

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ**

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ОНИЩЕНКО Катерина Вікторівна

УДК 577.217+606:6.0.6

**ДИСЕРТАЦІЯ
ІДЕНТИФІКАЦІЯ ГЕНЕТИЧНИХ ТА ЕПІГЕНЕТИЧНИХ ЗМІН ПРИ
СВІТЛОКЛІТИННІЙ КАРЦИНОМІ НИРКИ ЛЮДИНИ ДЛЯ РОЗРОБКИ
ПІДХОДІВ НЕІНВАЗИВНОЇ ДІАГНОСТИКИ ЗАХВОРЮВАННЯ**

091 – Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

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

 _____ К.В. Онищенко

Науковий керівник Скрипкіна Інесса Яківна, кандидат біологічних наук,
старший науковий співробітник

Київ - 2023

АНОТАЦІЯ

Онищенко К. В. Ідентифікація генетичних та епігенетичних змін при світлоклітинній карциномі нирки людини для розробки підходів неінвазивної діагностики захворювання – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 «Біологія». – Інститут молекулярної біології та генетики Національної академії наук України, Київ, 2023.

Робота присвячена визначенню генетичних та епігенетичних змін новоутворень нирки, які асоційовані зі світлоклітинним типом раку, що в подальшому можуть використовуватися для уточнювальної діагностики та персоналізованого лікування.

Рак є однією з основних причин смертності у світі. За останні 100 років за рівнем захворюваності та смертності онкопатологія не тільки перемістилася з десятого місця на друге, поступаючись лише хворобам серцево-судинної системи, але й, за статистикою деяких країн виходить на перше місце за цим показником.

Рак пов'язаний з різноманітними молекулярно-генетичними порушеннями, які призводять до утворення та розвитку пухлини, але за допомогою них також можливо прогнозувати перебіг захворювання. Розвиток світлоклітинного раку нирки пов'язаний зі змінами багатьох генів-супресорів. Вони можуть бути інактивовані в результаті мутацій, протяжних алельних делецій, метилювання CpG-острівців у промоторних частинах або регулюватися за допомогою різних мікроРНК.

Аналіз сучасних даних дає підставу вважати, що значний прогрес в ранній діагностиці раку може бути досягнений завдяки визначенню генетичних/епігенетичних порушень ДНК пухлин, що можуть визначатися як в солідних пухлинах, так і в «рідких біопсіях». Ще у 1977 році Леон і співавт. [1] описали підвищення рівня вільно циркулюючої позаклітинної ДНК (пкДНК) у плазмі крові хворих на рак (за рахунок некрозу) у порівнянні зі здоровими особами. Використання пакДНК як потенційного діагностичного маркера пухлин було підтверджено пізніше різними групами для різних типів злоякісних новоутворень.

Тому метою дисертаційної роботи було визначення молекулярно-генетичних змін як у біопсіях пухлин нирки, так і на позаклітинних нуклеїнових кислотах плазми крові, що можуть бути маркерами світлоклітинного підтипу раку нирки. Для чого було проведене комплексне молекулярно-генетичне дослідження 122 зразків пацієнтів з пухлинами нирки (переважно I-II стадії).

Як і при будь-якому іншому типі раку, розвиток захворювання пов'язаний не тільки зі змінами геному пухлинних клітин, але й регуляторними молекулами, такими, як мікроРНК, що необхідні для регуляції численних клітинних процесів, зокрема контролю клітинної проліферації, диференціації та тривалості життя клітини. Численні дослідження акцентують увагу на використанні різних асоційованих з раком мікроРНК як індикаторів патологій. Так, в нашому дослідженні було визначено суттєве зниження рівнів мікроРНК miR-324-5p, miR-181a-5p, miR-30a/c-5p, miR-138-1 та miR-200a-3p у біопсіях пухлин в порівнянні з умовно здоровою навколопухлінною тканиною нирки. Показано, що рівень експресії досліджуваних мікроРНК має хороший діагностичний потенціал ($AUC = 0,7-0,9$) і може бути використаний як додатковий діагностичний маркер нирково-клітинного раку.

Інактивація генів у пухлинах світлоклітинної карциноми нирки відбувається не тільки шляхом епігенетичного «замовчування», але й внаслідок мікросателітної нестабільності, що також може використовуватись в якості прогностичних та предективних маркерів. В даній роботі було визначено

генетичні (соматичні реорганізації) порушення генів за STR-маркерами локусів: D3S966 та D3S1568 для гена *RASSF1*, D3S1038, D3S1317 та *D3S1038*, *VHL2*, *D3S1317* – *VHL*, D9S916 та D9S974 – *CDKN2A*. Втрата гетерозиготності гена *RASSF1* виявлена у 68,3%, *VHL* – у 48,2%, *CDKN2A* – 32,8% інформативних зразків хворих на рак нирки.

Проведені нами дослідження з визначення концентрацій пкДНК в крові хворих на рак нирок показали підвищений вміст пкДНК пацієнтів з пухлинами, на противагу від здорових донорів. У пацієнтів після операції (через 5-6 днів), рівень пкДНК в плазмі крові знижувався, проте не досягав рівня здорових донорів, як це описано в літературних джерелах. Такі відмінності можуть бути пов'язані як зі специфікою даного типу операції (довге загоєння після часткової нефректомії) так і з більш чутливими сучасними методиками виділення пкДНК та постановки ПЛР. Використання двох методів діагностики показало, що метод кількісної ПЛР у реальному часі є більш точним для діагностики захворювання ($AUC=0,8049$), ніж метод інтеркаляції флуоресцентного барвника ($AUC=0,7679$), та встановлено зростання концентрації цього показника в плазмі крові хворих з раком нирки. Отриманні дані також вказують на можливість застосування даного методу як додаткового маркеру при первинній діагностиці раку нирки.

Сучасні дослідження свідчать про те, що «індекс цілісності», так само як і рівень концентрації пкДНК, можна використовувати як маркери для попередньої діагностики раку, та для моніторингу наявності в організмі пацієнта метастатичних клітин, не видалених під час операції. В наших дослідженнях ми визначаємо наявність високомолекулярних пкДНК як за цілісністю гена β -актину, так і з використанням праймерів, що одночасно специфічні до коротких і довгих фрагментів гена *GAPDH*. Аналіз результатів дослідження показав абсолютно різні дані для онкохворих та контрольної групи ($AUC=0,8613$), що підтверджує результати, отримані іншими дослідниками для хворих на рак. В контрольній групі пкДНК виявилася помірно фрагментованою (медіана для АСТВ384/АСТВ106=0,685), в той час як у хворих на НКК спостерігався значно більший ступінь фрагментації (медіана для АСТВ384/АСТВ106=1,126). Ці

методи дослідження підтвердили як підвищений вміст високомолекулярних ДНК в плазмі хворих на рак нирок, так і можливість використання даного методу для діагностики пухлиноутворення.

Відомо, що епігенетичні зміни суттєво впливають на утворення і прогресію пухлин. Одним з найбільш перспективних підходів для оцінки ризику у хворих з раком є виявлення аберантно метильованих промоторних ділянок генів на пкДНК. В представленій роботі було визначено метилювання CpG-острівців 11 промоторних ділянок генів-супресорів (*RASSF1A*, *RASSF1C*, *LRRC3B*, *GPX3*, *PCDH8*, *RUNX3*, *APC*, *CDKN2A (p14ARF)*, *CDKN2A (p16INK4a)*) на ДНК, виділених з пухлин та плазми крові пацієнтів з раком нирки у порівнянні з контрольними зразками. Було підтверджено не тільки метилювання CpG-острівців промоторів цих генів у пухлинах світлоклітинного раку нирки, але й на пкДНК тих самих хворих. Визначено, що одночасне виявлення статусу метилювання CpG-острівців промоторів генів *RASSF1A*, *GPX3*, *APC* та *CDKN2A (p14ARF)* на пкДНК плазми крові дозволяє визначити наявність пухлин нирки з великою достовірністю (чутливість – 98%, специфічність – 96%).

Отже, у дисертаційній роботі було визначено генетичні (соматичні реорганізації) та епігенетичні (метилювання генів, зміна рівнів мікроРНК) зміни у хворих на світлоклітинну карциному нирки, та визначено маркери плазми крові, що характерні для даного типу раку. Отримані результати можуть бути використані, в якості маркерів для створення комплексної системи ранньої діагностики раку нирки, та моніторингу перебігу хвороби.

Ключові слова: нирково-клітинна карцинома, світлоклітинний рак нирки генетичні зміни, епігенетичні зміни, втрата гетерозиготності, метилювання генів, позаклітинні нуклеїнові кислоти, РНК, експресія генів, мікроРНК, діагностичні маркери

Список публікацій здобувача за темою дисертації:

Статті у наукових фахових виданнях

1. Skrypkinia I., Tsyba L., **Onyshchenko K.**, Morderer D., Kashparova O., Nikolaienko O., Panasenko G., Vozianov S., Romanenko A., Rynditch A.V. Concentration and Methylation of Cell-Free DNA from Blood Plasma as Diagnostic Markers of Renal Cancer. *Disease markers* 08/2016; 2016(14). DOI:10.1155/2016/3693096. *Особистий внесок здобувача – визначення статусу метилювання CpG-острівців промоторів генів RASSF1A, APC на пкДНК, статистична обробка результатів, участь у підготовці статті.*

2. Дубровська Г.В., **Онищенко К.В.**, Перета Л.В., Кашпарова О.В., Григоренко В.М., Скрипкіна І.Я. Мікросателітні зміни та метилювання гена *RASSF1* у хворих на нирково-клітинний рак. Фактори експериментальної еволюції організмів». 2018, 23, с.192-196. DOI: <https://doi.org/10.7124/FEEO.v23.1013>

Особистий внесок здобувача – аналіз літературних джерел, виділення ДНК зі зразків пацієнтів, підбір умов для визначення втрати гетерозиготності STR-маркерів, асоційованих з геном RASSF1, визначення статусу метилювання CpG-острівця промотору гена RASSF1A, статистична обробка результатів, участь у підготовці статті.

3. **Онищенко К.В.**, Григоренко В.М., Перета Л.В., Сербай Ю.Р., Войціцький Т. В., Скрипкіна І.Я. Генетичні та епігенетичні зміни гена *VHL* у пухлинах світлоклітинного раку нирки. Фактори експериментальної еволюції організмів, 2019, 24, С. 221-226. DOI: <https://doi.org/10.7124/FEEO.v24.1105>.

Особистий внесок здобувача – аналіз літературних джерел, виділення ДНК зі зразків пацієнтів, підбір умов для визначення втрати гетерозиготності STR-маркерів, асоційованих з геном VHL, визначення статусу метилювання CpG-

острівця промотору гена VHL, статистична обробка результатів, написання та підготовка статті до друку.

4. Скрипкіна І.Я., **Онищенко К.В.**, Герасимчук Д.О., Анопрієнко О.В., Арешков П.О. Аналіз експресії міРНК hsa-miR-30a-5p та hsa-miR-200c-3p у пухлинах головного мозку. Фактори експериментальної еволюції організмів: 2019. – Т.24. – С. 227-232. DOI: <https://doi.org/10.7124/FEEO.v24.1106>

Особистий внесок здобувача – виділення ДНК зі зразків пацієнтів з раком мозку, підбір умов та визначення експресії мікроРНК шляхом ПЛР у реальному часі, статистична обробка результатів.

5. **Onyshchenko K.V.**, Voitsitskyi T.V., Grygorenko V.M., Saidakova N.O., Pereta L.V., Onyschuk A.P., Skrypkins I.Ya. Expression of micro-RNA hsa-miR-30c-5p and hsa-miR-138-1 in renal cell carcinoma. Exp Oncol. 2020;42(2):115-119. DOI: 10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-42-no-2.14632.

