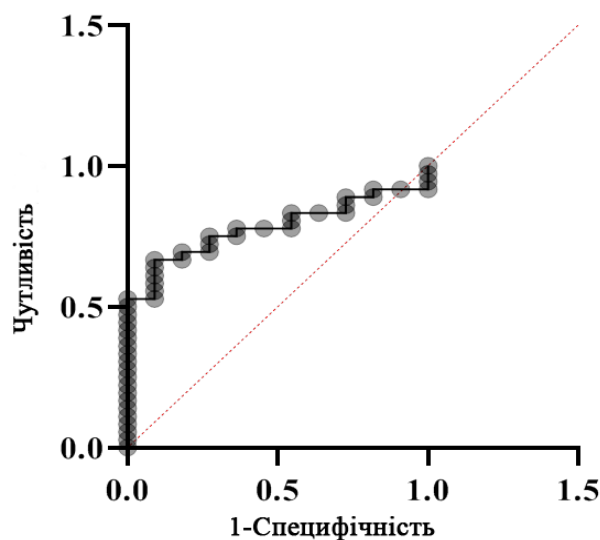


Рис 3.21. ROC крива, що показує можливість за показниками відносних рівнів днРНК PANDAR у сечі відрізнити хворих на рак сечового міхура від здорових донорів

Аналогічно попереднім дослідженням, ми розділили нашу вибірку на 2 групи: зразки пацієнтів з ранніми (1-2) стадіями раку сечового міхура і пізніми (3-4) стадіями цього захворювання. Порівнявши ці дві групи за допомогою методу Манна-Вітні, ми виявили, що різниця між стадіями за показником відносних рівнів PANDAR у зразках безклітинної сечі відсутня (рис 3.22).

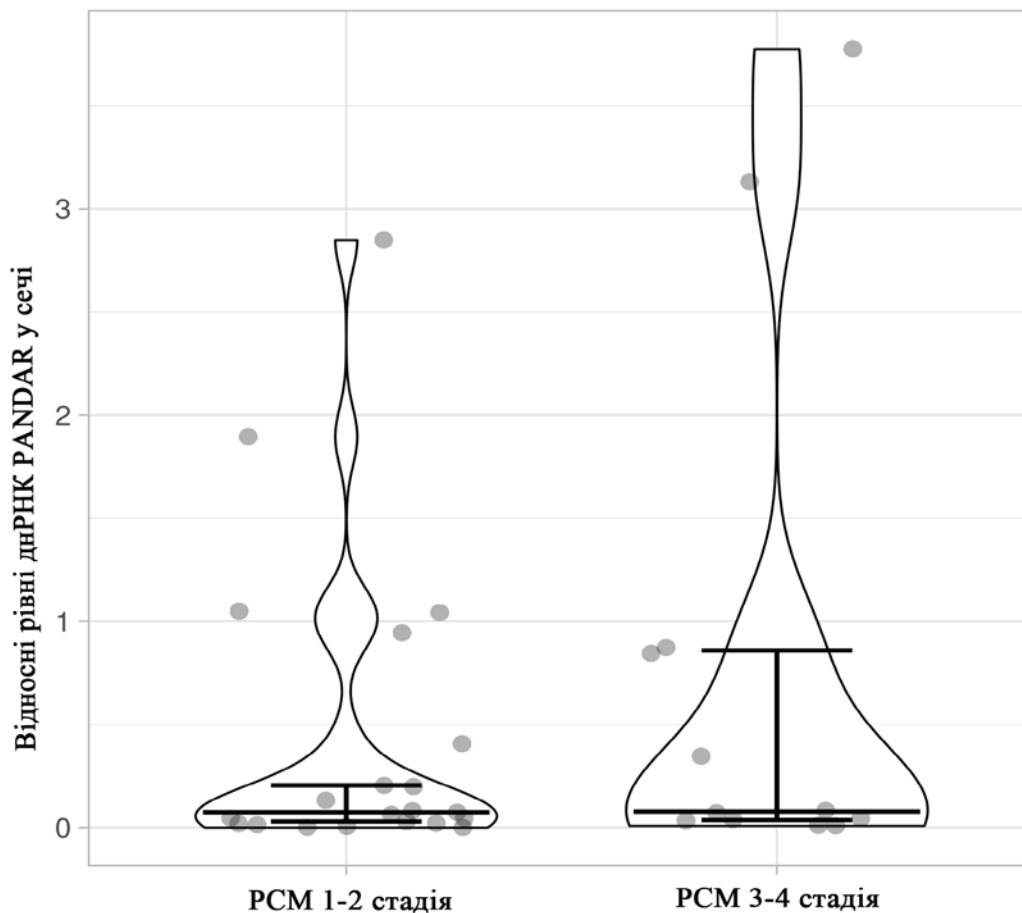


Рис 3.22. Відносні рівні днРНК PANDAR у сечі пацієнтів хворих на РСМ на різних стадіях захворювання

Ми дослідили можливі кореляції рівнів днРНК PANDAR з такими характеристиками пацієнтів, як вік, стать і стадія захворювання (рис 3.23). У результаті нами не було виявлено достовірних кореляції (при $p < 0,05$) між рівнями досліджуваної некодууючої РНК і стадією пухлини, а також зі статтю пацієнтів. При цьому аналіз кореляцій показав статистично

достовірний зворотній кореляційний зв'язок між рівнем днРНК PANDAR і віком пацієнтів ($p=0,013$).

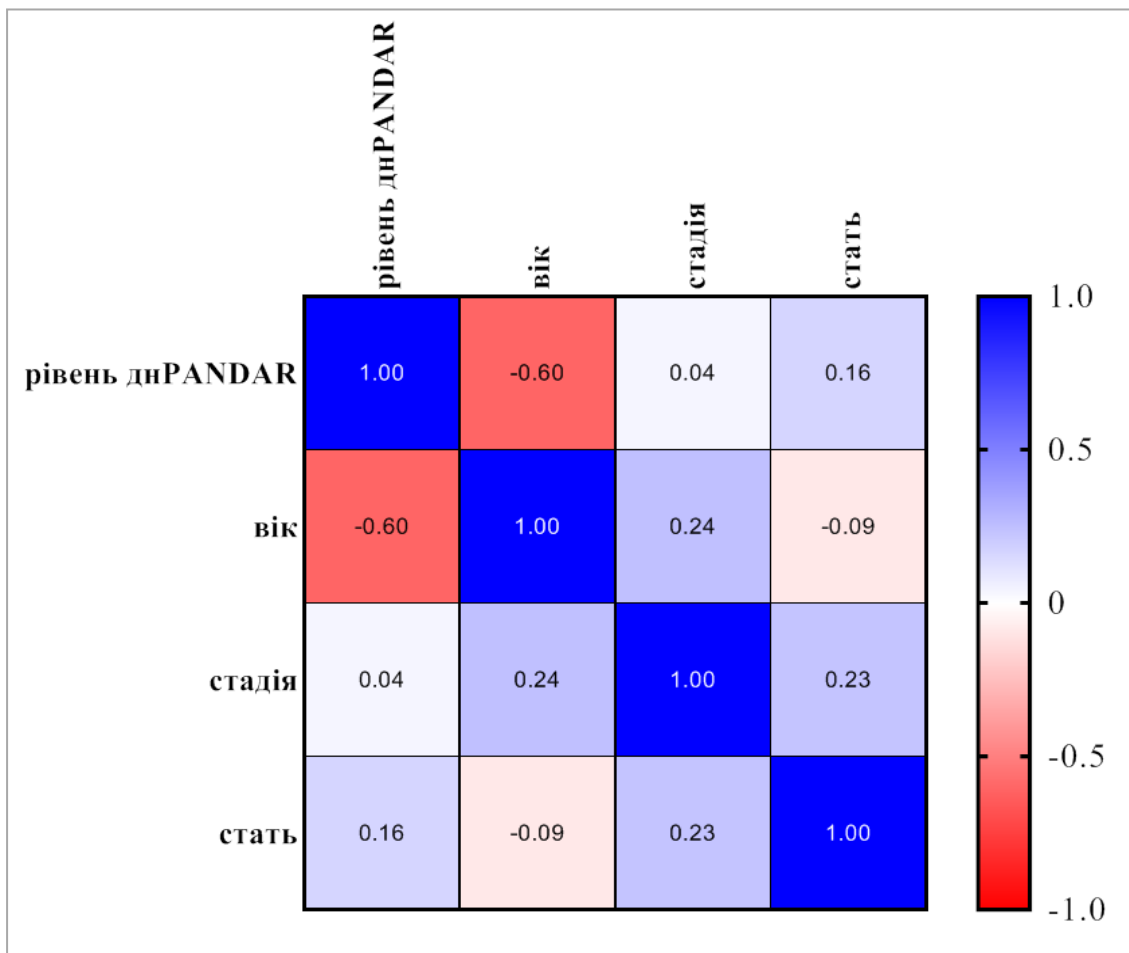


Рис. 3.23. Кореляція за Спірманом між рівнями PANDAR у сечі і клініко-патологічними характеристиками пацієнтів

Наступним етапом нашого дослідження було перевірити, чи існують статистично достовірні закономірності у показниках відносної експресії PANDAR у тканинах пацієнтів з раком сечового міхура і відносних рівнях цієї некодуєчої РНК у сечі тих самих пацієнтів. Для цього ми знову застосували метод кореляційного аналізу за Спірманом. Тест не виявив статистично достовірних кореляцій.

3.4.3.3. Порівняння відносних рівнів довгої некодуєчої РНК PANDAR у сечі пацієнтів з раком передміхурової залози і сечі

пацієнтів з раком сечового міхура. Отримані дані про рівні днРНК PANDAR у сечі хворих на 2 різні онкологічні захворювання дали нам можливість порівняти між собою рівні днРНК PANDARу пацієнтів з раком передміхурової залози та раком сечового міхура. Результат теста Мана-Вітні виявив статистично значущу різницю у відносних рівнях днРНК PANDAR між досліджуваними групами хворих ($t=258$, $p=0,0024$), (рис 3.24). При цьому хворі на РСМ відзначались вищими рівнями PANDAR, ніж хворі на РПЗ.

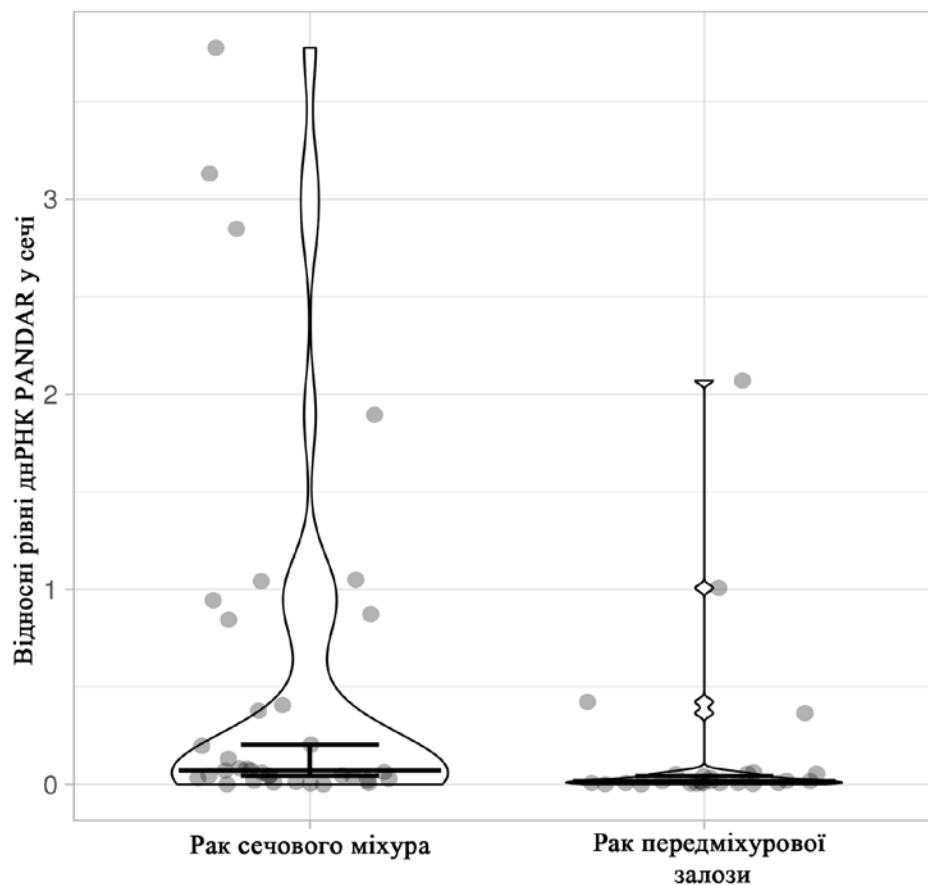


Рис 3.24. Рівні днРНК PANDAR у сечі пацієнтів хворих на рак сечового міхура та на рак передміхурової залози.

Підсумки:

1. З огляду на попередній біоінформатичний аналіз та дані відносної експресії у клітинних лініях РПЗ, тканинах раку сечового міхура та їх парних умовно-нормальних тканинах, довга некодуюча

РНК PANDAR може бути залучена як у канцерогенез сечового міхура, так і у канцерогенез передміхурової залози, проте механізм і характер її впливу може відрізнятись.

2. Визначення відносних рівнів днРНК PANDAR у сечі хворих на рак передміхурової залози не виявило достовірної різниці у порівнянні з її рівнями у сечі здорових донорів, у той час як у пацієнтів з раком сечового міхура відносні рівні днРНК PANDAR статистично достовірно вищі, ніж у контрольної групи і на основі даних ROC аналізу можуть відрізнити хворих на рак сечового міхура від здорових осіб (AUC=0,7803, p=0,0053).