Особистий внесок здобувача – виділення ДНК зі зразків пацієнтів з раком нирки, визначення експресії мікроРНК шляхом ПЛР у реальному часі, статистична обробка результатів, написання та підготовка статті до друку.

Статті у наукових виданнях

6. Скрипкіна І.Я., **Онищенко К.В.**, Кашпарова О.М., Григоренко В.М., Перета Л.В., Онищук А.П., Вікарчук М.В., Банас О.О. Визначення статусу метилування генів *LRRC3B*, *RASSF1A*, *APC* на позаклітинній ДНК та ДНК пухлини хворих із нирково-клітинним раком. Здоров'є мужчини, 2015, 53 (2), 166-170. *Особистий внесок здобувача – виділення ДНК та пкДНК, підбір умов метил-специфічної ПЛР, визначення статусу метилування CpG-острівців промоторів генів LRRC3B, RASSF1A, APC.*

7. **Онищенко К.В.**, Дубровська Г.В., Смаль М.П., Никитченко Н.В., Григоренко В.М., Вікарчук М.В., Ролевич А.И., Гончарова Р.И., Скрипкіна І.Я. Інактивація гена-онкосупресора *CDKN2A* у злоякісних новоутвореннях нирки та

сечового міхура. Анотований збірник проектів спільного конкурсу ДФФД-БРФФД - Академперіодика, 2018, с. 79-83.

Особистий внесок здобувача – аналіз літературних джерел, виділення ДНК зі зразків пацієнтів з раком нирки, підбір умов для визначення втрати гетерозиготності STR-маркерів, асоційованих з геном CDKN2A, визначення статусу метилювання CpG-острівців промоторів генів p16INK4a, p14ARF та TIMP3, статистична обробка результатів, участь у підготовці статті.

8. Дубровська Г.В., **Онищенко К.В.**, Перета Л.В., Григоренко В.М., Скрипкіна І.Я. Діагностичне та прогностичне значення гена rassf1 у хворих на нирково-клітинний рак. Урологія, 2018 (87), 22 (4), с 24-28, DOI: 10.26641/2307-5279.22.4.2018.152471.

Особистий внесок здобувача – аналіз літературних джерел, планування експериментів, визначення втрати гетерозиготності STR-маркерів, асоційованих з геном RASSF1, статистична обробка результатів.

Тези конференцій за темою дисертації

1. **Онищенко К.**, Циба Л., Ніколаєнко О., Мордерер Д., Скрипкіна І. Визначення концентрації позаклітинної ДНК та ген-специфічного метилювання у плазмі крові пацієнтів із раком нирок. IX Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів "Молодь і поступ біології", 16-19 квітня 2013, Львів, Україна, 378-379.

2. **Онищенко К.**, Мордерер Д. Визначення метилювання генів-супресорів пухлини APC та FHIT на позаклітинній ДНК в плазмі крові пацієнтів з раком нирок. VIII Міжнародна конференція молодих вчених, 3-6 грудня 2013, Харків, Україна, с.43-44

3. Кашпарова О. **Онищенко К.**, Банас О., Перета Л. Визначення статусу метилювання гена LRRC3B та VHL на позаклітинній ДНК та ДНК пухлин хворих

на рак нирок.. III Міжнародна наукова конференція студентів, аспірантів та молодих учених, 24-27 лютого 2014, Донецьк, Україна, с.279

4. **Онищенко К.**, Мордерер Д. Визначення метилування генів-супресорів пухлини *LRRC3B* та *VHL* на позаклітинній ДНК в плазмі крові пацієнтів з раком нирок. III Міжнародна наукова конференція студентів, аспірантів та молодих учених, 24-27 лютого 2014, Донецьк, Україна, с.282-283

5. **Онищенко К.**, Кашпарова О., Перета Л., Банас О., Григоренко В., Скрипкіна І.Я. Визначення і порівняння статусу метилування генів *LRRC3B* та *APC* на позаклітинній ДНК плазми крові та ДНК пухлин у пацієнтів зі світлоклітинним раком нирок. X Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів "Молодь і поступ біології", 8-11 квітня 2014, Львів, Україна, с.216-217.

6. **Onyshchenko K.**, Kashparova A., Korniyushin V., Banas O., Pereta L. Comparison of *LRRC3B* and *RASSF1* methylation genes of patients with renal cell carcinoma. XII Міжнародна наукова конференція студентів та молодих науковців «Шевченківська весна 2014: Біологічні науки». 25-28 березня 2014, Київ, Україна, с.50-51

7. Кашпарова О., **Онищенко К.**, Скрипкіна І.Я. Метилування гена *RASSF1* на позаклітинній ДНК плазми крові та геномній ДНК пухлин у пацієнтів зі світлоклітинним раком нирок. XI міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології», 20-23 квітня 2015, Львів, Україна, с. 405-406

8. **Онищенко К.**, Кашпарова О., Перета Л., Банас О., Григоренко В., Скрипкіна І.Я. Гіперметилування гена *RARB2* на позаклітинній ДНК у пацієнтів зі світлоклітинним раком нирок. XI міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології», 20-23 квітня 2015, Львів, Україна, с. 410-411

9. **Onyshchenko K.V.**, Kashparova O.V., Dubrovskaya H., Skrypkina I.Ya. Microsatellite alterations of *RASSF1* and *VHL* and DNA integrity in renal cell

carcinoma. XIV International Scientific Conference of Students, PhD Students; Young Scientists; Shevchenkivska Vesna: Biology. 6-8 April, Kyiv, Ukraine, P.17-18

10. **Onyshchenko K.V.**, Kashparova O.V., Rynditch A.V., Gryhorenko V.M., Pereta L.V., Skrypkinska I. Ya.. Gene-methylation of DNA in patients with renal cell carcinoma. X Parnas Conference. 10-12 July 2016, Wrocław, Poland, P.52.

11. **Onyshchenko K.V.**, Kashparova O.V., Rynditch A.V., Gryhorenko V.M., Pereta L.V., Skrypkinska I. Ya. DNA methylation of *GPX3* and loss of heterozygosity of *RASSF1* and *VHL* in renal cell carcinoma. X Parnas Conference. 10-12 July 2016, Wrocław, Poland, P.53.

12. **Онищенко К. В.**, Кашпарова О. В. Ідентифікація молекулярних маркерів для ранньої діагностики пухлин нирки. 11th International Young Scientists' Biology Conference "From A Molecule Up To The Biosphere". November 29 - December 2 2016, Kharkiv, Ukraine, 31-32

13. Дубровська Г. В., **Онищенко К. В.** Втрата гетерозиготності локусу гена *VHL* у карциномах нирки. 11th International Young Scientists' Biology Conference "From A Molecule Up To The Biosphere". November 29 - December 2 2016, Kharkiv, Ukraine, 39-40

14. Щербик К., **Онищенко К.**, Дубровська А., Перета Л., Банас О., Григоренко В., Скрипкіна І. Визначення та порівняння статусу метилування генів *GPX3*, *RUNX3* та *TIMP3* на позаклітинній ДНК плазми крові та днк пухлин у пацієнтів зі світлоклітинним раком нирки. XI міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології», 25-27 квітня 2017, Львів, Україна, 111-112.

15. Дубровська Г., **Онищенко К.**, Щербик К., Скрипкіна І. Метилування гену *RUNX3* під час розвитку світло-клітинного раку нирки. XV International Scientific Conference of Students, PhD Students; Young Scientists; Shevchenkivska Vesna: Biology. 18-21 квітня 2017, Kyiv, Ukraine, P.240-241

16. Shcherbyk K., **Onyshchenko K.**, Skrypkinska I. Methylation of *GPX3* and *TIMP3* genes of DNA of tumors in patients with renal cell carcinoma. Joint Meeting of the

25th Annual Conference “Modern Aspects of Biochemistry and Biotechnology”& 2nd Conference for Young Scientists CYS-2017, 6-9 June 2017, Kyiv, Ukraine, P.82

17. Войціцький Т., Дубровська Г., **Онищенко К.**, Перета Л., Григоренко В., Скрипкіна І. Метилування гена *PCDH8* під час розвитку світло-клітинного раку нирки. XVI Міжнародна наукова конференція студентів та молодих вчених «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки/BioScience Advances», Збірник тез, 24-27 квітня 2018, Київ, Україна, с.196-198.

18. Dubrovskа H., **Onyshchenko K.**, Kashparova O., Gryhorenko V., Pereta L., Skrypkinа I. Microsatellite alterations and DNA methylation of *RASSF1* in renal cell carcinoma. 4th International Conference of Cell Biology, 11-12 May 2018, Cracow, Poland, P.421.

19. **Onyshchenko K.**, Kashparova O., Dubrovskа H., Pereta L., Gryhorenko V., Skrypkinа I. Detection of aberrant methylation and loss of heterozygosity of cancersuppressor genes in cfDNA as markers of renal cell carcinoma. XII annual Conference of Young Scientists Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine. May 2018, Kyiv, Ukraine, Biopolymers and Cell. 2018. Vol. 34. N 2. P.162.

20. **Onyshchenko K.**, Kashparova O., Dubrovskа H., Pereta L., Gryhorenko V., Skrypkinа I. Genetic and epigenetic changes on plasma cell-free dna as markers of renal cell carcinoma. The FEBS3+ Meeting – XI Parnas Conference "Biochemistry and molecular biology for innovative medicine", 3-5 September 2018, Kyiv, Ukraine, Ukr Biochem J, Vol.18, Special Issue, P.85.

21. Войціцький Т. В., Дашченко М. С., **Онищенко К. В.**, Григоренко В.М., Перета Л.В., Скрипкіна І. Я. Визначення рівня експресії мікро РНК miR-30с-5р у плазмі крові як діагностичного біомаркеру світлоклітинного раку нирки. науково-практична конференція молодих вчених «Фундаментальна медицина: інтегральні підходи до терапії хворих з онкопатологією», 4-5 лютого 2019, Київ, Україна, Онкологія, 2019, Т.21, №1, с.60

22. Voitsitskyi T.V., Dashchenko M. S., **Onyshchenko K. V.**, Grygorenko V. M., Pereta L. V., Onyshchuk A. P., Skrypkinа I. Ya.. miR-138-1 expression in tumor and patient blood plasma as diagnostic biomarker of clear cell renal cell carcinoma. XVI

Міжнародна наукова конференції студентів, молодих вчених та фахівців "Актуальні питання сучасної медицини", 28-29 березня Харків, Київ, Україна, с.377

23. **Onyshchenko K.**, Voitsitskyi T. V., Grygorenko V. M., L. V. Pereta, Skrypkina I. Ya.. HSA-MIR-30A-5P and HSA-MIR-200C-3P expression in tumor and patient blood plasma as diagnostic biomarker of clear cell renal cell carcinoma. XIII IMBG All-Ukrainian Conference of Young Scientists. May 2019, Kyiv, Ukraine, Biopolymers and Cell. 2019, Vol. 35. N 5, P.402

Патент

1. Григоренко В.М., Скрипкіна І.Я., Перета Л.В., **Онищенко К.В.**, Кашпарова О.В. Патент на корисну модель № 134876 «Спосіб ранньої діагностики раку нирки». Зареєстровано в Державному реєстрі патентів України на корисну модель 10.06.2019 р. *Особистий внесок здобувача –виділення пкДНК зі зразків пацієнтів з карциномною нирки, визначення статусу метилювання CpG-острівців промоторів генів, статистична обробка результатів.*

SUMMARY

Onyshchenko K. V. Identification of genetic and epigenetic changes in human clear cell carcinoma for the development of non-invasive diagnostics –
Qualification scientific work with the manuscript copyright.