Основні результати, представлені у розділі, опубліковані у:

1. Mankovska OS, O. S. Skrypnikova, V. I. Kashuba Detection of methylation of tumor supressor genes and identification of expression profile of non-coding rnas in samples of urine from patients with bladder cancer// Biopolymers and Cell. 2018. Vol. 34. N 2. P 155.

3.5. Поєднання кількісних та якісних характеристик нуклеїнових кислот, отриманих з сечі пацієнтів з раком передміхурової залози та сечового міхура для неінвазивної діагностики цих захворювань

Епігенетичні зміни і зміни в експресії генів, з одного боку, є пов'язаними подіями, але враховуючи гетерогенність досліджуваних злоякісних новоутворень, неоднорідність виборок (присутність пацієнтів з різними стадіями, різного віку та статі (у випадку з раком сечового міхура), а також з огляду на диференційну експресію і відносні рівні досліджуваних РНК, було вирішено проаналізувати усі досліджені епігенетичні та експресійні зміни, що були виявлені у різному матеріалі

сечі хворих на рак передміхурової залози та рак сечового міхура, для кожного пацієнта. Ми мали на меті виявити наявність або відсутність певних закономірностей у прояві тих чи інших змін у матеріалі хворих, попередньо оцінити їх здатність підсилювати або доповнювати інформацію про стан пацієнта.

3.5.1. Позаклітинні ДНК та РНК і мРНК з клітин у сечі хворих на рак передміхурової залози. Серед пацієнтів з раком передміхурової залози для 17 осіб було визначено відносні рівні днРНК PANDAR у кондиційованій сечі хворих і проаналізовано наявність метилування у пкДНК цих пацієнтів генів *NKX3.1*, *RASSF1A*, *PTEN*, *GDF15*, *KRT18* та *CDH1*. Ми провели кореляційний аналіз, застосувавши непараметричний критерій Спірмана, для цієї групи хворих на РПЗ для пошуку кореляцій між метилуванням та відносними рівнями днРНК PANDAR у цих пацієнтів. У результаті не було виявлено кореляцій між кількістю метильованих промоторів зазначених генів у цих зразках та рівнями у них досліджуваної некодуючої РНК ($r_s=0,06$, $p=0,81$), що може вказувати на незалежність цих подій і можливе різне значення для оцінки стану хворого.

Ми перевірили наявність кореляцій між експресією генів *AURKA*, *AURKB*, *AURKC* та *BRAF* у зразках клітин, осаджених з сечі пацієнтів, хворих на рак передміхурової залози і відносними рівнями днРНК PANDAR у сечі цих пацієнтів. Результати показали наявність статистично достовірних позитивних кореляцій між рівнями днРНК PANDAR та експресією у клітинах із цих зразків генів кіназ *AURKC* і *BRAF* ($r_s= 0,51$ і $0,57$, відповідно, $p<0,05$), рис 3.25.

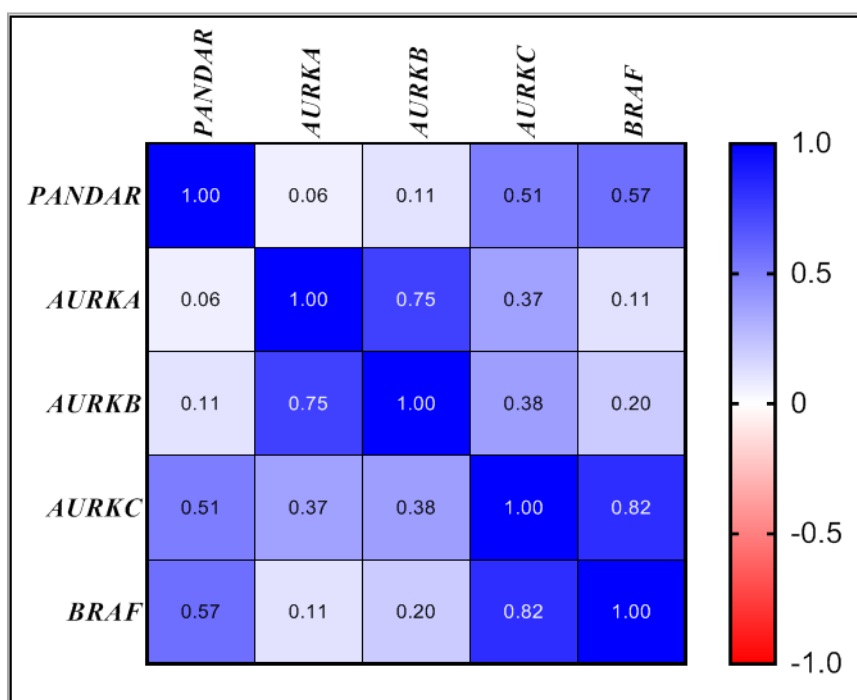


Рис. 3.25. Мапа кореляцій між експресією генів *AURKA*, *AURKB*, *AURKC* та *BRAF* у зразках клітин, осаджених з сечі пацієнтів, хворих на рак передміхурової залози і відносними рівнями днРНК *PANDAR* у сечі цих пацієнтів.

3.5.2. Метилування генів-онкосупресорів та відносні рівні днРНК *PANDAR* при раку сечового міхура. Для того, щоб оцінити інформативність поєднання виявлення у безклітинній сечі пацієнтів метилування промоторів генів-онкосупресорів на основі аналізу присутньої там ДНК та відносних рівнів позаклітинної днРНК *PANDAR* ми проаналізували кореляцію цих показників між собою. У результаті кореляційного аналізу з використанням критерію Спірмана ми не виявили статистично достовірної кореляції між рівнями *PANDAR* та кількістю гіперметильованих генів у досліджуваних зразках.

За даними нашого попереднього статистичного аналізу, ефективним для диференціації хворих на рак від осіб без онкопатологій виявився набір *VIM*, *TMEFF2*, *GDF15*, *RASSF1A* і *NKX3.1*. Враховуючи це, ми

проаналізували кореляцію метилювання генів саме з цього набору з відносними рівнями у сечі днРНК PANDAR і виявили відсутність такої і для цієї вибірки.

Ми припустили, що додавши до показників наявності метилювання генів з набору *VIM*, *TMEFF2*, *GDF15*, *RASSF1A* і *NKX3.1* рівні днРНК PANDAR у безклітинній сечі, що також характеризувались здатністю відрізняти хворих на рак сечового міхура від осіб без раку, ми зможемо більш ефективно відрізнити ці дві групи. Для того, щоб перевірити це припущення, ми провели аналіз методом простої логістичної регресії і побудували ROC криву (рис 3.26). Площа під ROC кривою, отриманою в результаті даного аналізу, становила 0,909, $p=0,0007$.

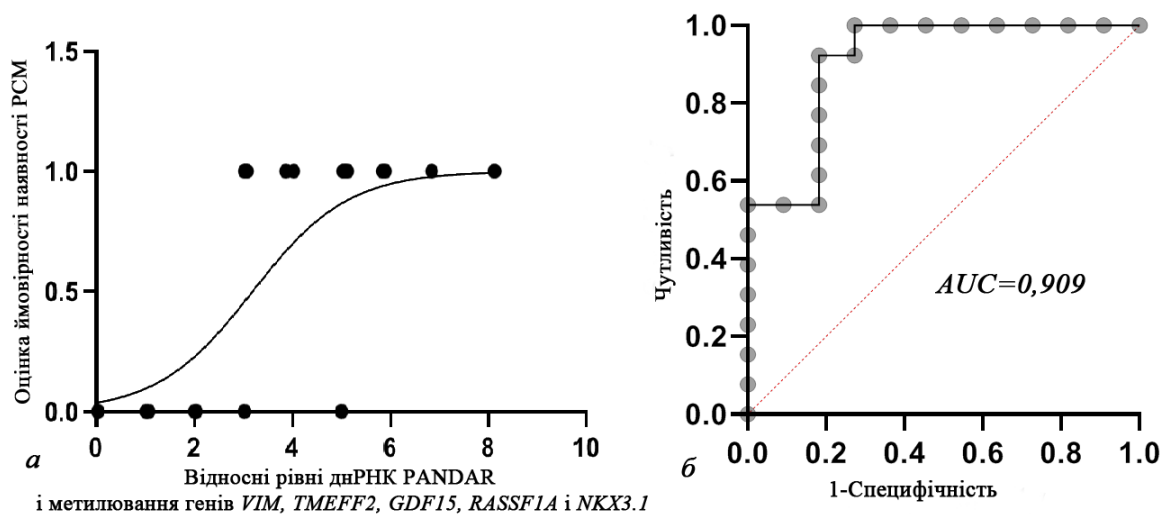


Рис.3.26. Результати розрахунків простої логістичної регресії (а) і ROC-аналізу (б) комбінації відносних рівнів днРНК PANDAR і метилювання генів *VIM*, *TMEFF2*, *GDF15*, *RASSF1A* і *NKX3.1* у безклітинній сечі для виявлення раку сечового міхура

Таким чином, додавши днРНК PANDAR до панелі маркерів на основі метилювання, можна підвищити чутливість методу неінвазивної діагностики раку сечового міхура.

Підсумки:

1. Відсутність кореляції між наявністю метилювання набору генів *PTEN*, *CDH1*, *NKX3.1*, *RASSF1A* та *GDF15* та рівнями днРНК PANDAR у безклітинній сечі хворих на РПЗ може вказувати на незалежність цих подій і можливе різне значення для оцінки стану хворого, у той час як позитивні кореляції між рівнями днРНК PANDAR та експресією у клітинах із цих зразків генів кіназ *AURKC* і *BRAF* можуть свідчити про наявність між цими явищами прямих чи опосередкованих зв'язків, що потребують подальшого дослідження.

2. Додавання визначення рівнів днРНК PANDAR до панелі маркерів на основі метилювання генів *VIM*, *TMEFF2*, *GDF15*, *RASSF1A* і *NKX3.1* потенційно здатне підвищити чутливість методу неінвазивної діагностики раку сечового міхура (AUC=0,909, p=0,0007).

Основні результати, представлені у розділі, опубліковані у:

1. O. E. Asatryan, Mankovska O, V. I. Kashuba Changes in expression of oncogenes and methylation of tumor suppressor genes in urine from patients with prostate cancer. Biopolymers and Cell. 2018. Vol. 34. N 2. P 143 Materials of XII annual Conference of Young Scientists Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine

2. Mankovska OS, Asatryan O. E., Vikarchuk M.V., Kononenko O. A., Stakhovsky E. O., Kashuba V. I. Expression of AURORA C Kinase Gene Correlates with BRAF Gene Expression in Samples of Patients with Prostate and Thyroid Cancer. The 12th International Congress of Cell Biology. – July 21-25 2016. – Prague, Czech Republic.

РОЗДІЛ 4

АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Таким чином дані, отримані у представленій роботі, доповнюють уже існуючу інформацію про потенціал неінвазивної діагностики двох типів пухлин сечостатевої системи, а саме, раку передміхурової залози та раку сечового міхура. Ми розглянули різноманітні типи маркерів, що можуть бути виявлені у клітинних та позаклітинних нуклеїнових кислотах з сечі індивідів, а саме експресійні маркери в осаджених з сечі клітинах, метилювання у позаклітинній ДНК та рівні позаклітинної днРНК PANDAR. Усі потенційні маркери додатково були верифіковані різними методами: визначенням відносної експресії в тканинах досліджуваних пухлин, відносної експресії у клітинних лініях, відносними рівнями у кондиційованому середовищі клітинних ліній, рівнями метилювання у тканинах пухлин, біоінформатичними та біоінформаційними методами.

Дані, отримані нами щодо метилювання промоторів генів *CDH1* та *RASSF1A* у клітинних лініях раку передміхурової залози, в цілому підтверджують попередні результати [121], які продемонстрували високий рівень метилювання *RASSF1A* у клітинних лініях РПЗ з найвищим рівнем метилювання у клітинах лінії PC3 та приблизно однаковим у LNCaP та DU145. Метилювання CpG у регіоні промотора *NKX3.1* також раніше вивчали в клітинних лініях LNCaP, PC3 та DU145 [122]. У цьому дослідженні автори перевіряли вплив деметилюючих агентів (5-азацитидину та трихостатину А) на метилювання *NKX3.1* у клітинних лініях РПЗ та встановили, що дані сполуки не впливали на рівні метилювання цього гена та його експресію на рівні мРНК.

Метилування промотору гена *PTEN* не досліджувалося в клітинній лінії PC3, напевно, через гомозиготну делецію *PTEN* у цих клітинах. Ця клітинна лінія характеризується стабільною відсутністю експресії *PTEN* як на рівні білкового продукту, так і на рівні мРНК. Це пов'язане з тим, що область 10q хромосоми, включаючи локус *PTEN*, часто підлягає делеції при раку передміхурової залози, і раніше повідомлялося, що клітини PC3 несуть гомозиготну делецію *PTEN*, тоді як клітинна лінія LNCaP демонструє лише гетерозиготні зміни в цій області [123]. Аналіз делецій регіону 10q виявив, що у різних зразках РПЗ розмір видаленого фрагмента сильно варіює, зокрема для гена *PTEN* він може коливатися від моноекзонної делеції до видалення всього гена [124]. Більше того, секвенування поодиноких клітин, виконане на клітинних лініях РПЗ, підтвердило втрату *PTEN* у PC3 у 86% (6 із 7 проаналізованих зразків) [125]. У своєму дослідженні ми виявили наявність дуже низьких рівнів метилування промотору *PTEN* і припускаємо, що, можливо, ми реєструємо метилування, що наявне у незначній кількості клітин з інтактним геном *PTEN*. Ще одним варіантом пояснення нашого спостереження є те, що метилування може бути подією, яка вимкнула ген і зробила цю область на хромосомі 10q еволюційною несприятливою, а отже, придатною для видалення з геному. Інше пояснення полягає в тому, що ці CpG були метильовані після того, як відбулась делеція і область стала транскрипційно неактивною.