Thesis for obtaining the degree of Doctor of Philosophy (PhD) in Biology, specialty 091 – Biology. – Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2023

The study is dedicated to identifying genetic and epigenetic alterations in renal neoplasms associated with clear cell renal cell carcinoma. These findings have the potential to be employed for refined diagnostic procedures and personalized treatment strategies.

Cancer is one of the leading causes of mortality worldwide. Over the past 100 years, oncopathology has not only shifted from the tenth position to the second in terms of morbidity and mortality, trailing only cardiovascular diseases, but according to statistics from some countries, it also claims the first position in this regard.

Cancer is associated with various molecular-genetic aberrations that lead to the formation and progression of tumors, but they also offer the potential for predicting the course of the disease. The development of clear cell renal cell carcinoma is linked to alterations in numerous tumor suppressor genes. These genes may undergo inactivation due to mutations, allelic deletions, CpG island methylation in promoter regions, or regulation by various microRNAs.

Literature analysis provides grounds to believe that significant progress in early cancer diagnosis can be achieved through the identification of genetic and epigenetic abnormalities in tumor DNA, which can be detected both in solid tumors and in "liquid biopsies." As early as 1977, Leon et al. [1] reported an elevation in the levels of circulating cell-free DNA (cfDNA) in the blood plasma of cancer patients (due to

necrosis) compared to healthy individuals. The use of cfDNA as a potential diagnostic marker for tumors has been subsequently confirmed by various groups for different types of malignancies.

Therefore, the objective of the dissertation was to identify molecular-genetic changes both in kidney tumor biopsies and in extracellular nucleic acids in blood plasma that could serve as markers for the clear cell subtype of kidney cancer. To achieve this, a comprehensive molecular-genetic investigation was conducted on 122 samples from patients with kidney tumors, predominantly in stages I and II.

As with any other type of cancer, the development of the disease is not only associated with genomic alterations in tumor cells but also with regulatory molecules such as microRNAs, essential for governing various cellular processes, including the control of cell proliferation, differentiation, and cell lifespan. Numerous studies highlight the use of various cancer-associated microRNAs as indicators of pathological conditions. In our research, a significant decrease in the levels of microRNAs miR-324-5p, miR-181a-5p, miR-30a/c-5p, miR-138-1, and miR-200a-3p was identified in tumor biopsies compared to the adjacent non-tumor kidney tissue. It has been demonstrated that the expression levels of these microRNAs exhibit promising diagnostic potential (AUC = 0.7-0.9) and can be utilized as additional diagnostic markers for clear cell renal cell carcinoma.

Inactivation of genes in RCC may occur due to microsatellite instability, which can also serve as prognostic and predictive markers. This study identified genetic (somatic reorganizations) disruptions in genes using short tandem repeat (STR) markers at loci: D3S966 and D3S1568 for the RASSF1 gene, D3S1038, D3S1317, and *D3S1038*, *VHL2*, *D3S1317* for VHL gene, and D9S916 and D9S974 for CDKN2A. Loss of heterozygosity of the RASSF1 gene was detected in 68.3%, VHL in 48.2%, and CDKN2A in 32.8% of informative samples from kidney cancer patients.

Our studies on determining the concentrations cfDNA in the blood of kidney cancer patients revealed elevated cfDNA levels in patients with tumors compared to healthy donors. In postoperative patients (5-6 days post-surgery), the cfDNA levels decreased but did not reach the levels observed in healthy donors, as described in the

literature. These differences may be associated with the specific nature of the surgical procedure (prolonged healing after partial nephrectomy) and the increased sensitivity of modern cfDNA isolation methods and quantitative PCR techniques. The use of two diagnostic methods showed that real-time quantitative PCR is more accurate for disease diagnosis (AUC=0.8049) compared to the fluorescence intercalating dye method (AUC=0.7679). An increase in cfDNA concentration in the blood plasma of patients with kidney cancer was also established. The obtained data suggest the potential application of this method as an additional marker in the primary diagnosis of kidney cancer.

Previous studies indicate that the "integrity index," along with the level of circulating cell-free DNA (cfDNA) concentration, can serve as markers for early cancer diagnosis and for monitoring the presence of metastatic cells not removed during surgery. In our studies, we assessed the presence of high-molecular-weight cfDNA both for the integrity of the beta-actin gene and using primers simultaneously specific to short and long fragments of the GAPDH gene. Analysis of the results revealed significantly different data for cancer patients and the control group (AUC=0.8613), confirming findings obtained by other researchers for cancer patients. In the control group, cfDNA was moderately fragmented (median for ACTB384/ACTB106=0.685), while in patients with renal cell carcinoma (RCC), a significantly higher degree of fragmentation was observed (median for ACTB384/ACTB106=1.126). These research methods validated both the increased content of high-molecular-weight DNA in the plasma of kidney cancer patients and the potential use of this method for tumor diagnostics.

It is well-known that epigenetic changes significantly impact the formation and progression of tumors. One of the most promising approaches for assessing the risk in cancer patients is the detection of aberrantly methylated promoter regions of genes on circulating cell-free DNA (cfDNA). In the presented study, the methylation of CpG islands in the promoters of 11 tumor suppressor genes (*RASSF1A*, *RASSF1C*, *LRRC3B*, *GPX3*, *PCDH8*, *RUNX3*, *APC*, *CDKN2A* (*p14ARF*), *CDKN2A* (*p16INK4a*)) was determined on DNA extracted from tumors and blood plasma of kidney cancer

patients in comparison with control samples. The study confirmed not only the CpG island methylation in the promoters of these genes in RCC tumors but also on the cfDNA of the same patients. It was identified that simultaneous detection of the methylation status of CpG islands in the promoters of RASSF1A, GPX3, APC, and CDKN2A (p14ARF) genes on cfDNA in blood plasma allows for highly reliable identification of kidney tumors (sensitivity – 98%, specificity – 96%).

Therefore, in the dissertation, genetic (somatic reorganizations) and epigenetic (gene methylation, microRNA level changes) alterations were identified in patients with RCC. Blood plasma markers characteristic of this type of cancer were also determined. The obtained results can be utilized as markers for the development of a comprehensive system for early diagnosis of kidney cancer and for monitoring the progression of the disease.

Key words: renal cell carcinoma, clear cell renal cell carcinoma, genetic changes, epigenetic changes, loss of heterozygosity, gene methylation, cell-free nucleic acids, RNA, gene expression, microRNA, diagnostic markers

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

Articles in scientific professional publications

1. Skrypkinia I., Tsyba L., **Onyshchenko K.**, Morderer D., Kashparova O., Nikolaienko O., Panasenko G., Vozianov S., Romanenko A., Rynditch A.V. Concentration and Methylation of Cell-Free DNA from Blood Plasma as Diagnostic Markers of Renal Cancer. Disease markers 08/2016; 2016(14). DOI:10.1155/2016/3693096.
2. Dubrovskaya H.V., **Onyshchenko K.V.**, Pereta L.V., Kashparova O.V., Grygorenko V.M., Skripkina I.Ya. Microsatellite alteration and methylation of the

RASSF1 gene in patients with renal cell carcinoma. Factors of experimental evolution of organisms, 2018, 23, P.192-196. DOI: <https://doi.org/10.7124/FEEO.v23.1013> .

3. **Onyshchenko K.V.**, Grygorenko V.M., Pereta L.V., Serbai Yu.R., Voitsitskyi T.V., Skrypkinia I. Ya. Genetic and epigenetic alterations of *VHL* gene in clear cell renal cell carcinoma. Factors of experimental evolution of organisms. 2019, 24, P. 221-226. DOI: <https://doi.org/10.7124/FEEO.v24.1105>

4. Skrypkinia I. Ya., **Onyshchenko K. V.**, Gerasymchuk D. O., Anopriyenko O. V., Areshkov P. O. Analysis of hsa-miR-30a-5p AND hsa-miR-200c-3p microRNA expression in brain tumor. Factors of experimental evolution of organisms: 2019. 24, P. 227-232. DOI: <https://doi.org/10.7124/FEEO.v24.1106>

5. **Onyshchenko K.V.**, Voitsitskyi T.V., Grygorenko V.M., Saidakova N.O., Pereta L.V., Onyschuk A.P., Skrypkinia I.Ya. Expression of micro-RNA hsa-miR-30c-5p and hsa-miR-138-1 in renal cell carcinoma. Exp Oncol. 2020;42(2):115-119. DOI: 10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-42-no-2.14632

Articles in scientific journals

6. Skrypkinia I. Ya., **Onyshchenko K.V.**, Kashparova O.B., Rynditch A. V., Grygorenko V.V., Pereta L.V., Vikarchuk M.V., Banas O.O. Detection of the methylation status of genes *LRRC3B*, *RASSF1A*, *APC* of the cell-free and tumor DNA patients with renal cell carcinoma. Health of men. 2015, 53 (2). P.166-170.

7. **Onyshchenko K.**, Dubrovskaya H., Smal M., Nikitchenko N., Grygorenko V., Vikarchuk M., Rolevich O., Goncharova R., Skrypkinia I. Inactivation of the CDKN2A oncosuppressor gene in renal and bladder malignancies. In Annotated collection of projects of the joint contest SFFR-BRFFD - Academiperiodica, 2017, p. 79-83

8. Dubrovskaya H.V., **Onyshchenko K.V.**, Pereta L.V., Grygorenko V.M., Skrypkinia I.Ya. Diagnostic and prognostic value of the rassf1 gene in patients with

renal cell carcinoma. *Urology*, 2018. (87), 22 (4), P.24-28, DOI: 10.26641/2307-5279.22.4.2018.152471.

Тези конференцій за темою дисертації

1. **Onyshchenko K.**, Tsyba L, Nikolaienko O.V., Morderer D. Ye., Skrypkin I. Determination of the Concentration of Extracellular DNA and Gen-Specific Methylation in Plasma in Patients with Renal Cancer. IX International scientific conference of students and postgraduates "Youth and the progress of biology", Lviv, Ukraine. 2013, P.378-379.
2. **Onyshchenko K.**, Morderer D. Determination of methylation of *APC* and *FHIT* tumor suppressor genes on extracellular DNA in the plasma of patients with kidney cancer. VIII International Conference of Young Scientists, 2013, c.43-44
3. Kashparova O. Onyshchenko K., Banas O., Pereta L. Determination of the methylation status of the *LRRC3B* and *VHL* gene on cell-free DNA and DNA of tumors of patients with kidney cancer. III International Scientific Conference of Students, Postgraduates and Young Scientists, Donetsk, 2014, P.279
4. **Onyshchenko K.**, Morderer D. Determination of methylation of tumor suppressor genes *LRRC3B* and *VHL* on extracellular DNA in the plasma of patients with kidney cancer. III International Scientific Conference of Students, Postgraduates and Young Scientists, Donetsk, 2014, P.282-283
5. **Onyshchenko K.**, Kashparova O.V., Pereta L.V., Banas O.O. Grygorenko V.M. Skrypkin I. Determination and comparison of the status of methylation of *LRRC3B* and *APC* genes on extracellular DNA of blood plasma and DNA tumors in patients with colorectal kidney cancer. X International Scientific Conference for Students and Postgraduates "Youth and the Progress of Biology", Lviv, Ukraine., 2014, P.216-217.
6. **Onyshchenko K.**, Kashparova O., Korniyushin V., Banas O., Pereta L. Comparison of *LRRC3B* and *RASFI* methylation genes of patients with renal cell

carcinoma. XII International Scientific Conference of Students and Young Scientists "Shevchenko Spring 2014: Biological Sciences". Kiev, 2014. P.50-51

7. Kashparova O., **Onyshchenko K.**, Skrypkins I. Methylation of the *RASSF1* gene on extracellular blood plasma DNA and genomic DNA tumor in patients with colorectal kidney cancer. XI International Scientific Conference for Students and Graduates "Youth and Biology", 2015, Lviv, Ukraine, P.405-406

8. **Onyshchenko K.V.**, Kashparova O.V., Pereta L.V., Banas O.O., Gryhorenko V.V.M., Skrypkins I. Hypermethylation of the *RARB2* gene on extracellular DNA of packets with light-cellular kidney cancer. XI International Scientific Conference for Students and Graduates "Youth and Biology", 2015, Lviv, Ukraine, P.410-411

9. Onyshchenko K.V., Kashparova O.V., Dubrovskaya H., Skrypkins I.Ya. Microsatellite alterations of *RASSF1* and *VHL* and DNA integrity in renal cell carcinoma. XIV International Scientific Conference of Students, PhD Students; Young Scientists; Shevchenkiy Vesna: Biology. Ukraine

10. **Onyshchenko K.V.**, Kashparova O.V., Rynditch A.V., Gryhorenko V.M., Pereta L.V., Skrypkins I. Ya.. Gene-methylation of DNA in patients with renal cell carcinoma. X Parnas Conference. Poland, Wrocław, 2016, P.52.