Парні пухлини та оточуючі їх гістологічно нормальні тканини традиційно використовуються як групи для порівняння в дослідженнях раку. У нашому дослідженні ми не виявили статистично значущих відмінностей у рівнях метилування промоторів досліджуваних генів між цими двома групами. Проте вже було описано, що прилеглі тканини піддаються низці молекулярних змін. На жаль, важко отримати клінічні зразки тканин із здорових органів, особливо для передміхурової залози.

Тим не менше, є деякі дослідження, які вивчали молекулярні структури пухлин, оточуючих пухлину тканин і здорових органів, і виявили, що сусідні тканини пухлини відрізняються як від ракових, так і від здорових тканин. Існує думка, що мікросередовище пухлини відіграє вирішальну роль у таких змінах [126]. Більше того, аналізуючи CNV і метилювання в нормальному епітелії молочних залоз і сусідніх з пухлиною тканинах хворих на рак молочної залози, Gao зі співавторами виявили, що саме метилювання, але не CNV, здатне відрізнити ці дві гістологічно нормальні тканини одна від одної. Автори припускають, що це є непрямими доказами того, що епігенетичні зміни є найбільш ранньою подією канцерогенезу і можуть служити ефективними онкомаркерами, але в той самий час наголошують на тому, що їх значимість може бути різною для різних типів раку [127]. Згідно з усіма цими дослідженнями, відсутність різниці в метилюванні між пухлиною та парними звичайно нормальними тканинами добре пояснюється. Подібні патерни метилювання простати та парних звичайних нормальних тканин підтверджують теорію, що події метилювання є одними з найбільш ранніх змін, які відбуваються в клітинах і можуть призвести до їх малігнізації [128]. Виходячи з результатів, отриманих у цій роботі, серед досліджуваних генів це твердження є особливо ймовірним для *CDH1*, *PTEN* та *NKX3.1*, рівень метилювання яких у тканинах аденокарцином простати позитивно корелює з їх метилюванням в прилеглих нормальних тканинах. Крім того, це може звернути увагу на роль мікросередовища та передачі сигналів від клітини до клітини у пов'язаному з раком метилюванні.

У поточному дослідженні ми мали на меті проаналізувати метилювання у зразках хворих на рак передміхурової залози різними способами для кращого розуміння інформативної сили таких епігенетичних змін та їх здатності до відображення наявної картини розвитку та прогресування РПЗ. Таким чином, одним із критеріїв, який ми

використали для порівняння, була наявність або відсутність гібридних транскриптів у досліджуваних зразках, а саме транскрипту TMPRSS2:ERG.

TMPRSS2:ERG є одним із найпоширеніших гібридних транскриптів при раку передміхурової залози, і ряд досліджень повідомляє про зв'язок цього аберантного злиття з несприятливим клінічним прогнозом захворювання [129]. Проте було показано, що його трансгенна експресія призводить лише до утворення передракових осередків, тож для малігнізації необхідні додаткові молекулярні зміни [130]. Однією з таких змін може бути втрата експресії *PTEN*, що кодує ліпідну фосфатазу, причетну до негативної регуляції шляху 3-кінази фосфатидилінозитулу [131]. Незважаючи на той факт, що наші результати продемонстрували відносно низький рівень метилювання *PTEN* у тканинах РПЗ, наші попередні результати аналізу експресії *PTEN* у цих тканинах продемонстрували значно нижчий PE *PTEN* у зразках, які несли транскрипт TMPRSS2:ERG [132].

Білковий продукт гена *RASSF1A* бере участь у супресії пухлини [133], а саме у супресії сигнального шляху RAS / RAF / MEK / ERK. Цікаво, що раніше було виявлено здатність гібридного транскрипту TMPRSS2:ERG активувати генетичні мішені цього шляху, навіть якщо RAS / ERK-сигналізація неактивна [134]. У даній роботі ми спостерігали високий рівень метилювання *RASSF1A* у TMPRSS2:ERG-позитивних зразках, що пояснює можливість такої активації за відсутності гальмівних сигналів. Більше того, одним з основних механізмів онкосупресорної функції *RASSF1A* є його взаємодія із структурами цитоскелета, особливо мікротрубочками [18]. Мовчання гену *RASSF1A*, як правило, призводить до порушень під час формування мітотичного веретена та хромосомних аберацій, що виникають внаслідок дестабілізації тубуліну [135]. Отже, ми можемо припустити, що утворення гібридних транскриптів може бути

наслідком епігенетичного вимкнення *RASSF1A*. Це також відповідає загальновідомому твердженню, що епігенетичне приглушення експресії гена, особливо метилювання, є найбільш ранніми подіями в процесі онкогенезу.

Серед усіх результатів цього дослідження найбільш суперечливими є дані про метилювання *NKX3.1* та кореляцію його з експресією та метилюванням *CDH1*. Ми спробували пояснити ці дані, спираючись на ряд попередніх робіт інших авторів. Зокрема, в одному з цих досліджень з використанням метилспецифічної ПЛР та бісульфітного секвенування було продемонстровано відсутність метилювання гена *NKX3.1* (за винятком одного зразка) у тканинах раку передміхурової залози [136]. У той же час інше дослідження [137] показало наявність метилювання в промоторній області *NKX3.1* у тканині раку передміхурової залози, але лише у певних ділянках CpG. Проте висновок обох досліджень полягав у тому, що експресія *NKX3.1* не регулюється метилюванням, оскільки не було міцних зв'язків між рівнем мРНК та метилюванням цього гена. Пізніші дослідницькі роботи Kunderfranco зі співавторами [25] пролили світло на ці явища. Вони помітили, що ERG може знижувати регуляцію експресії *NKX3.1* за допомогою активації транскрипції білка EZH2. EZH2 індукує епігенетичне приглушення *NKX3.1* за допомогою метилювання гістону H3K27. Автори також продемонстрували, що в ERG-негативній клітинній лінії раку передміхурової залози PC3 CpG промотору *NKX3.1* були метильовані, і ці клітини не експресували мРНК *NKX3.1*. Схожі механізми регуляції були також описані раніше для гена *CDH1* [138], що може пояснити позитивну кореляцію між рівнями відносної експресії цих генів та відсутність суттєвої кореляції між метилюванням їх промоторів та рівнем експресії. Крім того, на результати нашого дослідження та роботи інших дослідників впливають конкретні CpG, обрані для аналізу, і метилювання різних CpG може відігравати різну роль у регуляції *NKX3.1* і,

ймовірно, інших генів. *CDH1* та *NKX3.1* беруть участь у підтримці нормального фенотипу епітеліальних клітин і, як повідомляється, вони обидва залучені до злоякісного переродження клітин передміхурової залози [139, 140]. Метилування CpG в їх промоторних областях може відігравати роль в інших молекулярно-генетичних процесах, наприклад, в регуляції деяких некодуючих РНК, що беруть участь у канцерогенезі передміхурової залози [141].

Ген *KRT18* кодує проміжний філамент типу I кератин 18, що є важливим для підтримки стабільності цитоскелета епітеліальних клітин [142]. Вже повідомлялося про зміну експресії *KRT18* у низці захворювань, включаючи кілька видів раку. Кератин 18 може грати різну роль при онкогенезі: деякі дослідження відносять його до онкогенів, підвищення експресії якого пов'язано з поганим прогнозом кількох злоякісних новоутворень, але з іншого боку, будучи нормальним маркером епітеліальних клітин, він може підлягати вимкненню коли клітини зазнали епітелій-мезенхімного переходу [143]. Серед опублікованих досліджень присутні як такі, що описують відсутність залежності експресії *KRT18* і оцінки за системою Глісона у пацієнтів з РПЗ, так і такі, що виявили підвищену експресію *KRT18* як у пухлинах G3, так і у G4 у порівнянні з більш диференційованими клітинами РПЗ [144]. Отже, ми можемо припустити, що наші результати підтверджують попередні дані і вказують на участь метилування в регуляції експресії гена *KRT18*.

Позаклітинна ДНК хворих на рак є добре описаним джерелом онкомаркерів. Метилування промоторів генів добре виявляється в сечі, оскільки коротких фрагментів ДНК, придатних для аналізу в рідких біопсіях, достатньо для дослідження метильованих CpGs в промоторних ділянках генів. Тим не менше, аналізуючи нуклеїнові кислоти, отримані з сечею, слід враховувати, що вони можуть бути різного походження -

кожна клітина, яка зазнає апоптозу або некрозу, може вивільняти свою ДНК та РНК в біологічні рідини [145].

Більшість генів, проаналізованих у дослідженні, присвяченому як раку передміхурової залози, так і раку сечового міхура, були описані як такі, що підлягають епігенетичному вимкненню за рахунок метилювання їх промоторів при різних типах раку. Серед них *RASSF1A* є одним з найкраще вивчених генів, і його метилювання було описано як загальна подія в канцерогенезі, зокрема передміхурової залози, пов'язане як з ризиком раку (в сечі), так і з поганим прогнозом (у пухлинній тканині) [146]. Онкогенні ефекти втрати *RASSF1A* пов'язані з критичним порушенням сигнальних шляхів [76], що, таким чином, робить його вимкнення потенційним маркером для широкого спектру пухлин. Наші результати підтверджують попередні висновки, але, крім того, вони вказують на те, що метилювання *RASSF1A* часто може відбуватися у пацієнтів із запаленням. Тому додаткові маркери необхідні для диференціації між цими двома станами, але, можливо, пацієнтів з метилюванням *RASSF1A* можна запропонувати як групу з високим ризиком розвитку раку.

Метилювання промоторів *PTEN* та *NKX3.1* у сечі продемонструвало різну частоту у досліджуваних групах. Воно виявлялось надзвичайно рідко у контрольної групи здорових донорів, але спостерігалось у більшості людей із запаленнями та хворих на рак. Ще одна загальна риса цих для цих двох генів полягає в тому, що метилювання не є основним механізмом зниження їх регуляції в РПЗ. Відомо, що рак супроводжується запальними процесами, тому ми звернули свою увагу на можливу роль гіперметилювання *PTEN* та *NKX3.1* при запаленні. У роботі Лі зі співавторами на моделі ад'ювантно-індукованого артриту було продемонстровано, що зниження експресії *PTEN* у клітинах суттєво підвищувало експресію прозапальних цитокінів, особливо TNF-альфа та

П-6. У той же час підвищена експресія *PTEN* мала зворотний ефект. Більше того, автори продемонстрували, що метилювання *PTEN* є регуляторним механізмом експресії *PTEN* у цих випадках [147]. У той же час інші автори показали наявність метилювання промотора *PTEN* у лейкоцитах периферичної крові хворих на рак грудної залози та запропонували його як маркер ризику розвитку раку грудної залози [148]. Для гену *NKX3.1* також повідомлялося про зв'язок втрати його експресії і запалення [149,150]. Отже, ми можемо припустити, що метилювання промоторів цих генів, виявлене нами в нашому дослідженні, може відбуватись внаслідок запального процесу і навіть може походити з лейкоцитів, зокрема через те, що під час запалення їх кількість у сечі збільшується і вони також можуть підлягати апоптозу та некрозу і вивільняти свої нуклеїнові кислоти у зовнішнє середовище. Втрата експресії *PTEN* та *NKX3.1* при запаленні може служити зв'язком між запаленням та неоплазією. Тим не менше, це питання слід вивчати більш детально для правильного пояснення цих явищ.

Висока частота метилювання *MYO3A* при запаленні, а також те, що його метилювання значно рідше зустрічається на пізніх стадіях, ніж на ранніх, може вказувати на показники, пов'язані з імунною відповіддю. Проте, більш вірогідною, ґрунтуючись на попередніх дослідженнях інших видів раку, є його потенційна подвійна роль у канцерогенезі і функціонування як онкогена на пізніх стадіях [64].

Рак передміхурової залози є надзвичайно гетерогенним захворюванням на рівні самого органу, кожного окремого пацієнта та загальної популяції [151]. Незважаючи на значний обсяг досліджень раку передміхурової залози на сьогоднішній день, дані про експресію генів кінази родини *Aurora* в клітинних лініях та клінічних зразках раку передміхурової залози поки ще неповні та суперечливі.

Відсутність відмінностей між пухлиною та нормальними прилеглими тканинами у хворих на рак передміхурової залози можна пояснити патологічними процесами в нормальних навколишніх тканинах у разі аберантних сигналів клітин пухлини та мікросередовища. Однак ці тканини тісно пов'язані з пухлиною, і їх не можна вважати абсолютно нормальними. На основі наших результатів можна зробити висновок про наявність патологічних змін у цих зразках, а не про відсутність відмінностей між злоякісними та незлоякісними тканинами [152, 153].

Значно вищий рівень мРНК *AURKA* в тканинах аденоми передміхурової залози, патологічного стану, який часто спряжений із запальним процесом, може бути пояснений властивістю кінази Aurora A брати активну участь у запаленні, яка була виявлена у попередніх дослідженнях. Так, онкогенність даної кінази, зокрема, пов'язують з її здатністю активувати NF κ B, опосередковано через κ B α [154]. Отже, високий рівень транскриптів *AURKA* в аденомах може бути частиною інтенсивного процесу запалення.