11. **Onyshchenko K.V.**, Kashparova O.V., Rynditch A.V., Gryhorenko V.M., Pereta L.V., Skrypkins I. Ya. DNA methylation of *GPX3* and loss of heterozygosity of *RASSF1* and *VHL* in renal cell carcinoma. X Parnas Conference. Poland, Wrocław, 2016, P.53.

12. **Onyshchenko K.V.**, Kashparova O.V. Identification of molecular markers for early diagnosis of kidney tumors. 11 th International Young Scientists' Biology Conference "From A Molecule Up To The Biosphere". Ukraine, Kharkiv, 2016. 31-32

13. Dubrovskaya H.V., **Onyshchenko K.V.** Loss of heterozygosity of the *VHL* gene locus in renal cell carcinoma. 11 th International Young Scientists' Biology Conference "From A Molecule Up To The Biosphere". Ukraine, Kharkiv, 2016. P.39-40

14. Shcherbyk K., **Onyshchenko K.**, Dubrovskaya H.V., Pereta L., Banas O., Gryhorenko V., Skrypkins I. Determination and comparison of the status of *GPX3*,

RUNX3 and *TIMP3* genes methylation on extracellular dn of plasma and dna tumors in patients with colorectal kidney cancer. XI International Scientific Conference for Students and Postgraduates "Youth and Biology", 2017, Lviv, Ukraine 111-112.

15. Dubrovskaya H., **Onyshchenko K.**, Shcherbyk K, Skrypkins I. Methylation of the *RUNX3* gene during the development of light-cell kidney cancer. XV International Scientific Conference of Students, PhD Students; Young Scientists; Shevchenkivska Vesna: Biology. Ukraine, Kyiv, 2017. P.240-241

16. Shcherbyk K., **Onyshchenko K.**, Skrypkins I. Methylation of *GPX3* and *TIMP3* genes of DNA of tumors in patients with renal cell carcinoma. Joint Meeting of the 25th Annual Conference “Modern Aspects of Biochemistry and Biotechnology”& 2nd Conference for Young Scientists CYS-2017, Kyiv, Ukraine, 2017, P.82

17. Voitsitskyi T., Dubrovskaya H., **Onyshchenko K.**, Pereta L., Grigorenko V., Skrypkins I. Methylation of the *PCDH8* gene during the development in renal cell carcinoma. XVI International Scientific Conference of Students and Young Scientists "Shevchenko Spring: Achievements of Biological Science/BioScience Advances", Collection of abstracts, 2018, P.196-198.

18. Dubrovskaya H., **Onyshchenko K.**, Kashparova O., Gryhorenko V., Pereta L., Skrypkins I. Microsatellite alterations and DNA methylation of *RASSF1* in renal cell carcinoma. 4th International Conference of Cell Biology, Cracow, Poland, 2018, P.421.

19. **Onyshchenko K.**, Kashparova O., Dubrovskaya H., Pereta L., Gryhorenko V., Skrypkins I. Detection of aberrant methylation and loss of heterozygosity of cancersuppressor genes in cfDNA as markers of renal cell carcinoma. XII annual Conference of Young Scientists Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine, Biopolymers and Cell. 2018. Vol. 34. N 2. P.162.

20. **Onyshchenko K.**, Kashparova O., Dubrovskaya H., Pereta L., Gryhorenko V., Skrypkins I. Genetic and epigenetic changes on plasma cell-free DNA as markers of renal cell carcinoma. XI Parnas Conference – Young Scientists Forum, 2018, Ukr Biochem J, Vol.18, Special Issue, P.85.

21. Voitsitskyi T.V., Dashchenko M. S., **Onyshchenko K. V.**, Grygorenko V. M., Pereta L. V., Skrypkinia I. Ya.. Determination of the expression level of microRNA miR-30c-5p of in blood plasma as a diagnostic biomarker of clear cell renal cell carcinoma. Scientific-practical conference of young scientists "Fundamental medicine: integrated approaches to the therapy of patients with oncopathology", Kyiv, Oncology, 2019, 21 (1), cP.60
22. Voitsitskyi T.V., Dashchenko M. S., **Onyshchenko K. V.**, Grygorenko V. M., Pereta L. V., Onyshchuk A. P., Skrypkinia I. Ya. miR-138-1 expression in tumor and patient blood plasma as diagnostic biomarker of clear cell renal cell carcinoma. XVI International scientific conferences of students, young scientists and specialists "Current issues of modern medicine", Abstracts book, Kharkiv, 2019, p.377
23. **Onyshchenko K.**, Voitsitskyi T. V., Grygorenko V. M., L. V. Pereta, Skrypkinia I. Ya.. HSA-MIR-30A-5P and HSA-MIR-200C-3P expression in tumor and patient blood plasma as diagnostic biomarker of clear cell renal cell carcinoma. XIII IMBG All-Ukrainian Conference of Young Scientists. Biopolymers and Cell. 2019. 35 (5). P.402

Patent

1. Grigorenko V.M., Skrypkinia I.Y., Pereta L.V., **Onyshchenko K.V.**, Kashparova O.V. Utility model patent № 134876 "Method for early diagnosis of kidney cancer". Registered in the State Register of Patents of Ukraine for a utility model on June 10, 2019.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	25
ВСТУП.	26
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	34
1.1. Характеристика злоякісних пухлин нирки	34
1.1.1. Загальні відомості про нирково-клітинний рак	34
1.1.2. Світлоклітинний рак нирки	33
1.1.3. Новітні тест-системи для ранньої діагностики раку нирки	36
1.2. Позаклітинна ДНК як маркер злоякісних новоутворень	39
1.2.1. Загальна характеристика позаклітинної ДНК	39
1.2.2. Метилування ДНК як маркер злоякісних новоутворень	40
1.2.3. Мікросателітні зміни як маркер злоякісних новоутворень	42
1.2.4. Втрата гетерозиготності, як поштовх до розвитку пухлини	44
1.2.5. Індекс цілісності позаклітинної ДНК та його використання для діагностики раку	46
1.3. Характеристика генів-супресорів пухлин	48
1.4. Характеристика мікроРНК	56
1.4.1. МікроРНК як біомаркери онкозахворювань	62
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	65
2.1. Обладнання	65
2.2. Матеріали і реактиви	65
2.3. Об'єкти досліджень	66
2.4. Виділення ДНК та оцінка її якості	68
2.4.1. Отримання вільної від еритроцитів фракції крові	68
2.4.2. Виділення позаклітинної ДНК	69
2.4.3. Виділення геномної ДНК	69

2.4.4. Дизайн олігонуклеотидних праймерів для оцінки якості позаклітинної ДНК	71
2.4.5. Оцінка якості виділеної ДНК методом полімеразної ланцюгової реакції	71
2.4.6. Електрофоретичне розділення продуктів полімеразної ланцюгової реакції	72
2.5. Визначення концентрації позаклітинної ДНК методом кількісної полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі	72
2.6. Визначення концентрації позаклітинної ДНК методом інтеркаляції флуоресцентного барвника	72
2.7. Аналіз ступеню метилювання CpG-островців промоторних ділянок генів-супресорів	73
2.7.1. Бісульфітна обробка отриманої ДНК	73
2.7.2. Штучне метилювання за допомогою метилтрансферази	74
2.7.3. Проведення метил-специфічної полімеразної ланцюгової реакції	74
2.7.4. Виділення фрагментів ДНК з агарозного гелю	76
2.7.5. Визначення нуклеотидної послідовності продуктів МС-ПЛР	76
2.8. Проведення мікросателітного аналізу	77
2.8.1. Детекція алельного дисбалансу у поліакриламідному гелі	77
2.8.2. Детекція алельного дисбалансу шляхом розділення продуктів ПЛР капілярним гель-електрофорезом	78
2.9. Проведення кількісної ПЛР для визначення індексу цілісності пкДНК	79
2.10. Аналіз експресії мікроРНК за допомогою методу кількісної ЗТ-ПЛР у реальному часі	80
2.10.1. Виділення тотальної РНК	80
2.10.2. Очистка виділеної РНК	80

2.10.3. Реакція поліаденілювання	81
2.10.4. Зворотно-транскрипційна реакція	81
2.10.5. Кількісне визначення мікроРНК методом ПЛР у реальному часі	82
2.11. Статистична обробка отриманих даних	83
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ	85
3.1. Рівень експресії мікроРНК у пацієнтів з раком нирки	86
3.1.1. Визначення сайтів-мішеней до мікроРНК у 3'нетрансльованих ділянках досліджуваних генів	86
3.1.2. Вміст мікроРНК у зразках пацієнтів з раком нирки	86
3.2. Виділення позаклітинної ДНК плазми крові та геномної ДНК з пухлин і навколопухлинних тканин хворих з раком нирки та оцінка їх якості	103
3.3. Аналіз мікосателітних маркерів на геномній ДНК пацієнтів з раком нирки	105
3.3.1. Визначення мікосателітних змін локусів генів шляхом детекції у ПААГ	105
3.3.2. Визначення мікосателітних змін локусів генів шляхом детекції за допомогою капілярного електрофорезу	110
3.4. Концентрація позаклітинної ДНК, виділеної з плазми крові хворих на рак нирки та здорових донорів	116
3.5. Індекс цілісності позаклітинної ДНК, виділеної з плазми крові пацієнтів з раком	120
3.6. Метилювання CpG-острівців промоторів генів на ДНК пацієнтів з раком нирки	124
3.6.1. Аналіз статусу метилювання промоторної ділянки гена <i>GPX3</i>	124

3.6.2. Аналіз статусу метилювання промоторів альтернативних транскриптів гена <i>RASSF1</i>	125
3.6.3. Аналіз статусу метилювання промоторної ділянки гена <i>LRRC3B</i>	128
3.6.4. Перевірка нуклеотидних послідовностей отриманих фрагментів МС-ПЛР	129
3.6.5. Аналіз статусу метилювання промоторної ділянки гена <i>APC</i>	130
3.6.6. Аналіз статусу метилювання промоторної ділянки гена <i>VHL</i>	131
3.6.7. Аналіз статусу метилювання промоторів альтернативних транскриптів гена <i>CDKN2A</i>	132
3.6.8. Аналіз статусу метилювання промоторної ділянки гена <i>TIMP3</i>	134
3.6.9. Аналіз статусу метилювання промоторної ділянки гена <i>RUNX3</i>	136
3.6.10. Аналіз статусу метилювання промоторної ділянки гена <i>PCDH8</i>	137
3.6.11. Відбір потенційних ДНК маркерів на основі епігенетичних змін CpG-острівців для діагностики скНKK в плазмі крові	138
РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ	149
ВИСНОВКИ	165
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	167
Додаток А	197
Додаток Б	202
Додаток В	204
Додаток Г	210
Додаток Д	213
Додаток Е	215
Додаток Ж	217