Під час прогресії пухлини ракові клітини набувають великої фенотипової різноманітності з різними геномними та епігенетичними змінами, що призводить до їх неконтрольованої проліферації, виживання і невпинної селекції більш агресивних клонів. Ми припускаємо, що такі клітини мають додаткові стимули до проліферації, і, отже, втрачають потребу і залежність від ферментів, що регулюють клітинний цикл і поділ у нормі. Тим не менше, слід враховувати, що ми спостерігаємо ці результати лише на рівні мРНК, не визначаючи при цьому рівні білкових продуктів у досліджуваних зразках. Стабільність кіназ Aurora A і Aurora B акуратно регулюється за допомогою убіквітинування та наступної протеасомної деградації [155]. Клітини, що підлягають злоякісній трансформації, часто характеризуються порушенням цього процесу, що призводить до неадекватної деградації ключових онкогенів [156]. Таким

чином, зниження рівня мРНК не завжди означає низький рівень активних білків, що буде предметом подальших досліджень.

Ген *OCLN*, експресія якого є характерною для нормальних епітеліальних клітин, кодує окклюдин - білок, що бере участь у порушенні щільних зв'язків та реорганізації актину [157]. Кіназа *Auogo A* також діє подібним чином, беручи участь у структурних змінах в актиновому цитоскелеті та утворенні ламелоподій [158]. Кореляція між експресією генів *OCLN* та *AURKA* може відбуватися через участь їх продуктів в одних і тих же клітинних процесах, наприклад посилення рухливості та міграції клітин. Причиною, що стоїть за такою кореляцією, може бути, наприклад, спільна регуляція або взаєморегуляція цих генів, проте ці механізми є нез'ясованими і потребують подальшого дослідження. Однак підвищений рівень транскриптів цих генів та/або їх білкових продуктів може потенційно слугувати маркером метастатичного та інвазивного фенотипу такої пухлини.

У наших результатах експресія генів кіназ *Auogo A* і *Auogo B* позитивно корелювала як з експресією *MKI67*, так і з *NKX3.1*. Оскільки *MKI67* кодує маркер проліферації *KI67* і експресується разом з іншими маркерами проліферації (що включає гени кіназ Аврори) [159], ми вважаємо, що наші результати підтверджують попередні дані. З іншого боку, *NKX3.1* - це добре відомий ген супресорів пухлини, який кодує білок *NK3 homeobox 1* (*NKX3.1*). Експресія *NKX3.1* є загальною для нормальних епітеліальних клітин. Це один з цільових генів *AR* і часто втрачається при РПЗ. Більше того, було показано, що білки *NKX3.1* та *AR* безпосередньо регулюють один одного [160]. Деякі суперечливі моменти отриманих результатів можна пояснити підвищеною регуляцією експресії *AR* за участі кінази *Auogo A*. Підвищена кількість андрогенних рецепторів може сприяти підвищеній експресії гена *NKX3.1*. Це може бути звичайна клітинна реакція на інтенсивну проліферацію, оскільки *NKX3.1*

використовується як "воротар" для блокування клітинної проліферації [36]. У клітинах, де *NKX3.1* не підлягає делеції або епігенетичному сайленсингу, експресія цього гена може бути пропорційно збільшена у відповідь на аномальну проліферацію [161].

Раніше Hollander зі співавторами [162] повідомляли про взаємне регулювання експресії генів *AURKA* та *AURKB* за участі с-Мус. Як можна легко побачити, наші результати, що демонструють позитивну кореляцію між рівнями *AURKA* та *AURKB* в тканинах передміхурової залози, підтверджують попередні спостереження і можуть бути відповідно пояснені взаємною регуляцією експресії цих генів.

Зниження експресії *AURKB* зі зростанням стадії пухлини може бути не наслідком або ознакою високоякісної пухлини, а однією з причин її прогресування. Перекривання функцій кіназ Aurora C та Aurora B може пояснити присутність позитивної кореляції експресії *AURKC* на фоні негативної кореляції експресії *AURKB* зі стадією пухлини. На жаль, методи, використані в цій роботі, не дають доступу до однозначного висновку щодо механізму закладеного в основу виявленого явища.

Сильну позитивну кореляцію між експресією генів *AURKB* та *VDR* (рецептора вітаміну D) ми пояснили як приклад двох незалежних співіснуючих процесів у розвитку раку передміхурової залози. Обидва вони пов'язані зі стадією пухлини. Раніше повідомлялося, що високий рівень білкового продукту гена *VDR* був пов'язаний з нижчою стадією пухлини та більш сприятливим прогнозом для хворих на рак передміхурової залози [163]. На наш погляд, це можуть бути дві опосередковано пов'язані події в РПЗ.

Нарешті, ми продемонстрували позитивну кореляцію експресії *AURKC* зі стадією пухлини та з експресією *CYP17A1*. *CYP17A1* кодує білок, що належить до надродини ферментів цитохрому P450, ферменту стероїдної гідроксилази, необхідного для виробництва стероїдних

гормонів. У нормальних фізіологічних умовах експресія цього ферменту спостерігається лише в декількох тканинах, а саме в печінці, яєчках і матці. Підвищений рівень мРНК *CYP17A1* та білкового продукту виявлено при раку передміхурової залози [164]. Будучи стероїдогенним ферментом, *CYP17A1* тісно пов'язаний з розвитком андрогенрезистентного раку передміхурової залози [165]. У той же час, відносна експресія *AURKC* негативно корелювала з експресією гена *INSRA*, що також пов'язано з розвитком CRPC. Він кодує онкогенну ізоформу рецептора інсуліну та активує клітинні шляхи у відповідь на зв'язування з інсуліноподібним фактором росту (IGF) або інсуліном. Зв'язування з обома цими лігандами сприяє росту клітин, проліферації та уникненню апоптозу [166]. Деякі дослідження свідчать про те, що сигналінг *INSRA* є одним із можливих механізмів утворення андроген-незалежного РПЗ [167]. З іншого боку, експресія стероїдогенного ферменту, такого як *CYP17A1*, також розглядається як ознака андроген-резистентної пухлини передміхурової залози [165].

Десятиліття тому було показано, що мейотичні гени, що активуються в соматичних клітинах, що мітотично діляться, є потужними рушіями канцерогенезу. Такі відхилення сприяють нелегітимності сегрегації хромосом та обміну генетичним матеріалом, анеуплоїдії та іншим порушенням клітинного поділу, що може спричинити різні популяції клітин пухлини. *Aurora C* і *CYP17A1* - це два білки, які активні в статевих клітинах, і вони є передбачуваними онкогенами. Коекспресія їх у РПЗ підтримує онкогенну модель канцерогенезу «від соми до зародкової лінії». Ця модель виникла як альтернатива ембріологічній теорії раку і пояснює кілька аспектів, які неможливо пояснити за допомогою моделі подібності пухлинних клітин до стовбурових, наприклад, аномальний мітоз, швидку геномну та епігенетичну еволюцію, змінений процес репарації ДНК, захист хромосомного кінця тощо [168].

Результати дослідження довгої некодуєчої РНК PANDAR у даній роботі ставлять багато питань для подальшого пошуку. Передусім, провівши біоінформатичний аналіз, ми виявили низку мікроРНК і регульованих ними генів, асоційованих з раком сечового міхура та раком передміхурової залози, експресія яких може опосередковано залежати від експресії довгої некодуєчої РНК PANDAR. Всі ці дані потребують подальших експериментальних досліджень. Охарактеризовані сьогодні механізми її дії пов'язані, переважно, зі взаємодією з білками [169]. Таким чином, подальші дослідження у напрямку мікроРНК-мішеней для днРНК PANDAR можуть пролити світло на її значення для канцерогенезу різних органів.

Сьогодні науковці всього світу ведуть активне дослідження вмісту екзосом рідинних біопсій, вбачаючи у цьому перспективи для різних аспектів діагностики, зокрема, злоякісних пухлин [170,171]. Досліджуючи кондиційоване середовище клітинних ліній, ми отримали різні результати для кожної з них, що опосередковано може свідчити про наявність PANDAR у певних позаклітинних везикулах, що активно продукуються пухлинними клітинами. Враховуючи здатність PANDAR до взаємодії з низкою білків, що може призводити до ініціації канцерогенного процесу [112,114], секреція його у екзосомах і потрапляння у сусідні клітини могла б мати на них канцерогенний вплив. Таким чином, ми вважаємо, це є важливим напрямком подальшого дослідження, адже в такому випадку саме рівень днРНК PANDAR у екзосомах сечі міг би стати більш інформативним маркером.

Для передміхурової залози ми не виявили різниці у рівнях PANDAR у сечі пацієнтів і здорових донорів. Тим не менш, наявність великого розкиду його рівнів у групі раку передміхурової залози наводить на думку про потребу подальших досліджень. Зокрема, слід проаналізувати показники п'яти- і десятирічної виживаності пацієнтів та/або виникнення

у них рецидивів. Нами вже була розпочата робота у цьому напрямку. Так, для двох пацієнтів з РПЗ з високими рівнями PANDAR лікування не дало бажаного результату, в одному випадку були виявлені метастази, в іншому гормональний рецидив, у той час як в пацієнта з рівнем PANDAR близьким до групи здорових донорів, лікування пройшло успішно (дані особистої комунікації з лікарями).

В результаті даної роботи були запропоновані перспективні маркерні панелі для діагностики раку передміхурової залози та сечового міхура. Проте можливість їх застосування у клінічній практиці має бути оцінена подальшими дослідженнями. Поєднавши різні типи маркерів із різного матеріалу з сечі хворих на два види уrogenітальних пухлин ми показали можливість одночасної детекції маркерів різного типу підвищити чутливість методу а також надати більше інформації про характеристики кожної окремої пухлини.

ВИСНОВКИ

Зміни у метилюванні генів-онкосупресорів, що досліджувались у даній роботі, можуть скласти потенційні маркерні панелі для діагностики раку передміхурової залози та сечового міхура; підвищення експресії *AURKA* в клітинах сечі може виступати прогностичним маркером для РПЗ, тоді як роль експресії інших кіназ, а також відносних рівнів днРНК PANDAR для діагностики РПЗ потребує подальшого дослідження. Поєднання визначення рівнів днРНК PANDAR та маркерів на основі метилювання ДНК для РСМ може бути ефективним для диференціації пацієнтів з раком сечового міхура від індивідів без онкозахворювань.

1. Було створено колекцію тканин і сечі пацієнтів, хворих на рак сечового міхура і рак передміхурової залози; на основі проведеного біоінформаційного пошуку та попереднього аналізу експресії низки пухлиноасоційованих генів у тканинах карциноми передміхурової залози було відібрано наступні потенційні експресійні та епігенетичні маркери пухлин сечостатевої системи: гени кіназ родини Аврора і кінази BRAF, а також гени *VIM*, *GDF15*, *KRT18*, *RASSF1A*, *NKX3.1*, *CDH1* і *PTEN* як такі, що можуть регулюватись шляхом метилювання їх промоторів при РПЗ; гени *VIM*, *TMEFF2*, *GDF15*, *RASSF1A*, *NKX3.1* і *MYO3A* як такі, що можуть бути гіперметилюваними при раку сечового міхура; довга некодуюча РНК PANDAR як потенційний маркер для пухлин епітелійного походження.

2. Рівень метилювання *RASSF1A* у TMPRSS2:ERG позитивних пухлинах є достовірно вищим ($p < 0,001$), ніж у пухлинах без гібридного транскрипту.

3. Набір метильованих *PTEN*, *CDH1*, *NKX3.1*, *RASSF1A* та *GDF15* на основі отриманих розрахунків може бути придатним для дискримінації хворих на РПЗ від осіб без раку (AUC=0,8175).

4. Метилювання генів *VIM*, *TMEFF2*, *GDF15*, *RASSF1A* і *NKX3.1* є більш характерним і здатне відрізнити хворих на рак сечового міхура від осіб без раку, незалежно від наявності чи відсутності у них симптоматики з боку сечостатевої системи (AUC=0,8333).

5. Вищий рівень експресії *AURKC* у андрогенрезистентній клітинній лінії PC3 ніж у інших клітинних лініях і позитивна кореляція експресії гена *AURKC* з експресією гена стероїдогенного ферменту *CYP17A1* у тканинах аденокарцином ($r^s = 0.370$, $p < 0.05$) може свідчити про можливий зв'язок кінази AuogoC з формуванням андроген-резистентного РПЗ.

6. Вища експресія гена кінази Auogo A у циркулюючих клітинах з сечі пацієнтів з РПЗ, ніж у групі осіб без онкозахворювань ($p = 0,014$) і кореляція VE цього гена з балом за шкалою Глісона дає можливість розглядати показники експресії *AURKA* у клітинах з сечі як потенційний прогностичний маркер для РПЗ.

7. Сильна позитивна кореляція ($r_s = 0,844$, $p < 0.01$) рівнів відносної експресії *AURKC* і *BRAF* у клітинах з сечі хворих на РПЗ за відсутності такої кореляції у контрольній групі може вказувати на зміну регуляції сигнальних шляхів з залученням білкових продуктів цих генів при РПЗ.

8. У пацієнтів з раком сечового міхура відносні рівні днРНК PANDAR статистично достовірно вищі, ніж у контрольної групи і на основі даних ROC аналізу можуть відрізнити хворих на рак сечового міхура від здорових осіб (AUC=0,7803, $p = 0,0053$).

9. Позитивна кореляція між рівнями днРНК PANDAR та експресією у клітинах із цих зразків генів кіназ *AURKC* і *BRAF* можуть свідчити про наявність між цими явищами прямих чи опосередкованих зв'язків, що потребують подальшого дослідження.

10. Додавання визначення рівнів днРНК PANDAR до панелі маркерів на основі метилювання генів *VIM*, *TMEFF2*, *GDF15*, *RASSF1A* і

МКХЗ.1 потенційно здатне підвищити чутливість методу неінвазивної діагностики раку сечового міхура (AUC=0,909, p=0,0007).

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: Cancer J Clin.* 2018; 68(6): 394-424.
2. Ferlay J, Lam F, Colombet M, Mery L, Pineros M, Znaor A, Soerjomataram I. et al. Global cancer observatory: cancer today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Available from: <https://gco.iarc.fr/today>
3. Kandimalla R, van Tilborg AA, Zwarthoff EC. DNA methylation-based biomarkers in bladder cancer. *Nat. Rev. Urol.* 2013; 89: 1-9.
4. Carmena M, Earnshaw WC. The cellular geography of Aurora kinases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2003; 4(11): 842–854.
5. Tang A, Gao K, Chu L, Zhang R, Yang J, Zheng J. Aurora kinases: novel therapy targets in cancers. *Oncotarget.* 2017; 8: 23937-23954.
6. Kulis M, Esteller M. DNA methylation and cancer. *Adv Genet.* 2010; 70: 27-56.
7. Loeb S, Partin AW. PCA3 Urinary Biomarker for Prostate Cancer. *Rev Urol.* 2010; 12(4): 205-206.
8. Taheri M, Omrani MD, Ghafouri-Fard S. Long non-coding RNA expression in bladder cancer. *Biophysical reviews.* 2018; 10(4): 1205–1213.
9. Han L, Wang B, Wang R, Wang Z, Gong S, Chen G, Telemacque D, Feng Y, Xu W. Prognostic and Clinicopathological Significance of Long Non-coding RNA PANDAR Expression in Cancer Patients: A Meta-Analysis. *Frontiers in Oncology.* 2019; 9: 1337.
10. De Rubis G, Rajeev Krishnan S, Bebawy M. Liquid Biopsies in Cancer Diagnosis, Monitoring, and Prognosis. *Trends Pharmacol Sci.* 2019; 40(3): 172-186.

11. Smania MA. Liquid biopsy for cancer screening, diagnosis, and treatment. *J Am Assoc Nurse Pract.* 2020; 32(1): 5-7.
12. Bracarda S, de Cobelli O, Greco C, Prayer-Galetti T, Valdagni R, Gatta G, de Braud F, Bartsch G. Cancer of the prostate. *Critical Reviews in Oncology/Hematology.* 2005; 56(3): 379–396.
13. Paiva RM, Zauli DAG, Neto BS, Brum IS. Urinary microRNAs expression in prostate cancer diagnosis: a systematic review. *Clinical and Translational Oncology.* 2020; 22(11): 2061-2073.
14. Fitzpatrick J, Banu E, Oudard S. Prostate-specific antigen kinetics in localized and advanced prostate cancer. *BJU International.* 2009; 103(5): 578-587.
15. Carter HB, Ferrucci L, Kettermann A, Landis P, Wright EJ, Epstein JI, Trock BJ, Metter EJ. Detection of life-threatening prostate cancer with prostate-specific antigen velocity during a window of curability. *J Natl Cancer Inst.* 2006; 98: 1521-1527.
16. Dumache R, Puiu M, Miclea D, Bumbacila B, Miclea F. Applicability of noninvasive biomarkers in prostate cancer diagnosis. *Maedica.* 2010; 5(1): 41-44.
17. Gleason DF. Histological grading and staging of prostatic carcinoma. In *Urologic Pathology: The Prostate*; Tannenbaum, M., Ed.; Lea and Feibiger: Philadelphia, PA, USA, 1977; p. 171.
18. Epstein JI. Prostate cancer grading: A decade after the 2005 modified system. *Modern Pathol.* 2018; 31: 547–563.
19. Packer JR, Maitland NJ. The molecular and cellular origin of human prostate cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research.* 2016; 1863(6): 1238-1260.

20. Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, et al. Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science*. 2005; 310: 644–648.
21. Clark J, Attard G, Jhavar S, et al. Complex patterns of ETS gene alteration arise during cancer development in the human prostate. *Oncogene*. 2008; 27: 1993-2003.
22. Lindberg J, Klevebring D, Liu W, Neiman M, Xu J, Wiklund P, Wiklund F, Mills IG, Egevad L, Grönberg H. Exome Sequencing of Prostate Cancer Supports the Hypothesis of Independent Tumour Origins. *European Urology*. 2013; 63(2): 347-353.
23. Abeshouse A, Ahn J, Akbani R, Ally A, Amin S, Andry CD, Annala M, Aprikian A, Armenia J, Arora A, Auman JT, Balasundaram M, Balu S, et al. Cancer Genome Atlas Research Network The Molecular Taxonomy of Primary Prostate Cancer. *Cell*. 2015; 163: 1011-1025
24. Williams J, Greer P, Squire J. Recurrent copy number alterations in prostate cancer: an in silico meta-analysis of publicly available genomic data, *Cancer Genetics*. 2014; 207(10–12): 474-488.
25. Jaratlerdsiri W, Chan EKF, Petersen DC, et al. Next generation mapping reveals novel large genomic rearrangements in prostate cancer. *Oncotarget*. 2017; 8(14): 23588-23602.
26. Zhu CZ, Ting HN, Ng KH, Ong TA. A review on the accuracy of bladder cancer detection methods. *J Cancer*. 2019; 10(17): 4038-4044.
27. Knowles MA, Hurst CD. Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity. *Nature Reviews*. 2015; 15: 25-41.
28. Besaratinia A, Cockburn M, Tommasi S. Alterations of DNA methylome in human bladder cancer. *Epigenetics*. 2013; 8(10): 1013-1022.

29. Kim WT, Jeong P, Yan C, et al. UBE2C cell-free RNA in urine can discriminate between bladder cancer and hematuria. *Oncotarget*. 2016; 7(36): 58193-58202.
30. Stav K, Leibovici D, Goren E, Livshitz A, Siegel YI, Lindner A, Zisman A. Adverse effects of cystoscopy and its impact on patients' quality of life and sexual performance. *Isr Med Assoc J*. 2004; 6(8): 474-478.
31. Zhang X, Zhang Y. Bladder Cancer and Genetic Mutations. *Cell Biochem Biophys*. 2015; 73(1): 65-9.
32. Yoshiaki Y, Hideyasu M, Tomoko F, Atsunori O, Saturo Y, Masaru O, Higeto K, Kohsuke S, Katsusuke N. Centrosome hyperamplification predicts progression and tumor recurrence in bladder cancer. *Clin Cancer Res*. 2004; 10(19): 6449-55.
33. Yamamoto Y, Matsuyama H, Kawauchi S, Furuya T, Liu XP, Ikemoto K, et al. Biological characteristics in bladder cancer depend on the type of genetic instability. *Clin Cancer Res*. 2006; 12(19): 2752-2758.
34. Siravegna G, Marsoni S, Siena S, Bardelli A. Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017; 14(9): 531-548.
35. Lachmann G, Reinhart K. The History of Biomarkers: How Far Have We Come? *Crit Care Clin*. 2020; 36(1): 1-10.
36. Palmirotta R, Lovero D, Cafforio P, Felici C, Mannavola F, Pellè E, Quaresmini D, Tucci M, Silvestris F. Liquid biopsy of cancer: a multimodal diagnostic tool in clinical oncology. *Ther Adv Med Oncol*. 2018; 10.
37. Qiu J, Xu J, Zhang K, Gu W, Nie L, Wang G, Luo Y. Refining Cancer Management Using Integrated Liquid Biopsy. *Theranostics*. 2020; 10(5): 2374-2384.
38. Chen D, Xu T, Wang S. et al. Liquid Biopsy Applications in the Clinic. *Mol Diagn Ther*. 2020; 24: 125-132.

39. Keup C, Suryaprakash V, Storbeck M, Hoffmann O, Kimmig R, Kasimir-Bauer S. Longitudinal Multi-Parametric Liquid Biopsy Approach Identifies Unique Features of Circulating Tumor Cell, Extracellular Vesicle, and Cell-Free DNA Characterization for Disease Monitoring in Metastatic Breast Cancer Patients. *Cells*. 2021; 10(2): 212.

40. Chang K, Kong YY, Dai B, Ye DW, Qu YY, Wang Y, Jia ZW, Li GX. Combination of circulating tumor cell enumeration and tumor marker detection in predicting prognosis and treatment effect in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Oncotarget*. 2015; 6(39): 41825- 41836.

41. Lindsay CR, Le Moulec S, Billiot F, Loriot Y, Ngo-Camus M, Vielh P, Fizazi K, Massard C, Farace F. Vimentin and Ki67 expression in circulating tumour cells derived from castrate-resistant prostate cancer. *BMC Cancer*. 2016; 16: 168

42. Campos-Fernández E, Barcelos LS, de Souza AG, Goulart LR, Alonso-Goulart V. Research landscape of liquid biopsies in prostate cancer. *Am J Cancer Res*. 2019; 9(7): 1309-1328.

43. Tombal B, Andriole GL, de la Taille A, Gontero P, Haese A, Remzi M, Speakman M, Smets L, Stoevelaar H. Clinical judgment versus biomarker prostate cancer gene 3: which is best when determining the need for repeat prostate biopsy? *Urology*. 2013; 81(5): 998-1004.

44. Endzeliņš E, Berger A, Melne V, Bajo-Santos C, Soboļevska K, Ābols A, Rodriguez M, Šantare D, Rudņickiha A, Lietuvietis V, Llorente A, Linē A. Detection of circulating miRNAs: comparative analysis of extracellular vesicle-incorporated miRNAs and cell-free miRNAs in whole plasma of prostate cancer patients. *BMC Cancer*. 2017; 17: 730.

45. Fujita K, Nonomura N. Urinary biomarkers of prostate cancer. *Int J Urol*. 2018; 25(9): 770-779.

46. Ellinger J, Haan K, Heukamp LC, Kahl P, Buttner R, Muller SC, von Ruecker A, Bastian PJ. CpG island hypermethylation in cell-free serum

DNA identifies patients with localized prostate cancer. *Prostate*. 2008; 68(1): 42-49.

47. Constâncio V, Nunes SP, Henrique R, Jerónimo C. DNA Methylation-Based Testing in Liquid Biopsies as Detection and Prognostic Biomarkers for the Four Major Cancer Types. *Cells*. 2020; 9(3): 624.

48. Stoeckel F, Salomo K, Sebastian S, Thiede C, Menschikowski M, Heberling U, Wirth M, Fuessel S. Comparative Determinants of TERT mutations in urinary sediment DNA by NGS and ddPCR for bladder cancer detection. *The Journal of Urology*. 2019; 201.

49. Christensen E, Birkenkamp-Demtröder K, Nordentoft I, Høyer S, van der Keur K, van Kessel K, Zwarthoff E, Agerbæk M, Ørntoft TF, Jensen JB, Dyrskjøt L. Liquid Biopsy Analysis of FGFR3 and PIK3CA Hotspot Mutations for Disease Surveillance in Bladder Cancer. *Eur Urol*. 2017; 71(6): 961-969.

50. Yazarlou F, Modarressi MH, Mowla SJ, Oskooei VK, Motevaseli E, Tooli LF, Nekooesh L, Eghbali M, Ghafouri-Fard S, Afsharpad M. Urinary exosomal expression of long non-coding RNAs as diagnostic marker in bladder cancer. *Cancer Manag Res*. 2018; 10: 6357-6365.

51. Seitz AK, Christensen LL, Christensen E, Faarkrog K, Ostfeld MS, Hedegaard J, Nordentoft I, Nielsen MM, Palmfeldt J, Thomson M, Jensen MT, Nawroth R, Maurer T, Ørntoft TF, Jensen JB, Damgaard CK, Dyrskjøt L. Profiling of long non-coding RNAs identifies LINC00958 and LINC01296 as candidate oncogenes in bladder cancer. *Sci Rep*. 2017 Mar 24; 7(1):395.

52. Satyal U, Srivastava A, Abbosh PH. Urine Biopsy-Liquid Gold for Molecular Detection and Surveillance of Bladder Cancer. *Frontiers in oncology*. 2019; 9: 1266.

53. Li E, Zhang Y. DNA methylation in mammals. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014 May 1;6(5):a019133.