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

гДНК	– геномна дезоксирибонуклеїнова кислота
ДНК	дезоксирибонуклеїнова кислота
ЕДТА	– етилендіамінтетраоцтова кислота
ЗТ-ПЛР	– полімеразна ланцюгова реакція із зворотною транскрипцією
ЗТ-кПЛР	– кількісна полімеразна ланцюгова реакція із зворотною транскрипцією
кДНК	– комплементарна ДНК
кПЛР	– кількісна ПЛР
МС-ПЛР	– метил-специфічна полімеразна ланцюгова реакція
НKK	– нирково-клітинна карцинома
ПААГ	– поліакриламідний гель
пкДНК	– позаклітинна дезоксирибонуклеїнова кислота
ПЛР	– полімеразно-ланцюгова реакція
п.н.	– пар нуклеотидів
скНKK	– світлоклітинна нирково-клітинна карцинома
у.о.	– умовні одиниці
СрG-острівці	– ділянки ДНК, які мають високий вміст гуанінових та цитозинових нуклеотидів (>50%)
LOH	– втрата гетерозиготності (Loss of heterozigosity)
TAE	– трис-ацетатний буфер
TBE	– трис-боратний буфер
STR	– мікросателіти, або короткі тандемні повтори (short tandem repeats)

ВСТУП

Актуальність теми. Нирково клітинна карцинома (НКК), найбільш поширене злоякісне новоутворення нирки, що виявляється приблизно у 90% хворих на рак нирки [2]. Вже під час першого діагностування хвороби, близько 30% пацієнтів мають метастазуючий рак. НКК стійка до звичайних методів лікування, таких як гормональна-, радіо- хіміотерапія [3], тому оперативне видалення пухлини залишається найбільш ефективним методом лікування локалізованих первинних НКК. На жаль, у багатьох пацієнтів навіть після нефректомії через деякий час розвиваються віддалені метастази [4]. Отже, терміново потрібні відповідні біомаркери НКК, які є критичними не тільки для ранньої діагностики, але і для прогнозу, оцінки розвитку та терапії захворювання.

Останнім часом найбільша увага приділяється визначенню біомаркерів на основі позаклітинних нуклеїнових кислот (пкДНК, мРНК, мікроРНК, днРНК, рРНК тощо) завдяки розвинутим, чутливим і відносно не дорогим методам їх детекції у біологічних рідинах (сироватка/плазма крові, лімфа, сеча), що дає можливість їх використання для ранньої діагностики захворювань [5].

Актуальною задачею пошуку біомаркерів є визначення високо специфічних позаклітинних нуклеїнових кислот, що пов'язані з розвитком метастазування і можуть виступати як у якості предективних маркерів, так і бути мішенями направленої терапії.

Пошук комбінації маркерів, що можуть з високою специфічністю визначити утворення пухлин ще на початковому етапі, коли хворий не має симптомів і мікропухлини не детектуються звичайними методами (УЗД, томографія, рентгеноскопія), допоможе більш ефективному виявленню і лікуванню онкохворих. Це, в свою чергу, сприятиме збереженню життя пацієнтів, більшість яких є особами активного віку, і сприятиме збереженню людських ресурсів країни.

Разом з тим, важливим залишається також і дослідження механізмів регуляції маркерних генів, що з великою ймовірністю впливають на розвиток та прогресію ракових захворювань з метою створення терапевтичних агентів направленої дії.

Таким чином, проведення досліджень, спрямованих на визначення генетичних та епігенетичних змін, що впливають на регуляцію генів у клітинах пухлин, шляхом порівняння їх статусу як на пухлинній ДНК так і на пкДНК плазми крові, дасть можливість вибрати найбільш оптимальні гени – маркери розвитку раку нирки. Аналіз отриманих результатів допоможе у визначенні біомаркерів для складання неінвазивної тест-системи ранньої діагностики раку, мішеней таргетної терапії і визначення чинників, що пов'язані з поганим прогнозом для пацієнтів.

Зв'язок з науковими програмами, планами, темами. Роботу виконано в рамках дослідницьких тематик проектів Інституту молекулярної біології та генетики НАН України «Ідентифікація генів-супресорів, картованих на 3-й хромосомі для створення маркерів – ключових для певних видів злоякісних пухлин епітеліального походження» (2007-2011 рр., номер державної реєстрації 0107U000337) та «Втрата гетерозиготності і метилювання генів-імуносупресорів в карциномах нирки і сечового міхура» (2016, 2017 рр., номери державної реєстрації 0116U007719 та 0117U002802) відділу функціональної геноміки, «Ідентифікація генетичних та епігенетичних змін на позаклітинній ДНК крові хворих на рак нирок та рак молочної залози, як діагностичних та прогностичних маркерів ранньої неінвазивної діагностики» (2015-2019 рр., номер державної реєстрації 0115U002951) відділу функціональної геноміки та лабораторії біосинтезу нуклеїнових кислот, «Розробка та дослідне впровадження панелі мікроРНК для ранньої неінвазивної діагностики та персоналізованого хірургічного лікування у хворих на локалізовані новоутворення нирки» (2020, номер державної реєстрації 0120U100649) лабораторії біосинтезу нуклеїнових кислот.

Мета та завдання дослідження. Метою роботи було визначення молекулярно-генетичних змін як у біопсіях пухлин нирки, так і на позаклітинних нуклеїнових кислотах плазми крові, що можуть бути маркерами світлоклітинного підтипу карциноми нирки.

Для досягнення мети необхідно було вирішити такі завдання:

1. Визначити зміни експерсії мікроРНК hsa-miR-30a-5p, hsa-miR-30c-5p, hsa-miR-138-1, hsa-miR-324-5p, hsa-miR-181a-5p та hsa-miR-200a-3p у новоутвореннях нирки в порівнянні зі здоровою контрольною тканиною.
2. Детектувати мікросателітні зміни STR-маркерів, що асоційовані з генами *RASSF1*, *VHL* та *CDKN2A* у пухлинах пацієнтів порівняно з нормальними прилеглими тканинами для вибору більш значимих у використанні для створення тест-системи ранньої діагностики пухлин нирки.
3. Визначити рівні концентрації пкДНК у плазмі крові пацієнтів зі світлоклітинним раком нирки та здорових донорів для потенційного використання в якості діагностичного маркеру ранньої діагностики раку нирки.
4. Визначити «індекс цілостності» пкДНК як можливий діагностичний маркер ранньої діагностики раку нирки.
5. Встановити статус метилювання промоторних ділянок генів *RASSF1A*, *RASSF1C*, *LRRC3B*, *GPX3*, *PCDH8*, *RUNX3*, *APC*, *TIMP3*, *VHL*, *p14ARF*, *p16INK4a* в зразках карциноми нирки порівняно з нормальними прилеглими тканинами для визначення найбільш специфічних для світлоклітинного підтипу карциноми нирки.
6. Встановити статус метилювання промоторних ділянок відібраних генів на пкДНК плазми крові для порівняння цих показників зі змінами у пухлинах та у зразках здорових донорів та вибрати панель маркерів, що може бути використана у тест-системі для ранньої діагностики раку нирки
7. Провести аналіз асоціації досліджених факторів з розвитком та прогресією раку нирки.

Об'єкт дослідження – генетичні та епігенетичні фактори розвитку пухлин карциноми нирки.

Предмет дослідження – ідентифікація генетичних та епігенетичних зміни, та можливість їх визначення у плазмі пацієнтів при світлі клітинному раку нирки.

Методи дослідження – ПЛР, метилспецифічна ПЛР (МС-ПЛР), бісульфітне секвенування, кількісне визначення ДНК методами полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі (кПЛР) та за флуоресценцією інтеркалюючого барвника, кількісна полімеразна ланцюгова реакція зі зворотною транскрипцією (ЗТ-кПЛР) у реальному часі, визначення втрати гетерозиготності за STR-маркерами (LOH - аналіз) шляхом детекції у ПААГ та фрагментним аналізом, електрофорез нуклеїнових кислот, біоінформатичні та статистичні методи.

Наукова новизна отриманих результатів. Використовуючи оприлюднені дані у відкритих базах даних (публікації у PubMed, веб-сервер GEPIA (інтерактивний аналіз профілювання експресії генів) та веб-бази мікроРНК), було відібрано епігенетичні та генетичні порушення, які спостерігаються в процесі виникнення раку нирки та можуть слугувати маркерами канцерогенезу. За результатами роботи, вперше, на молекулярно-генетичному рівні, показано комплекс порушень пухлин карциноми нирки, що зустрічаються в групі хворих з української популяції. Вперше проведено комплексне визначення статусу метилювання генів (*APC*, *RASSF1*, *LRRC3B*, *GPX3*, *PCDH8*, *RUNX3*, *TIMP3*, *VHL*, *CDKN2A*) та рівнів експресії мікроРНК (miR-324-5p, miR-181a-5p, miR-30a/c-5p, miR-138-1 та miR-200a-3p) у пухлинах та плазмі крові у одних і тих самих пацієнтів з локалізованими новоутвореннями нирки. Показано, що рівні концентрації та «індекс цілісності» пкДНК плазми крові можуть виступати як достовірні маркери новоутворень нирки. Визначено, що метод детекції кількості пкДНК у плазмі крові шляхом кПЛР більш чутливий, ніж метод визначення інтеркаляції флуоресцентного барвника. Вперше показане достовірне зниження мікроРНК miR-30a/c-5p, miR-138-1 та miR-200a-3p як у біопсіях пухлин

новоутворень нирки, так і у плазмі крові хворих вже на перших стадіях захворювання. Визначено, що CpG-острівці промоторних ділянок *APC*, *RASSF1A*, *GPX3*, *PCDH8*, *RUNX3* гіперметиловані у біопсіях пухлин та плазмі крові пацієнтів на рак нирки. Втрата гетерозиготності STR-маркерами гена *RASSF1* виявлена у 34.7%, *VHL* – у 41.7%, *CDKN2A* – 20,7% інформативних зразків досліджуваної популяції хворих на рак нирки України.

Практичне значення одержаних результатів. Виявлені порушення у складі позаклітинних нуклеїнових кислот (пкДНК та пкмикроРНК) плазми хворих на скРН свідчать про можливість застосування цих генів як компонентів мультимаркерної панелі ранньої діагностики даного типу раку. Визначення концентрації мікроРНК (miR-30a/c-5p, miR-138-1, miR-200a-3p), пкДНК та статусу метилування промоторних ділянок транскриптів (*RASSF1A*, *GPX3*, *APC* та *CDKN2A*(*p14ARF*)) може використовуватись в якості маркерів плазми крові для діагностики раку нирки, рецидиву пухлин після оперативного втручання та пошуку нових мішеней таргетної терапії таких хворих. Крім того, кореляція між рівнем мікроРНК miR-138-1 та прогресією пухлини за Фурман (G2>G3) може бути використана для неінвазивного моніторингу ад'ювантної терапії хворих.