54. Deaton AM, Bird A. CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev.* 2011; 25(10):1010-22.
55. Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN, Bird A. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature.* 1998;393(6683):386-9.
56. Della Ragione F, Filosa S, Scalabrì F, D'Esposito M. MeCP2 as a genome-wide modulator: the renewal of an old story. *Front Genet.* 2012;3:181.
57. Jeltsch A, Jurkowska RZ. New concepts in DNA methylation. *Trends Biochem Sci.* 2014 Jul; 39(7):310-8.
58. Hideyuki T, Young-Joon K, Toshikazu U. TET repression and increased DNMT activity synergistically induce aberrant DNA methylation. *J Clin Invest.* 2020;130(10):5370-79.
59. Cole CB, Russler-Germain DA, Ketkar S, Verdoni, AM, Smith AM, Bangert CV, Helton NM, Guo M, Klco JM, O'Laughlin S, Fronick C, Fulton R, Chang GS, Petti AA, Miller CA, Ley TJ. Haploinsufficiency for DNA methyltransferase 3A predisposes hematopoietic cells to myeloid malignancies. *The Journal of clinical investigation.* 2017; 127(10): 3657–74.
60. Friso S, Girelli D, Trabetti E, et al. The MTHFR 1298A>C polymorphism and genomic DNA methylation in human lymphocytes. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005;14(4):938-943.
61. Hansen KD, Timp W, Bravo HC, et al. Increased methylation variation in epigenetic domains across cancer types. *Nat Genet.* 2011;43(8):768-775.
62. Teschendorff AE, Liu X, Caren H, et al. The dynamics of DNA methylation covariation patterns in carcinogenesis. *PLoS Comput Biol.* 2014;10(7):e1003709.
63. Grati M, Yan D, Raval MH, et al. MYO3A Causes Human Dominant Deafness and Interacts with Protocadherin 15-CD2 Isoform. *Hum Mutat.* 2016;37(5):481-487

64. Baghel KS, Tewari BN, Shrivastava R, et al. Macrophages promote matrix protrusive and invasive function of breast cancer cells via MIP-1 β dependent upregulation of MYO3A gene in breast cancer cells. *Oncoimmunology*. 2016;5(7):e1196299.
65. Nordlund J, Milani L, Lundmark A, Lönnerholm G, Syvänen AC. DNA methylation analysis of bone marrow cells at diagnosis of acute lymphoblastic leukemia and at remission. *PLoS One*. 2012;7(4):e34513.
66. Chung W, Bondaruk J, Jelinek J, et al. Detection of bladder cancer using novel DNA methylation biomarkers in urine sediments. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2011;20(7):1483-91.
67. Reinert T. Methylation Markers for Urine-Based Detection of Bladder Cancer: The Next Generation of Urinary Markers for Diagnosis and Surveillance of Bladder Cancer. *Advances in Urology*. 2012; e503271.
68. Horie M, Mitsumoto Y, Kyushiki H, et al. Identification and characterization of TMEFF2, a novel survival factor for hippocampal and mesencephalic neurons. *Genomics*. 2000;67(2):146-152.
69. Masood M, Grimm S, El-Bahrawy M, Yagüe E. TMEFF2: A Transmembrane Proteoglycan with Multifaceted Actions in Cancer and Disease. *Cancers (Basel)*. 2020;12(12):3862.
70. Young J, Biden KG, Simms LA, Huggard P, Karamatic R, Eyre HJ, Sutherland GR, Herath N, Barker M, Anderson GJ, Fitzpatrick DR, Ramm GA, Jass JR, Leggett BA. HPP1: a transmembrane protein-encoding gene commonly methylated in colorectal polyps and cancers. *Proc. Nat. Acad. Sci*. 2001;98: 265-270.
71. Gery S, Sawyers CL, Agus DB, Said JW, Koeffler HP. TMEFF2 is an androgen-regulated gene exhibiting antiproliferative effects in prostate cancer cells. *Oncogene*. 2002;21(31):4739-4746.

72. Li S, Ma YM, Zheng PS, Zhang P. GDF15 promotes the proliferation of cervical cancer cells by phosphorylating AKT1 and Erk1/2 through the receptor ErbB2. *J Exp Clin Cancer Res.* 2018;37(1):80.

73. Lu X, He X, Su J, et al. EZH2-Mediated Epigenetic Suppression of GDF15 Predicts a Poor Prognosis and Regulates Cell Proliferation in Non-Small-Cell Lung Cancer. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2018;12:309–318.

74. Larsen LK, Lind GE, Guldborg P, Dahl C. DNA-Methylation-Based Detection of Urological Cancer in Urine: Overview of Biomarkers and Considerations on Biomarker Design, Source of DNA, and Detection Technologies. *Int J Mol Sci.* 2019;20(11):2657.

75. Ram RR, Mendiratta S, Bodemann BO, Torres MJ, Eskiocak U, White MA. RASSF1A inactivation unleashes a tumor suppressor/oncogene cascade with context-dependent consequences on cell cycle progression. *Mol Cell Biol.* 2014;34(12):2350–2358.

76. van der Weyden L, Adams DJ. The Ras-association domain family (RASSF) members and their role in human tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta.* 2007 Sep;1776(1):58-85.

77. Richter AM, Pfeifer GP, Dammann RH. The RASSF proteins in cancer; from epigenetic silencing to functional characterization. *Biochim Biophys Acta.* 2009 Dec;1796(2):114-28.

78. Vatsalya V, Cave MC, Kong M, Gobejishvili L, Falkner KC, Craycroft J, Mitchell M, Szabo G, McCullough A, Dasarathy S, Radaeva S, Barton B, McClain CJ. Keratin 18 Is a Diagnostic and Prognostic Factor for Acute Alcoholic Hepatitis. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2020 Aug;18(9):2046-2054.

79. Cheng Y, Qin K, Huang N, et al. Cytokeratin 18 regulates the transcription and alternative splicing of apoptotic related genes and pathways in HeLa cells. *Oncol Rep.* 2019;42(1):301-312.

80. Di Cristofano A, Pandolfi PP. The multiple roles of PTEN in tumor suppression. *Cell*. 2000 Feb 18;100(4):387-90.
81. Zhou X, Yang X, Sun X, et al. Effect of PTEN loss on metabolic reprogramming in prostate cancer cells. *Oncol Lett*. 2019;17(3):2856-2866.
82. Gurel B, Ali TZ, Montgomery EA, et al. NKX3.1 as a marker of prostatic origin in metastatic tumors. *Am J Surg Pathol*. 2010;34(8):1097-1105.
83. Lei Q, Jiao J, Xin L, Chang CJ, Wang S, Gao J, Gleave ME, Witte ON, Liu X, Wu H. NKX3.1 stabilizes p53, inhibits AKT activation, and blocks prostate cancer initiation caused by PTEN loss. *Cancer Cell*. 2006 May;9(5):367-78.
84. Antao AM, Ramakrishna S, Kim KS. The Role of Nkx3.1 in Cancers and Stemness [published online ahead of print, 2021 Feb 28]. *Int J Stem Cells*. 2021.
85. Battaglia RA, Delic S, Herrmann H, Snider NT. Vimentin on the move: new developments in cell migration. *F1000Res*. 2018;7:F1000 Faculty Rev-1796.
86. Costa VL, Henrique R, Danielsen SA, et al. Three epigenetic biomarkers, GDF15, TMEFF2, and VIM, accurately predict bladder cancer from DNA-based analyses of urine samples. *Clin Cancer Res*. 2010;16(23):5842-5851.
87. Christofori G, Semb H. The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends Biochem Sci*. 1999 Feb;24(2):73-6.
88. Heuberger J, Birchmeier W. Interplay of cadherin-mediated cell adhesion and canonical Wnt signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010;2(2):a002915.
89. Jaratlerdsiri W, Chan EKF, Petersen DC, et al. Next generation mapping reveals novel large genomic rearrangements in prostate cancer. *Oncotarget*. 2017;8(14):23588-602.

90. Do T-V, Hirst J, Hyter S, Roby KF, Godwin AK. Aurora A kinase regulates non-homologous end-joining and poly(ADP-ribose) polymerase function in ovarian carcinoma cells. *Oncotarget*. 2017;8(31):50376-92.
91. Kalsbeek D, Golsteyn RM. G2/M-Phase Checkpoint Adaptation and Micronuclei Formation as Mechanisms That Contribute to Genomic Instability in Human Cells. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017;18(11):2344.
92. Tang A, Gao K, Chu L, Zhang R, Yang J, Zheng J. Aurora kinases: novel therapy targets in cancers. *Oncotarget*. 2017;8(14):23937-54.
93. Lindon C, Grant R, Min M. Ubiquitin-Mediated Degradation of Aurora Kinases. *Frontiers in Oncology*. 2016;5:307.
94. Fu J, Bian M, Jiang Q, Zhang C. Roles of Aurora kinases in mitosis and tumorigenesis. *Mol Cancer Res*. 2007;5(1):1-10.
95. Lehman NL, O'Donnell JP, Whiteley LJ, Stapp RT, Lehman TD, Roszka KM, Schultz LR, Williams CJ, Mikkelsen T, Brown SL., Ecsedy JA, Poisson LM. Aurora A is differentially expressed in gliomas, is associated with patient survival in glioblastoma and is a potential chemotherapeutic target in gliomas. *Cell Cycle*. 2012;11:3, 489-502.
96. Kamada K, Yamada Y, Hirao T, Fujimoto H, Takahama Y, Ueno M et al. Amplification/overexpression of Aurora-A in human gastric carcinoma: potential role in differentiated type gastric carcinogenesis. *Oncol Rep*. 2004; 12: 593–9.
97. Sehdev V, Katsha A, Arras J, Peng D, Soutto M, Ecsedy J et al. HDM2 regulation by AURKA promotes cell survival in gastric cancer. *Clin Cancer Res* 2014; 20: 76–86.
98. Krenn V, Musacchio A. The Aurora B Kinase in Chromosome Bi-Orientation and Spindle Checkpoint Signaling. *Frontiers in Oncology*. 2015;5:225.

99. Shrestha RL, Conti D, Tamura N, et al. Aurora-B kinase pathway controls the lateral to end-on conversion of kinetochore-microtubule attachments in human cells. *Nature Communications*. 2017;8:150.
100. Chieffi P, Cozzolino L, Kisslinger A, Libertini S, Staibano S, Mansueto G, De Rosa G, Villacci A, Vitale M, Linardopoulos S, Portella G, Tramontano D. Aurora B expression directly correlates with prostate cancer malignancy and influence prostate cell proliferation. *The Prostate*. 2006;66:326-33.
101. Kimura M, Matsuda Y, Yoshioka T, Okano Y. Cell cycle-dependent expression and centrosome localization of a third human aurora/Ipl1-related protein kinase, AIK3. *J Biol Chem*. 1999;274: 7334–40.
102. Yan X, Cao L, Li Q, Wu Y, Zhang H, Saiyin H, Liu X, Zhang X, Shi Q, Yu L. Aurora C is directly associated with Survivin and required for cytokinesis. *Genes to Cells*. 2005;10: 617-26.
103. Quartuccio SM, Schindler K. Functions of Aurora kinase C in meiosis and cancer. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2015;3:50.
104. Hung T, Wang Y, Lin MF, Koegel AK, Kotake Y, Grant GD, Horlings HM, Shah N, Umbricht C, Wang P, et al. Extensive and coordinated transcription of noncoding RNAs within cell-cycle promoters. *Nature Genet*. 2011;43: 621–9.
105. Ma P, Guan Q, Xu D, Zhao J, Qin N, Jin B. LncRNA PANDAR as a prognostic marker in Chinese cancer. *Clinica Chimica Acta*. 2017; 8981 (17): 1-24.
106. Kotake Y, Kitagawa K, Ohhata T, Sakai S, Uchida C, Niida H, Naemura M, Kitagawa M. Long non-coding RNA, PANDA, contributes to the stabilization of p53 tumor suppressor protein. *Anticancer Res*. 2016; 36: 1605–1612.

107. Mehrad M, Majd H, Akhtari J, Haerian M-S, Ravanshad Y. Clinicopathological and prognostic value of lncRNA PANDAR expression in solid tumors: Evidence from a systematic review and meta-analysis. *J Cell Physiol.* 2019; 234: 4206– 4216.
108. Zou Y, Zhong Y, Wu J, et al. Long non-coding PANDAR as a novel biomarker in human cancer: A systematic review. *Cell Prolif.* 2018;51(1):e12422.
109. Li X, Wang F, Sun Y, Fan Q, Cui G. Expression of long non-coding RNA PANDAR and its prognostic value in colorectal cancer patients. *Int J Biol Markers.* 2017;32(2):e218-e223.
110. Peng W, Fan H. Long non-coding RNA PANDAR correlates with poor prognosis and promotes tumorigenesis in hepatocellular carcinoma. *Biomed Pharmacother.* 2015 May;72:113-8.
111. Zhan Y, Lin J, Liu Y, et al. Up-regulation of long non-coding RNA PANDAR is associated with poor prognosis and promotes tumorigenesis in bladder cancer. *J Exp Clin Cancer Res.* 2016;35(1):83.
112. Kotake Y, Kitagawa K, Ohhata T, et al. Long Non-coding RNA, PANDA, Contributes to the Stabilization of p53 Tumor Suppressor Protein. *Anticancer Res.* 2016;36(4):1605-1611.
113. Montes M, Lund AH. Emerging roles of lncRNAs in senescence. *FEBS J.* 2016 Jul;283(13):2414-26.
114. Liu J, Ben Q, Lu E, et al. Long noncoding RNA PANDAR blocks CDKN1A gene transcription by competitive interaction with p53 protein in gastric cancer. *Cell Death Dis.* 2018;9(2):168.
115. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc.* 2008;3(6):1101-1108.

116. Baldini E, Arlot-Bonnemains Y, Mottolese M, et al. Deregulation of Aurora kinase gene expression in human testicular germ cell tumours. *Andrologia*. 2010;42(4):260-267.

117. Cui Y, Li Q, Li H, et al. Asparaginyl endopeptidase improves the resistance of microtubule-targeting drugs in gastric cancer through IQGAP1 modulating the EGFR/JNK/ERK signaling pathway. *Onco Targets Ther*. 2017;10:627-643.

118. Li Z, Gao B, Hao S, et al. Knockdown of lncRNA-PANDAR suppresses the proliferation, cell cycle and promotes apoptosis in thyroid cancer cells. *EXCLI J*. 2017;16:354-362.

119. Cai J, Chen S, Zhang W, et al. Proteomic analysis of differentially expressed proteins in 5-fluorouracil-treated human breast cancer MCF-7 cells. *Clin Transl Oncol*. 2014;16(7):650-659

120. Li LC and Dahiya R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics*. 2002 Nov;18(11):1427-31.

121. Yegnasubramanian S, Kowalski J, Gonzalzo ML, Zahurak M, Piantadosi S, Walsh PC, Bova GS, De Marzo AM, Isaacs W B and Nelson WG. Hypermethylation of CpG Islands in Primary and Metastatic Human Prostate Cancer. *Cancer research*. 2004; 64(4):1975-86.

122. Shen MM, Abate-Shen C. Roles of the Nkx3.1 homeobox gene in prostate organogenesis and carcinogenesis. *Dev Dyn*. 2003;228(4):767-778.

123. Seim I, Jeffery PL, Thomas PB, Nelson CC, Chopin LK. Whole-Genome Sequence of the Metastatic PC3 and LNCaP Human Prostate Cancer Cell Lines. *G3 (Bethesda)*. 2017;7(6):1731-1741.

124. Yehia L, Ngeow J, Eng C. PTEN-opathies: from biological insights to evidence-based precision medicine. *J Clin Invest*. 2019;129(2):452-64.

125. Greene SB, Dago AE, Leitz LJ, Wang Y, Lee J, Werner SL, Gendreau S, Patel P, Jia S, Zhang L, Tucker EK, Malchiodi M, Graf RP, Dittamore R, Marrinucci D, Landers M. Chromosomal Instability Estimation

Based on Next Generation Sequencing and Single Cell Genome Wide Copy Number Variation Analysis. *PLoS One*. 2016 Nov 16;11(11):e0165089.

126. Aran D, Camarda R, Odegaard J, Paik H, Oskotsky B, Krings G, Goga A, Sirota M, Butte AJ. Comprehensive analysis of normal adjacent to tumor transcriptomes. *Nat Commun*. 2017 Oct 20;8(1):1077.

127. Gao Y, Widschwendter M, Teschendorff AE. DNA Methylation Patterns in Normal Tissue Correlate more Strongly with Breast Cancer Status than Copy-Number Variants. *EbioMedicine*. 2018; 31: 243-252.

128. Locke WJ, Guanzon D, Ma C, Liew YJ, Duesing KR, Fung KYC, Ross JP. DNA Methylation Cancer Biomarkers: Translation to the Clinic. *Front Genet*. 2019 Nov 14;10:1150.

129. Rubin MA, Maher CA, Arul M. Common Gene Rearrangements in Prostate Cancer. *Chinnaiyan Journal of Clinical Oncology*. 2011; 29:27: 3659-68.

130. Tomlins SA, Laxman B, Varambally S, et al. Role of the TMPRSS2-ERG gene fusion in prostate cancer. *Neoplasia*. 2008;10(2):177-188.

131. Ahearn TU, Pettersson A, Ebot EM, et al. A Prospective Investigation of PTEN Loss and ERG Expression in Lethal Prostate Cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2015;108(2):djv346.

132. 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. *Biopolymers and Cell* . 2017;33(5): 335-355.

133. Man C, Rosa J, Lee LT, Lee VH, Chow BK, Lo KW, Doxsey S, Wu ZG, Kwong YL, Jin DY, Cheung AL, Tsao SW. Latent membrane protein 1 suppresses RASSF1A expression, disrupts microtubule structures and induces chromosomal aberrations in human epithelial cells. *Oncogene*. 2007 May 10;26(21):3069-80.

134. Hollenhorst PC, Ferris MW, Hull MA, Chae H, Kim S, Graves BJ. Oncogenic ETS proteins mimic activated RAS/MAPK signaling in prostate cells. *Genes Dev.* 2011;25(20):2147-57.
135. El-Kalla M, Onyskiw C, Baksh, S. Functional importance of RASSF1A microtubule localization and polymorphisms. *Oncogene.* 2010; 29: 5729–40.
136. Lind GE, Skotheim RI, Fraga MF, Abeler VM, Henrique R, Saatcioglu F, Esteller M, Teixeira MR, Lothe RA. The loss of NKX3.1 expression in testicular--and prostate--cancers is not caused by promoter hypermethylation. *Mol Cancer.* 2005 Feb 3;4(1):8.
137. Asatiani E, Huang WX, Wang A, et al. Deletion, methylation, and expression of the NKX3.1 suppressor gene in primary human prostate cancer. *Cancer Res.* 2005;65(4):1164-1173
138. Cao Q, Yu J, Dhanasekaran SM, Kim JH, Mani RS, Tomlins SA, Mehra R, Laxman B, Cao X, Yu J, Klee CG, Varambally S, Chinnaiyan AM. Repression of E-cadherin by the polycomb group protein EZH2 in cancer. *Oncogene.* 2008 Dec 11;27(58):7274-84.
139. Xie Q, Wang ZA. Transcriptional regulation of the Nkx3.1 gene in prostate luminal stem cell specification and cancer initiation via its 3' genomic region. *J Biol Chem.* 2017;292(33):13521-13530.
140. Olson A, Le V, Aldahl J, Yu E-J, Hooker E, He Yo, Lee D-H, Kim W K, Cardiff RD. The comprehensive role of E-cadherin in maintaining prostatic epithelial integrity during oncogenic transformation and tumor progression. *PLoS Genet.* 2019 Oct 28;15(10):e1008451.
141. Gulyaeva LF, Kushlinskiy NE. Regulatory mechanisms of microRNA expression. *J Transl Med.* 2016;14(1):143.
142. Fortier AM, Asselin E, Cadrin M. Keratin 8 and 18 loss in epithelial cancer cells increases collective cell migration and cisplatin sensitivity through claudin1 up-regulation. *J Biol Chem.* 2013;288(16):11555-11571.

143. Jędroszka D, Orzechowska M, Hamouz R, Górniak K, Bednarek AK. Markers of epithelial-to-mesenchymal transition reflect tumor biology according to patient age and Gleason score in prostate cancer. *PLoS One*. 2017;12(12):e0188842.

144. Pascal LE, Vêncio RZ, Page LS, Liebeskind ES, Shadle CP, Troisch P, Marzolf B, True LD, Hood LE, Liu AY. Gene expression relationship between prostate cancer cells of Gleason 3, 4 and normal epithelial cells as revealed by cell type-specific transcriptomes. *BMC Cancer*. 2009 Dec 18;9:452.

145. Domínguez-Vigil IG, Moreno-Martínez AK, Wang JY, Roehrl MHA, Barrera-Saldaña HA. The dawn of the liquid biopsy in the fight against cancer. *Oncotarget*. 2017;9(2):2912-22.

146. Ge YZ, Xu LW, Jia RP, Xu Z, Feng YM, Wu R, Yu P, Zhao Y, Gui ZL, Tan SJ, Song Q. The association between RASSF1A promoter methylation and prostate cancer: evidence from 19 published studies. *Tumour Biol*. 2014 Apr;35(4):3881-90.

147. Li X-F, Chen X, Bao J, Xu L, Zhang L, Huang Ch, Meng X-M, Li J. PTEN negatively regulates the expression of pro-inflammatory cytokines and chemokines of fibroblast-like synoviocytes in adjuvant-induced arthritis. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*. 2019; 47(1): 3687-96.

148. Yari K, Payandeh M, Rahimi Z. Association of the hypermethylation status of PTEN tumor suppressor gene with the risk of breast cancer among Kurdish population from Western Iran. *Tumour Biol*. 2016 Jun;37(6):8145-52.

149. Le Magnen C, Virk RK, Dutta A, Kim JY, Panja S, Lopez-Bujanda ZA, Califano A, Drake CG, Mitrofanova A, Abate-Shen C. Cooperation of loss of NKX3.1 and inflammation in prostate cancer initiation. *Dis Model Mech*. 2018 Nov 16;11(11):dmm035139.

150. Khalili M, Mutton L, Gurel B, Hicks JL, De Marzo AM, Bieberich CJ. Loss of Nkx3.1 Expression in Bacterial Prostatitis: A Potential Link Between Inflammation and Neoplasia. *The American Journal of Pathology*. 2010;176(5):2259-68.
151. Shoag J, Barbieri CE. Clinical variability and molecular heterogeneity in prostate cancer. *Asian Journal of Andrology*. 2016;18(4):543-8.
152. Egeblad M, Nakasone ES, Werb Z. Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism. *Developmental cell*. 2010;18(6):884-901.
153. Aran D, Camarda R, Odegaard J, et al. Comprehensive analysis of normal adjacent to tumor transcriptomes. *Nature Communications*. 2017;8:1077.
154. Briassouli P, Chan F, Savage K, Reis-Filho JS, Linardopoulos S. Aurora-A regulation of nuclear factor-kappaB signaling by phosphorylation of I-kappaB-alpha. *Cancer Res*. 2007;67:1689-95.
155. Lindon C, Grant R, Min M. Ubiquitin-Mediated Degradation of Aurora Kinases. *Frontiers in Oncology*. 2015;5:307.
156. Senft D, Qi J, Ronai ZA. Ubiquitin ligases in oncogenic transformation and cancer therapy. *Nature reviews Cancer*. 2018;18(2):69-88.
157. Suárez-Causado A, Caballero-Díaz D, Bertrán E, et al. HGF/c-Met signaling promotes liver progenitor cell migration and invasion by an epithelial-mesenchymal transition-independent, phosphatidylinositol-3 kinase-dependent pathway in an in vitro model. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1853(10 Pt A):2453-63.
158. Wang LH, Xiang J, Yan M, et al. The mitotic kinase Aurora-A induces mammary cell migration and breast cancer metastasis by activating the Cofilin-actin pathway. *Cancer Res*. 2010;70:9118-28.

159. Ding L, Zhang Z, Xu Y, Zhang Y. Comparative study of Her-2, p53, Ki-67 expression and clinicopathological characteristics of breast cancer in a cohort of northern China female patients. *Bioengineered*. 2017;8(4):383-392.
160. Tan PY, Chang CW, Chng KR, Wansa KDSA, Sung W-K, Cheung E. Integration of Regulatory Networks by NKX3-1 Promotes Androgen-Dependent Prostate Cancer Survival. *Molecular and Cellular Biology*. 2012;32(2):399-414.
161. Decker J, Jain G, Kießling T, Sander P, Rid M, et al. Loss of the Tumor Suppressor NKX3.1 in Prostate Cancer Cells is Induced by Prostatitis Related Mitogens. *J Clin Exp Oncol*. 2016;5:3.
162. Den Hollander J, Rimpi S, Doherty JR, et al. Aurora kinases A and B are up-regulated by Myc and are essential for maintenance of the malignant state. *Blood*. 2010;116(9):1498-1505.
163. Hendrickson WK, Flavin R, Kasperzyk JL, et al. Vitamin D Receptor Protein Expression in Tumor Tissue and Prostate Cancer Progression. *Journal of Clinical Oncology*. 2011;29(17):2378-2385.
164. Montgomery RB, Mostaghel EA, Vessella R, et al. Maintenance of Intratumoral Androgens in Metastatic Prostate Cancer: A Mechanism for Castration-Resistant Tumor Growth. *Cancer research*. 2008;68(11):4447-54.
165. Kmeťová Sivoňová M, Jurečeková J, Tatarková Z, Kaplán P, Lichardusová L, Hatok J. The role of CYP17A1 in prostate cancer development: structure, function, mechanism of action, genetic variations and its inhibition. *General Physiology and Biophysics*. 2017;36(5):487-99.
166. Heidegger I, Kern J, Ofer P, Klocker H, Massoner P. Oncogenic functions of IGF1R and INSR in prostate cancer include enhanced tumor growth, cell migration and angiogenesis. *Oncotarget*. 2014;5(9):2723-35.
167. Weinstein D, Sarfstein R, Laron Z, Werner H. Insulin receptor compensates for IGF1R inhibition and directly induces mitogenic activity in prostate cancer cells. *Endocrine Connections*. 2014;3(1):24-35.

168. McFarlane RJ, Wakeman JA. Meiosis-like Functions in Oncogenesis: A New View of Cancer. *Cancer Res.* 2017;77(21):5712-6.

169. Pospiech N, Cibis H, Dietrich L et al. Identification of novel PANDAR protein interaction partners involved in splicing regulation. *Sci Rep.* 2018;8:2798

170. Soung YH, Ford S, Zhang V, Chung J. Exosomes in Cancer Diagnostics. *Cancers (Basel).* 2017;9(1):8. Published 2017 Jan 12.

171. Huang T, Deng CX. Current Progresses of Exosomes as Cancer Diagnostic and Prognostic Biomarkers. *Int J Biol Sci.* 2019;15(1):1-11. Published 2019 Jan 6.

ДОДАТОК А

СПИСОК НАУКОВИХ ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Mankovska O.S., Korsakova A.S., Cherniavskiy K.R., Kononenko O.A., Stakhovsky E.O., Bondarenko Yu.M., Kashuba V.I., Gerashchenko G.V. Methylation pattern of tumor-suppressor gene promoters as putative noninvasive diagnostic markers for prostate cancer. *Biopolymers and Cell* – 2021. – 37(1). – pp. 23-32.

2. Mankovska O., Gerashchenko G., Rozenberg E., Stakhovsky E., Kononenko O., Bondarenko Yu., Kashuba V. Analysis of Aurora kinases genes expression points on their distinct roles in prostate cancer development. *Ukr.Biochem.J* – 2019. – 91(6). – pp. 15-26.

3. 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. *Biopolymers and Cell* – 2017. – 33(5). – pp. 335-355.

4. Маньковська О.С., Асатрян О. Е., Вікарчук М. В., Кононенко О. А., Стаховський Е. О., Кашуба В. І. Визначення експресії генів кіназ AURORA A, AURORA B, AURORA C, BRAF і EGFR у сечі пацієнтів, хворих на рак передміхурової залози *Наукові записки НаУКМА* . – 2016. – т.184. – с.16 -23.

5. Маньковська О. С., Скрипнікова О. С., Панасенко Г. В., Вікарчук М. В., Кононенко О. А., Стаховський Е. О., Кашуба В. І. Виявлення метилування генів *VIM*, *TMEFF2* і *GDF15* у сечі пацієнтів, хворих на рак сечового міхура в українській популяції *Наукові записки НаУКМА* . – 2016. – т.184. – с. 23-29.