За результатами роботи зроблено два дослідних впровадження на базі Державною установою «Інститут урології НАМН України» м. Києва «Спосіб використання молекулярних маркерів в ранній діагностиці нирково-клітинного раку» (2017 р) «Спосіб використання мікроРНК в ранній діагностиці нирково-клітинного раку» (2020 р.).

За результатами впровадження досліджень у практику Державною установою «Інститут урології НАМН України» м. Києва оформлено у співавторстві патент на корисну модель: «Спосіб ранньої діагностики раку нирки».

Також отримані результати були використані при проведенні «Лабораторного практикуму з молекулярної біології» для бакалаврів кафедри біохімії зі спеціальності молекулярна біологія, НЦЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, у

курсі лекцій для аспірантів «Молекулярні основи канцерогенезу» кафедри біології ІМБГ НАН України та у курсах лекцій «Головні аспекти молекулярно-біологічних досліджень» і «Основи генної інженерії та біоінформатичного аналізу» кафедри молекулярної біології та біотехнології Київського академічного університету.

Особистий внесок здобувача. Усі дослідження проводилися за безпосередньої участі здобувача. Аналіз джерел науково-дослідних робіт та баз повногеномного аналізу пухлин нирки для визначення мікроРНК, що відповідають за розвиток та прогресію НКК, підбір умов для визначення статусу метилювання генів шляхом МС-ПЛР, врати гетерозиготності, рівнів експресії мікроРНК пухлин та плазми крові, аналіз втрати гетерозиготності методом розділення у ПААГ, а також аналіз отриманих результатів, були виконані автором особисто.

Виділення геномної ДНК та РНК зі зразків біопсій хірургічно видалених пухлин та оточуючих тканин, пкДНК плазми крові хворих та здорових донорів, були проведені за участі студентів Кашпарової О.В., Дубровської Г.В та Войцицького Т.С., МС-ПЛР були проведені за участі студентів Кашпарової О.В. та Дубровської Г.В. Кількісний аналіз пкДНК проводився спільно зі с.н.с. Скрипкіною І.Я. та с.н.с. Ніколаєнко О.В., аналіз втрати гетерозиготності методом фрагментного аналізу – зі студенткою Сербай С.Р., визначення рівнів експресії мікроРНК – спільно з м.н.с. Маньковською О. С. та студентом Войцицьким Т.С.

Зразки біопсій пухлин, умовно нормальних тканин та плазми крові пацієнтів, медичне обстеження, клініко-морфологічні висновки хворих на локалізовані пухлини нирки, отримані співробітниками відділу відновної урології та новітніх технологій ДУ «Інститут урології НАМН України» завідуючим відділом, доктором медичних наук Григоренко В. М. та лікарем-урологом Перетою Л. В.

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень були представлені на поточних наукових семінарах відділу функціональної геноміки

та лабораторії біосинтезу нуклеїнових кислот ІМБіГ та на наукових конференціях: IX Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів "Молодь і поступ біології", Львів, Україна,; VIII Международная конференция молодых ученых, 2013; II Міжнародна наукова конференція студентів, аспірантів та молодих учених, Донецьк, 2014; III Міжнародна наукова конференція студентів, аспірантів та молодих учених, Донецьк, 2014; X Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів "Молодь і поступ біології", Львів, Україна., 2014; XII Міжнародна наукова конференція студентів та молодих науковців «Шевченківська весна 2014: Біологічні науки» Київ, 2014; XI міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології», Львів, Україна, 2015; XIV International Scientific Conference of Students, PhD Students; Young Scientists; Shevchenkivska Vesna: Biology. Ukraine; X Parnas Conference. Poland, Wrocław, 2016; 11 th International Young Scientists' Biology Conference "From A Molecule Up To The Biosphere". Ukraine, Kharkiv, 2016; XI міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології», Львів, Україна, 2017; XV International Scientific Conference of Students, PhD Students; Young Scientists; Shevchenkivska Vesna: Biology. Ukraine, Kyiv, 2017; Joint Meeting of the 25th Annual Conference "Modern Aspects of Biochemistry and Biotechnology"& 2nd Conference for Young Scientists CYS-2017, Kyiv, Ukraine, 2017; XVI Міжнародна наукова конференція студентів та молодих вчених «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки/BioScience Advances», 2018; 4th International Conference of Cell Biology, Cracow, Poland, 2018, XII annual Conference of Young Scientists Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine, Biopolymers and Cell. 2018; XI Parnas Conference – Young Scientists Forum, 2018; Науково-практична конференція молодих вчених «Фундаментальна медицина: інтегральні підходи до терапії хворих з онкопатологією», м.Київ, 2019; XVI Міжнародна наукова конференцій студентів, молодих вчених та фахівців "Актуальні питання сучасної медицини", Збірка тез, Харків, 2019;. XIII IMBG All-Ukrainian Conference of Young Scientists.

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 32 наукові праці, з них 5 статей у фахових наукових журналах, 2 з яких входять до всесвітньої бази публікацій PubMed Національного центру інформаційної біотехнології США (NCBI) та наукометричної бази даних Scopus (одна з них належить також до другого квартилю (Q2) відповідно до класифікації Scimago Journal & Country Rank – Disease markers), 3 стаття у періодичних виданнях, тези 23 доповідей на наукових конференціях та 1 патент на корисну модель.

Структура та обсяг роботи. Дисертація складається із вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів експериментальних досліджень, аналізу та узагальнення отриманих результатів, висновків, списку використаних джерел. Загальний обсяг дисертації – 222 сторінки. Робота містить 42 рисунки, 15 таблиць, 8 додатків. Список використаної літератури охоплює 271 найменування.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Характеристика злоякісних пухлин нирки

1.1.1. Загальні відомості про нирково-клітинний рак. Нирково-клітинна карцинома (НKK) включає в себе ряд підтипів злоякісних новоутворень нирки з різноманітними патогістологічними, генетичними та епігенетичними характеристиками. За даними Національного Канцер Реєстру в 2019 році в Україні було зареєстровано 4878 випадків захворювань на рак нирки, що на 2% більше ніж за попередній рік. За цей же час 1834 осіб померло від вищезгаданого захворювання. Встановлено, що у 25–30% пацієнтів діагностуються метастази на момент виявлення захворювання і навіть після радикального оперативного лікування у 20–30% хворих захворювання прогресує. Хірургічне втручання є «золотим стандартом» лікування, однак залишається актуальним питання про подальший перебіг захворювання, прогноз та виживаність пацієнта. Також слід зазначити, що даний тип раку зазвичай є радіо- та хеміорезистентним, що значно ускладнює лікування даного захворювання на стадіях, для яких є характерним метастазування. В той же час важливо відмітити, що НKK не є самим агресивним типом онкологічних захворювань і більш ніж 90% випадків, діагностованих на ранніх стадіях, не є летальними і підлягають лікуванню. Проте, на даний час, існуючі методи діагностики не досить точні та не дозволяють виявляти захворювання на самих ранніх стадіях розвитку.

Організм досить довго приховує симптоми захворювання, саме тому дуже часто діагноз ставиться, коли хвороба вже досягає пізніх стадій і з'являються метастази в інших органах. Найпершими симптомами НKK є кров у сечі (близько 40% пацієнтів, що вперше звертаються за медичною допомогою),

постійний біль в ділянці тазу і живота (40%), втрата ваги (33%), підвищений артеріальний тиск (20%), підвищена температура (20%), надзвичайне потовиділення вночі і загальне хворобливе самопочуття [6]. Під час метастазування найчастіше уражуються лімфатичні вузли, легені, печінка, кістки і головний мозок [7].

Відомими факторами ризику для раку нирки є активне та пасивне куріння, ожиріння, недостатнє споживання овочів та фруктів. Також у групі ризику знаходяться люди, що страждають на гіпертензію, адже існують дані, які засвідчують, що прийом антигіпертензивних препаратів сечогінної дії пов'язаний з виникненням злоякісних новоутворень. Світлоклітинний рак нирки (СРН), що є найбільш розповсюдженим підтипом даного захворювання, часто зустрічається у пацієнтів з термінальною стадією ниркової недостатності, придбаною нирково-кістковою хворобою та туберозним склерозом. Проте, більшість пацієнтів зазвичай не входять до групи ризику, і патогенетичні зміни, що лежать в основі цього захворювання, залишаються невідомими [6].

1.1.2. Світлоклітинний рак нирки. Сучасна класифікація раку нирки була прийнята у 2004 році Всесвітньою організацією охорони здоров'я. Вона базується на гістопатологічних, імуногістохімічних та генетичних особливостях. Рак нирки поділяють на світлоклітинний, папілярний, хромофобний, гранульований, веретенноклітинний, кісто-пов'язаний та рак збиральних трубочок. Найбільш поширеним підтипом є світлоклітинний рак, який складає 75% від усіх типів злоякісних пухлин нирки. Папілярний підтип складає 10–15%, хромофобний – 5%, рак збиральних трубочок – 1%, онкоцитома – 5–9% та недиференційовані підтипи раку нирки складають 10% [8].

Клітини світлоклітинного раку мають епітеліальне походження. Пухлини зазвичай зустрічаються поодинокі. Поверхня має жовтий колір, часті геморагічні випадки. Іноді бувають ділянки з рубцями, спостерігається окостеніння, яке може бути пов'язане з некрозом. Спостерігаються випадки з

широкою кістозною трансформацією, наприклад випадки з повним зовнішнім окостенінням, що не мають твердої пухлинної частини. Такий вид пухлин (мультиокулярний кистоз НКК) важко розрізнити за виглядом від доброякісної кісти нирки [9].

Гістологічно світлоклітинний рак нирки характеризується підвищеною неоваскуляризацією та відносно частими судинними інвазіями та ранніми метастазами. Неоплазія нирки складається з чистих цитоплазматичних клітин. Вони є чистими завдяки високому вмісту глікогену та ліпідів. Клітини з більш високим мітохондріальним вмістом можливо спостерігати в еозинофільному чи гранульованому вигляді. Переважання цього типу клітин є винятковим. Ядра округлюються, їх характеристики залежать від ступеню диференціювання. Найбільш поширеним випадком є утворення твердих частин. Можуть бути присутні також трубчасті і, іноді, мікрокістозні частини. Папілярні області спостерігаються дуже рідко [8].

Делеція плеча 3p хромосоми 3 людини (LOH 3p) є найбільш типовою генетичною аномалією під час світлоклітинного раку нирки і складає біля 75,8% випадків. Ця аномалія збігається з проявом хвороби Гіппеля-Ліндау у 34–56 % випадках під час одиничної карциноми [3].

1.1.3. Новітні тест-системи для ранньої діагностики раку нирки. За даними досліджень «Analysis of the Global In Vitro Diagnostics Market» компанії Frost & Sullivan, на початку 2014 року глобальний ринок *in vitro* діагностики оцінювався в 47,27 мільярдів доларів США і, за оцінками експертів, до 2017 року має досягти 62,63 мільярди. В свою чергу, станом на 2014 рік, на ринок діагностики раку припадає 100 994,5 мільйони доларів США, а на рак нирки— 5,8% від загального об'єму продаж засобів діагностики. Істотний вплив на розвиток *in vitro* технологій надає персоналізація медицини. Лікарі починають відходити від стандартних схем лікування тих чи інших захворювань і пропонують своїм пацієнтам індивідуальні плани діагностики та лікування.

Особливо чітко ця тенденція проявляється у випадках діагностування у пацієнта складних комплексних захворювань, таких як рак. За останні роки популярність засобів молекулярної діагностики, до яких відносяться аналізи геномних, епігеномних, клітинних та протеомних змін, значно зростає [10].