6. Mankovska O.S., Cherniavskiy K.R., Savitskiy A.L., Semko S.L., Grechko B.O., Bondarenko Yu.M., Kashuba V.I. Epigenetic markers of bladder cancer: can we distinguish cancer from non-cancerous inflammation using urine as source of DNA? // Науково-практичний журнал ОНКОЛОГИЯ. - Т. 21. - № 3. - 2019. - с. 268.

7. Mankovska O.S., Kashuba V. I. Differential expression of Aurora kinases' genes in prostate cancer and prostate adenoma samples points on possibility of their distinct roles in prostate cancer development. // Матеріали конференції молодих вчених “Фундаментальна медицина: інтегральні підходи до терапії хворих з онкопатологією”, 4-5 лютого, 2019 р., Київ, Україна. Науково-практичний журнал ОНКОЛОГИЯ. - Т. 21. - № 3. - 2019. -с.77.

8. Asatryan O. E., Mankovska O.S., Kashuba V. I. Changes in expression of oncogenes and methylation of tumor suppressor genes in urine from patients with prostate cancer. // Biopolymers and Cell. Materials of XII annual Conference of Young Scientists Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine. - 2018. - Vol. 34. (2). - P 143.

9. Skrypnikova O. S., Mankovska O.S., Kashuba V. I. Detection of methylation of tumor suppressor genes and identification of expression profile of non-coding rnas in samples of urine from patients with bladder cancer. // Biopolymers and Cell. Materials of XII annual Conference of Young Scientists Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine.- 2018. - Vol. 34. (2). – P. 155.

10. Mankovska O., Panasenko G, Kashuba V. BRAF mutation and hypermethylation of RASSF1A, GSTP and RARbeta2 in prostate cancer patients // European Journal of Human Genetics, - 2018. - V26. - 1001-2 pp.

11. Mankovska O., Kashuba V. Identification of novel molecular and genetic markers for early detection of epithelial tumours and prognosis of the course of the disease // Exp. Oncol. Materials of mini-symposium “New Trends

in Cancer Research and Innovative Tumor Vaccines” – 2017. V 39, 2. – P.158.

12. Mankovska O.S., Asatryan O. E., Vikarchuk M.V., Kononenko O. A., Stakhovsky E. O., Kashuba V. Expression of AURORA C Kinase Gene Correlates with BRAF Gene Expression in Samples of Patients with Prostate and Thyroid Cancer. // The 12th International Congress of Cell Biology July 21-25 2016, Prague, Czech Republic. Abstract book. – 2016.

13. Mankovska O.S., Asatryan O. E., Vikarchuk M.V., Kononenko O. A., Stakhovsky E. O., Kashuba V. I. Aurora A, Aurora B, Aurora C and BRAF kinases gene expression in samples of urine from patients with prostate cancer // FEBS JOURNAL – 283. – P. 368.

14. Mankovska O.S., Skrypnikova O.S., Panasenko G.V., Slivka U.S., Vikarchuk M.V., Kononenko O.A., Stakhovsky E.O., Kashuba V.I. Characterization of methylated VIM, TMEFF2 and GDF as potential set of epigenetic markers for bladder cancer. // Exp Oncol. Materials of International scientific conference “Integrated Clinacal and Pathogenetic Approaches in Diagnosis and Therapy of Cancer. 2016. – 38 (2). - 128–140 pp.

15. Маньковська О.С., Скрипнікова О.С., Панасенко Г.В., Вікарчук М.В., Стаховський О.Е., Пікуль М.В., Кашуба В.І. Виявлення нових епігенетичних і прогностичних маркерів у сечі хворих на рак сечового міхура. // Український Радіологічний журнал. – Додаток 1. – 2016. – XIII з’їзд онкологів і радіологів України 26-28 травня 2016 р., м. Київ (матеріали з’їзду). – с.114.

16. Панасенко Г.В., Маньковська О.С., Вікарчук М.В., Некрасов К.А., Кондратов О.Г., Кашуба В.І., Стаховський Е.О., Кононенко О.А. Панель нуклеїнових маркерів для виявлення та диференціювання карциноми нирки, передміхурової залози та сечового міхура по сечі пацієнтів. // Науково-практичний журнал «Онкологія», 2015. — Т. 17, № 3 (65).

17. Маньковская О.С., Панасенко Г.В., Кашуба В.И., Стаховский Э.О., Некрасов К.А., Кононенко А.А. Кондратов А.Г. Панель нуклеиновых маркеров для выявления и дифференцировки карциномы почки, простаты и мочевого пузыря по моче пациентов. Abstract book “Science, Technology and Innovative Technologies in the prosperous epoch of the Powerful State” Abstracts of papers of the International Scientific Conference. June.11-13, 2015., Ashgabat. - 2015 – p. 265.

ДОДАТОК Б

КЛІНІКО-ПАТОЛОГІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПАЦІЄНТІВ З РАКОМ ПЕРЕДМІХУРОВОЇ ЗАЛОЗИ

Таблиця А1

Пацієнти з РПЗ, у яких аналізували зразки тканин

Номер зразка	Бал за шкалою Глісона	ПСА нг/мл	Стадія	Вік	TMPRSS2:ERG гібридний транскрипт
РПЗ1	8	12,12	II	58	1
РПЗ2	9	20,9	III	67	1
РПЗ3	9	84,2	II	62	1
РПЗ4	6	9,3	II	57	1
РПЗ5	7	7,13	II	77	1
РПЗ6	9	6,92	II	48	0
РПЗ7	9	51	III	65	0
РПЗ8	6	18,6	II	71	1
РПЗ9	9	0,48	III	61	0
РПЗ10	7	8,19	I	69	1
РПЗ11	6	27,3	II	56	0
РПЗ12	7	11,7	II	68	0
РПЗ13	9	37,8	II	53	0
РПЗ14	7	13,9	II	68	0
РПЗ15	6	25,2	II	66	0
РПЗ16	<7	23.57	III	55	0
РПЗ17	<7	6.5	II	67	0
РПЗ18	<7	6.04	II	67	1
РПЗ19	<7	5.03	II	63	1
РПЗ20	<7	13.3	II	54	1
РПЗ21	<7	29.08	II	74	1
РПЗ22	7	19.8	II	64	0

Продовження таблиці А1

РП323	7	19.27	II	54	1
РП324	7	5.6	II	62	1
РП325	7	14.3	II	69	1
РП326	7	24.6	II	52	1
РП327	>7	86.26	III	60	0
РП328	>7	22.6	IV	63	0
РП329	>7	20.29	II	76	0
РП330	>7	9.68	II	54	1
РП331	>7	25.08	II	58	1
РП332	>7	16	III	63	1
РП333	>7	17	II	63	1
РП334	>7	33	II	66	1

Таблиця А2

Пацієнти з РПЗ, у яких аналізували зразки сечі

Номер зразка	Стадія	TNM	Вік	ПСА нг/мл	Бал за шкалою Глісона
РП335	III	cT3NxMxG3	76р.	NA	7
РП336	IV	T2c Nx M1в	72р.	75	6
РП337	II	T2cNxM0G1	56	11	9
РП338	II	pT2b pN0 M0	41р.	NA	9
РП339	IV	T3N1M0G2	66	NA	8
РП340	IV	T3a Nx M1b	61	45	9
РП341	IV	T4N0M1bG3	66		9
РП342	IV	T3NxM1	NA	NA	NA
РП343	NA	NA	NA	NA	NA
РП344	III	T3 N0 M0	NA	NA	NA
РП345	III	T3N0M0G2	76	NA	NA
РП346	NA	NA	NA	NA	NA
РП347	NA	NA	NA	NA	NA
РП348	II	T3b pN0 M0 G2	67	38	7

Продовження таблиці А2

ПІІ349	IV	T4N1M0	76	301.2	7
ПІІ350	III	T3N0M0	73	25.8	9
ПІІ351	II	T2bNxM0G2	NA	NA	NA
ПІІ352	III	T36NxM0G2	NA	NA	NA
ПІІ353	III	T3N0M0	70	80	6
ПІІ354	II	T2a NxM0G1	57	NA	NA
ПІІ355	III	T3NxM0G3	65	NA	NA
ПІІ356	II	T2N0M0	62	9.9	7
ПІІ357	III	T3b pN0 M0 G3	66	11,5	9
ПІІ358	II	T2c pNO MOG3	61	28,7	8
ПІІ359	II	T2c pN0 M0 G2	59	17	9
ПІІ360	III	T3b pNO MOG4	67	6,32	8
ПІІ361	III	T3NxM0G3	58	NA	NA
ПІІ362	IV	T3NxM1bG3	67	NA	NA
ПІІ363	NA	NA	NA	NA	NA
ПІІ364	II	T2 pNO MOG1	61	7,2	6
ПІІ365	II	T2a pN0 M0 G1	64	24	6
ПІІ366	III	T4a pN1 MOG3	68	51	9
ПІІ367	II	T2aNx M0G1	65	7,44	7
ПІІ368	NA	NA	NA	NA	NA
ПІІ369	II	T2N0M0	NA	NA	NA
ПІІ370	III	T4a pN1 MOG3	68	51	9
ПІІ371	II	T2c NO MOG3 Кл. гр.2	70	18	9
ПІІ372	II	T2a pNO MOG1	62	1.73	6
ПІІ373	II	T2a NO M0G1	69	33	6
ПІІ374	II	T2a pN0 M0 G	65	91,9	8
ПІІ375	NA	NA	NA	NA	NA
ПІІ376	NA	NA	NA	NA	NA
ПІІ377	III	T3bN1M0	61	28,3	9
ПІІ378	NA	NA	NA	NA	NA
ПІІ379	NA	NA	NA	NA	NA
ПІІ380	III	T3N0M0	67	14,7	7
ПІІ381	I	T2aN0M0	53	5,3	6
ПІІ382	II	T2bN0M0	80	10,5	6

Продовження таблиці А2

ПП383	II	T2a pN0 M0 G3	67	11,6	8
ПП384	III	T3b pNO M0G	68	10,5	9
ПП385	II	T2c pNO M0G2	70	14	6
ПП386	III	T3b pNO M0G2	63	39,33	6
ПП387	NA	NA	NA	NA	NA
ПП388	III	T2b NO MG2	65	20	8
ПП389	II	T2 NO M0G1	72	5,12	6
ПП390	I	T1a pNO M0G2	60	47,1	6
ПП391	III	T3b pN0 M0 G4	58	10	8
ПП392	II	T2a pN2 M0G2	63	8,05	6
ПП393	II	T2c NO M0G2	56	71	7

ДОДАТОК В

КЛІНІКО-ПАТОЛОГІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПАЦІЄНТІВ З РАКОМ СЕЧОВОГО МІХУРА

Таблиця Б1

Клініко-патологічні характеристики пацієнтів з РСМ

Номер зразка	TNM	Стадія	Номер зразка	TNM	Стадія
1	T3b pN0 M0 G2	III	37	T2Nx M0 Gx	II
2	T3b pN2 M0 G3	IV	38	T1Nx M0 Gx	I
3	T4bNxM0G2	IV	39	T2Nx M0 Gx	II
4	T3aNxM0G2	III	40	T1Nx M0 Gx	I
5	T2a N0 M0 G2	II	41	T1Nx M0 Gx	I
6	T2NxM0Gx	II	42	T1Nx M0 Gx	I
7	T2aNxM0Gx	II	43	T1Nx M0 Gx	I
8	T3bNxM0G3	III	44	T1Nx M0 Gx	I
9	T2bNxM0G2	III	45	T3a Nx M0 G2	III
10	NA	NA	46	NA	NA
11	T2NxM0Gx	II	47	T3bNxM0G3	III
12	NA	NA	48	T4aN1M0G2	IV
13	T2b pN0 M0 G2	II	49	T3b pN0 M0 G2	III
14	NA	III	50	T3b pN0 M0 G2	II
15	NA	NA	51	T3b pN2 M0 G3	IV
16	NA	NA	52	T4bNxM0G2	IV
17	T2b pN0 M0 G2	II	53	T2b pN0 M0 G2	III
18	T3bNxM0G1	III	54	T2a N0 M0 G2	II
19	NA	NA	55	T2a N0 M0 G2	II
20	T3bNxM1G1	IV	56	T3NxM0G3	II
21	T2NxM0Gx	II	57	T3bNxM0G1	III
22	T2bNxM0G2	II	58	T2bNxM0	II
23	NA	NA	59	T2Nx M0 Gx	II
24	T3aNxM0G2	III	60	T2bNxM0G1	II
25	T2Nx M1	IV	61	T1NxM0Gx	I

Продовження таблиці Б1

26	T4N _x M0	IV	62	T1N _x M0 G _x	I
27	T2 _b N _x M0	II	63	T2N _x M0 G _x	I
28	T2 N _x M0 G2	II	64	T1N _x M0 G _x	I
29	T2N _x M0G _x	II	65	T1N _x M0 G _x	I
30	T2 N _x M0 G2	II	66	T2N _x M0 G _x	II
31	T2 N _x M0 G2	II	67	T4aN1M0G2	IV
32	T1N _x M0G _x	I	68	T3bN _x M0G _x	III
33	T3N _x M0G _x	III	69	NA	NA
34	T1N _x M0 G _x	I	70	T2N _x M0G _x	II
35	T2N _x M0 G _x	II	71	T2a N0 M0 G2	II
36	T1N _x M0 G _x	I			

Примітка: **червоний напівжирний** – аналізували РНК з тканин і з сечі;
червоний - аналізували тільки РНК з тканин; **чорний** – аналізували тільки
 НК з сечі