Найбільш перспективним інструментом молекулярно-генетичної діагностики та моніторингу онкологічних захворювань представляється аналіз маркерів метилювання ДНК. Нині описані набори епігенетичних ДНК-маркерів, що дозволяють з високим ступенем специфічності виявити різні типи пухлин. Крім того, ці маркери чутливі на самих ранніх стадіях розвитку захворювання, що дозволяє використовувати їх для ранньої онкодіагностики. Численні дослідження в галузі медичної епігеноміки вже дозволили розробити ряд способів епігенетичної ДНК-діагностики для деяких онкологічних захворювань, проте на світовому ринку на даний час представлені лише поодинокі тест-системи [10].

У більшості систем діагностики (наприклад, тестах Epi proColon [11] і Epi proLung [12] німецької компанії Epigenomics AG, в системі ConfirmMDx for Prostate Cancer американської компанії «MDxHealth» [13]) використовуються методи, засновані на бісульфітній конверсії цитозинових основ з подальшим їх визначенням у складі генів-онкосупресорів, які мають ряд суттєвих недоліків. Серед них: 1) неповнота конверсії, що може призводити до помилкових результатів аналізу; 2) значні втрати ДНК на етапі конверсії; 3) крім того, ці методи залишаються досить ресурсоємними. Все це негативно позначається на якості і вартості проведеної діагностики.

Альтернативні методи, що базуються на використанні метил-зв'язуючих білків для виділення метильованої ДНК і її подальшої ампліфікації (наприклад, технологія MethylMeter [14], розроблена фахівцями американської компанії «RiboMed») дозволяють досягати високих показників чутливості/специфічності і використовуються виробниками деяких тест-систем (наприклад, G-CIMP DecisionDX від «Castle Biosciences» [15], США). Проте, вони залишаються

досить трудомісткими, а для чіткого кількісного аналізу результатів потрібне складне обладнання.

Ферментативні методи, що базуються на розщепленні ДНК метил-чутливими і/або метилзалежними ендонуклеазами, є набагато простішими і в той же час, досить чутливими. Зокрема, в деяких методиках епігенетичної діагностики для детекції маркерів метилювання використовується метил-чутлива ПЛР, що базується на дії метил-чутливих ендонуклеаз рестрикції. Однак даний підхід не дозволяє виявляти частково метильовані ДНК, тоді як саме такий тип метилювання характерний для ранніх стадій канцерогенезу. Важливою перевагою використання епігенетичних ДНК-маркерів у порівнянні з молекулярно-генетичними (виявлення мутацій генів) є більш прості і економічні методи їх виявлення. З іншого боку, епігенетичні дослідження дозволяють значно підвищити чутливість діагностики (85% і більше) у порівнянні з ІФА онкодіагностики (близько 60%). Можливість широкого використання маркерів метилювання ДНК в клінічній лабораторній діагностиці обумовлена їх наявністю не тільки у біопсійному матеріалі, але й у біологічних зразках, отриманих неінвазивними/малоінвазивними методами (плазмі і сироватці крові, сечі та інших біологічних рідинах) [10].

В таблиці Б.1 (Додаток Б) представлені вендори, які завершили всі необхідні клінічні випробування і успішно реалізують свої рішення на ринках Америки, країн Європи та Азії. В аналіз не були включені існуючі методи лабораторної діагностики онкомаркерів у крові пацієнтів, що базуються на методі імуноферментного аналізу, оскільки вони не можуть бути розглянуті як прямі конкуренти в силу своєї низької надійності. Це пов'язано з тим, що кількість онкомаркерів у крові може трохи збільшуватися при розвитку кіст, доброякісних пухлин, інфекційних або запальних захворюваннях. Відповідно існує висока ймовірність отримання хибнопозитивних і помилково негативних результатів, що мінімізує доцільність проведення діагностики такого типу.

1.2. Позаклітинна ДНК як маркер злоякісних новоутворень

1.2.1. Загальна характеристика позаклітинної ДНК. В 1948 році французькими вченими вперше було описано існування позаклітинної ДНК (пкДНК) в крові людини [16]. Це відкриття не привертало багато уваги до 1994 року, коли мутація гену *RAS* була детектована в крові хворого на рак [17]. Позаклітинна ДНК є вільноциркулюючою нуклеїновою кислотою, що знайдена в як в плазмі/сироватці крові так і в інших біологічних рідинах. Механізм виникнення пкДНК в крові при нормальних і патологічних станах ще не до кінця зрозумілий, проте вивільнення нуклеїнових кислот пов'язують з апоптозом та некрозом ракових клітин. Також є деякі припущення про секрецію клітинами фрагментів нуклеїнових кислот. Некротичні та апоптичні клітини, як правило, фагоцитуються макрофагами чи іншими клітинами з подібними функціями. В свою чергу, макрофаги, що поглинули некротичну чи апоптичну клітину, можуть звільняти продукти розщеплення ДНК у навколишнє середовище. *In vitro* дослідження з культурою клітин показали, що в процесі вивільнення ДНК макрофаги можуть як залишатися активними, так і руйнуватися [18], [19]. Також фрагменти ДНК можуть активно надходити в кров із змертвілих клітин [20].

У плазмі здорових людей пкДНК вивільняється після апоптозу клітин, що не являються некротичними. Численні дослідження показали, що фрагменти ДНК можуть активно вивільнятись з усіх живих клітин [21]. Було зроблено припущення, що ці спонтанно вивільнені ДНК-фракції з більш низькою молекулярною масою, ніж геномна ДНК, відповідають так званим метаболічним фракціям ДНК. Ця метаболічна фракція ДНК, мабуть, відповідальна за клітинні функції, такі, як транскрипція РНК. Вона може бути в комплексі з глікопротеїном і потрапляти в кров, щоб діяти як посередник з сигнальною функцією між клітинами і тканинами [20]. В результаті у онкохворих крім ДНК, що вивільняється в кров за нормальних умов, можна детектувати пкДНК, що є результатом апоптичних і некротичних процесів, характерних саме для пухлинних клітин.

Було підраховано, що пухлина вагою 100 г складається з 3×10^{10} клітин і приблизно 3,3% ДНК з неї може потрапляти щоденно в кров. В середньому розмір ДНК коливається в межах від 70-200 пар нуклеотидів до 21 т.п.н. [22]. Отже, такі ДНК-фрагменти мають менші молекулярні маси, ніж геномна ДНК. В свою чергу важливо відмітити, що апоптична ДНК зазвичай має менші розміри і не перевищує 200 п.н., в той час як мінімальні розміри некротичної пкДНК складають 300 п.н. і більше.

1.2.2. Метилування ДНК як маркер злоякісних новоутворень. Зміни за допомогою метилування є одними з епігенетичних змін, що зустрічаються у хворих на рак. Метилування ДНК – це процес модифікації молекули ДНК без зміни її нуклеотидної послідовності, що є основним механізмом епігенетики. Метилування ДНК полягає в приєднанні метильної групи до С-5 або N-4 позицій цитозину або N-6 позиції аденіну [23]. Вже на ранніх стадіях онкогенезу виявляється гіперметилування промоторних ділянок генів-супресорів пухлин та деяких інших важливих генів. Процеси гіперметилування призводять до зміни транскрипції генів-мішеней, які можуть вплинути на біохімічні процеси, що призводять до розвитку раку. Таким чином, очевидний наступний крок, який полягає у використанні виявлених змін метилування на ДНК сироватки/плазми хворих на рак як інструменту для його ранньої діагностики.

Метилування ДНК зустрічається у всіх основних групах живих організмів, але рівень зазвичай більш високий у еукаріотів. У людини метильовано близько 1% ДНК геному. У соматичних клітинах дорослого організму метилування ДНК зазвичай відбувається в CpG-динуклеотидах, метилування цитозину в складі інших послідовностей зустрічається в ембріональних стовбурових клітинах. Це фізіологічний процес, який відбувається у всіх здорових клітинах. Проте виявлено, що велика кількість захворювань людини пов'язана з метилуванням ДНК. Було показано, що 70–80% CpG-динуклеотидів геному ссавців містять метильований цитозин [24]. CpG-острівці знаходяться переважно в промоторній ділянці багатьох генів, а їх метилування часто асоціюється з замовчуванням

генів. В нормальних соматичних клітинах більшість CpG-острівців не метильовані. Аберрантне метилювання CpG-острівця будь-якого гена-супресора пухлинного росту може призвести до припинення його експресії, сприяючи ініціації та прогресії пухлини.

Численні гени, такі як *APC*, *DAPK*, *GSTP1*, *MGMT*, *p16*, *RASSF1* і *RARβ2*, що були виявлені в якості маркерів метилювання в різних типах раку, були проаналізовані на виділених пкДНК. Аналізи різних варіантів метилювання ДНК різної чутливості також були використані для аналізу метилювання пкДНК [25]. Найбільш часто використовуваним методом є метил-специфічна ПЛР. В цьому аналізі використовують праймери, які специфічно зв'язуються з метильованою пкДНК після обробки бісульфітом натрію. Кількісний варіант цього методу є дуже чутливим і дозволяє виявити 0,1% метильованої ДНК на фоні неметильованої ДНК.

Попередні і поточні світові дослідження зосереджені на порівнянні метилювання ДНК-маркерів в тканинах і сироватці/плазмі та визначенні, таким чином, гіперметилюваних пкДНК-маркерів. В цілому вони показують узгодженість гіперметилювання пкДНК-маркерів. Це узгодження означає, що метилювання лише аберантних маркерів з'являється у хворих з відповідними змінами в первинних пухлинах. Детальний погляд на дані доводить, що деяка неузгодженість визначених позитивних маркерів метилювання, ймовірно, викликана двома основними причинами: неоднорідні зміни маркерів метилювання в різних видах раку і конкретні відмінності між дизайном самих досліджень.

Наприклад аналіз метилювання гена *p16*, рівень якого було перевірено на пкДНК у шести різних дослідженнях, показав аберантне метилювання від 14% до 73%, хоча у всіх дослідженнях використовувався один і той же метод метил-специфічної ПЛР. В той же час в п'яти дослідженнях, пов'язаних з раком товстої кишки, аберантне метилювання *p16* варіювало від 30% до 70% [26]. Використання комбінацій *APC* та *GSTP1* підвищує діагностичну чутливість

детекції раку сечового міхура з 59%, характерних для використання одного гену, до 80% при використанні комбінації цих генів [27].

Таким чином, аналіз попередніх досліджень показав, що для пошуку потенційних маркерів необхідно використовувати декілька критеріїв: 1) проводити дослідження на великих (не менше 50 осіб) вибірках; 2) в контрольних групах повинні враховуватися вікові і статеві ознаки відповідно до досліджуваної групи хворих; 3) по-можливості, визначення статусу метилювання генів проводити паралельно як на пкДНК, так і на ДНК з пухлини і здорової тканини одного і того ж самого пацієнта; 4) усі експерименти в одному дослідженні проводити за однією схемою, використовуючи однакові протоколи і реактиви; 5) проводити визначення метилювання декількох генів одразу, для створення панелі маркерів, аби для кожного зразка виявити мінімум 2–3 гени, метильовані при тому чи іншому типі раку. Всі ці критерії було, по-можливості, використано у представленому дослідженні.

1.2.3. Мікросателітні зміни як маркер злоякісних новоутворень.

Мікросателіти – це ділянки хромосоми, які містять послідовності ДНК з довжиною 1–6 нуклеотиди, що повторюються 1–60 разів у тандемі. Мікросателіти зосереджені по всій довжині геному. Число одиниць повтору мотивів варіюється для різних алелей. Мікросателітні зміни, які часто зустрічаються в пухлинах як наслідок дефекту ДНК при репарації, виявляються методом ПЛР та подальшим аналізом ПЛР-продукту, наприклад, за допомогою електрофорезу. Ці зміни виглядають як втрата гетерозиготності або мікросателітна нестабільність. Нестабільність мікросателітів виявляється через появу нових мікросателітів і визначається як поява нової смуги чи піку при електрофорезі ДНК. Мікросателітні зміни об'єднані під загальною назвою «алельного дисбалансу». Історично склалося, що ці зміни використовувалися тільки в клінічному аналізі як маркери нестабільності геному, але на даний час вважається, що вони безпосередньо пов'язані з пухлинними процесами [28].

У 1996 році були опубліковані численні повідомлення з перших спостережень властивостей пкДНК. Узагальнення досліджень були опубліковані аж у 2007 році та охопили 46 звітів, включаючи дослідження на матеріалі, взятому у хворих, які страждали на рак сечового міхура, молочної залози, товстої кишки, голови і шиї, нирок та підшлункової залози [29].

Оцінка даних, одержаних в усіх цих дослідженнях, показала, що результати визначення мікросателітних змін у сироватці/плазмі були напрочуд різними. Різні результати були отримані для пацієнтів з різними типами пухлин, а також для аналізу одних і тих же типів пухлин. Суперечливі зміни в пухлинних ДНК і пкДНК спостерігалися в діапазоні від 5% до 100% при оцінці даних з десяти досліджень шести різних типів пухлин [30]. Поєднання декількох мікросателітних маркерів призвело до збільшення позитивних виявлень, але значення $>70\%$ зустрічалось рідко. Наприклад, дослідження з 17 мікросателітних маркерів показали зміни між 2,6% і 51%, якщо розглядати один маркер, в той час, як комбінація маркерів показала зміни в 84,5% [31].

Лише в кількох дослідженнях були порівняні клінічна дія мікросателітних змін та інших тестів. Наприклад, у дослідженні пацієнтів з раком простати 70% з цих пацієнтів мали рівень ПСА (простатичний специфічний антиген) <4 нг/мл. Поєднання двох мікросателітних маркерів і одного метильованого маркера збільшили чутливість тесту до 89% [32]. У пацієнтів з олігодендрогліальними пухлинами втрати гетерозиготності на одній хромосомі відповідали виявленню пухлини у 31% пацієнтів. Цей рівень виявлення був збільшений до 55% шляхом об'єднання даних втрати гетерозиготності хромосом і метильованого маркеру [33].

Численні дослідження мікросателітних змін були пов'язані з можливістю використання для прогнозування як біомаркери у пацієнтів з раком молочної залози [34], шлунку [35], легенів [36], печінки [37]. Як і у випадку з іншими маркерами пкДНК, дані досить суперечливі, але в цілому оптимістичні висновки авторів не можуть бути проігноровані. Мікросателітні зміни також використовувалися як предиктивні маркери для правильного вибору лікування.

1.2.4. Втрата гетерозиготності, як поштовх до розвитку пухлини.

Втрата гетерозиготності (loss of heterozygosity, LOH) — це серйозне генетичне порушення, що призводить до втрати всього або частини гена та регіону навколо нього. Усі клітини нашого організму мають різні форми одного і того ж гена, розташовані в однакових ділянках (локусах) гомологічних хромосом, їх називають алелями. У диплоїдному організмі може бути два однакових алелі одного гена, в цьому випадку організм називається гомозиготним, або два різних, що призводить до гетерозиготності організму. У всіх диплоїдних клітинах кожна хромосома має свою гомологічну пару, одна передається від матері, інша від батька. Кожна хромосома містить приблизно 3 мільярди азотистих основ (аденін (A), гуанін (G), цитозин (C) або тимін (T)). У різних організмів кількість та черговість основ є різною, однак невеликий відсоток людського геному містить ділянки на яких повторюється та чи інша комбінація основ. Ці позиції називаються одонуклеотидними поліморфізмами або SNP. Коли у алелях, отриманих від кожного з батьків, наявні різні SNP, область вважається гетерозиготною. Під час дії онкогенних факторів одна з батьківських копій втрачається, що призводить до того, що залишається лише одна алель. Алельний дисбаланс може бути результатом алельних делецій, дуплікацій чи ампліфікацій одного з алелей. В результаті чого один алельний екземпляр SNP не може бути гетерозиготним, і тому в регіоні спостерігається втрата гетерозиготності [38]. Як генетичний маркер мікросателіти можуть широко застосовуватися для вирішення численних типів різних завдань. До них належить побудова генетичних груп зв'язків та інтегрованих карт; аналізи батьківства та/або походження; оцінка потоку генів та сорту/чистоти насіння; розведення за допомогою селекційних інструментів, що допомагають маркерам; оцінка генетичного різноманіття, філогеографії, збереження та відновлення біорізноманіття, молекулярної еволюції, систематики та філогенетичних особливостей біологічних видів; виявлення генетичної структури місцевих рослинних популяцій та зародкової культури, походження та одомашнення видів сільськогосподарських культур, міграція, демографічний процес, диференціація

чи споріднення популяцій; оцінка впливу мутагенних забруднень; та застосування у криміналістиці та діагностиці захворювань [39].

Мікросателіти (short tandem repeats, STRs), як правило, складаються з гомогенного набору моно-, ди-, три-, тетра-, пента- та гексануклеотидних мотивів, які не випадково розташовані по всьому геному і сильно різняться в різних областях геному та в різних таксонах. Мікросателіти можна знайти в некодуючих частинах геному: інтрони, нетрансльовані області UTR, міжгенні простори; рідше у кодуючих: екзонних областях. Характер і закономірності розподілення в геномі мікросателітів має особливий інтерес завдяки ролі, яку вони грають в розвитку онкологічних захворювань [40]. З розвитком деяких пухлинних захворювань пов'язана нестабільність мікросателітів, розташованих біля генів, що приймають участь у канцерогенезі. Будь-яка мікросателітна нестабільність в кодуючих областях призводять до зміни рамки зчитування, з подальшою інактивацією трансляції чи синтезом урізаних, функціонально порушених білків [41].

Втрата гетерозиготності є поширеним явищем при злоякісних пухлинах, що вказує на відсутність функціонального гена-супресора пухлини втраченої області. Проте, організм залишається здоровим, так як зберігається функціональний аллель на іншій хромосомі. Копія, що залишилася можна інактивувати точкової мутацією, тим самим позбавляючи захисту організму. Втрата гетерозиготності не означає гомозиготний стан організму.

Один з способів, що розвивається у сфері діагностики раку є ДНК-тестування з використанням мікросателітних маркерів для детекції втрати гетерозиготності. В основі цього тестування лежить порівняння окремих генетичних локусів у зразку; у типовій обставині кожен з батьків буде вносити різні гени в локусі, які при гібридизації з відповідними зондами ДНК будуть присутні як смуги двох різних розмірів (наприклад, гетерозиготних). У багатьох випадках раку, з-за основних дефектів, спостерігається втрата одного батьківського алелю, який був би представлений як ЛОН на досліджуваному локусі [42]–[44].

1.2.5. Індекс цілісності позаклітинної ДНК та його використання для діагностики раку. Як згадувалося раніше, пкДНК утворюється внаслідок апоптозу та/або некрозу клітин. Фрагменти ДНК, що вивільняються з апоптичних клітин, мають рівномірний розподіл за розмірами від 185 до 200 п.н. в результаті запрограмованого ферментативного розщеплення ДНК під час апоптозу [29]. В зразках плазми хворих зі злоякісними пухлинами було виявлено більш високе відношення фрагментів β -актину з довжиною 400 п.н. до тих самих, з довжиною 100 п.н., у порівнянні зі зразками умовно здорових пацієнтів. На підставі цього факту було введено таке поняття, як «індекс цілісності ДНК», що був запропонований для характеристики походження пкДНК. Вважається, що ДНК, яка походить з некротичних клітин, складається з пропорційно довших фрагментів, ніж ДНК здорових пацієнтів. Надалі для визначення індексу цілісності пкДНК, використовують реакції ПЛР, націлені на різні гени з розмірами фрагментів від 201 до 618 п.н. для більших фрагментів, та розміром від 100 до 200 п.н. – для коротких фрагментів (45–54).

Існує деяка плутанина в літературі тому, що термін «індекс цілісності» використовується як для визначення відношення довгих фрагментів ДНК до коротких фрагментів, так і для зворотнього співвідношення. В інших дослідженнях, відношення коротких фрагментів до довгих, позначається як «індекс апоптозу». Цей показник був використаний як для діагностичних, так і для прогностичних цілей при деяких типах раку. Перше дослідження Ванга та ін. [58], які порівняли діагностичну ефективність індексу цілісності та загальної концентрації пкДНК у 61 пацієнта з різними типами пухлинних захворювань і 65 пацієнтів без раку, показало істотно вищу концентрацію під ROC-кривою, що становила 0,911 для індексу цілісності ДНК у порівнянні з 0,71 для пкДНК. Хворі на рак мають середній індекс цілісності 0,66, у той час як контроль мав індекс тільки 0,14. Схожі дані були представлені для пацієнтів з раком молочної залози [52], товстої кишки [46], стравоходу [51], простати [59], голови і шиї [60], нирки [53] та носоглотки [61]. Для хворих на рак передміхурової залози є два

інші дослідження з суперечливими даними [62], [63]. У першому дослідженні не виявлено зв'язку між різницею в розмірі пкДНК та раком [63], в той час як інше описує зворотню ситуацію з високою частотою коротких апоптичних фрагментів ДНК [62]. На відміну від інших досліджень з підвищеним індексом цілісності для онкологічних хворих, ця робоча група також повідомила про зворотне співвідношення довгого до короткого фрагменту пкДНК в сечовому міхурі і яєчках у онкологічних хворих [45]. Дві інші доповіді, що порівнюють індекс цілісності пкДНК у пацієнтів з раком легень і доброякісними захворюваннями легень [50], а також у пацієнтів з різними формами раку і відповідними доброякісними захворюваннями [54] дійшли до висновку, що ніяких значних відмінностей в індексі цілісності між групами не було.

Прогностична цінність індексу цілісності була показана в обмеженій кількості робіт [45], [50], [52], [61], [62]. Індекс цілісності був єдиним передопераційним предвісником лімфоїдних метастазів у пацієнтів з раком молочної залози в багатовимірному логістичному аналізі, який включав звичайні фактори ризику, такі як розмір пухлини, гістологічний клас і статус рецепторів на додаток до індексу цілісності пкДНК [46]. Пацієнти з назофарингіальною карциномою, які піддавалися променевій терапії і в яких згодом зменшувався індекс цілісності, мали кращий відсоток виживання ніж ті, в яких був сталий індекс після лікування [61]. Ті ж самі вищезгадані робочі групи [46] виявили також короткі ДНК-фрагменти апоптичного походження, що були більш інформативні для діагностики та прогнозування раку передміхурової залози, ніж більші фрагменти неапоптичного походження ДНК, в той час як інші спостерігали більшу клінічну ефективність, використовуючи довші фрагменти для виявлення ранніх стадій раку молочної залози [51] та для моніторингу хіміотерапевтичного втручання [51].

Таким чином, індекс цілісності, очевидно, залежить від різних типів раку, а також від досліджень, що виконуються для одного типу раку. Однак, на додаток до цього, не можна виключати похибки у відборі досліджуваних груп, тому що

індекс цілісності також пов'язаний з преаналітичними та аналітичними факторами [50], [54].

1.3. Характеристика генів-супресорів пухлин

Гени, що пригнічують пухлину – це нормальні гени, які уповільнюють ділення клітин, виправляють помилки ДНК або сигналізують клітинам про необхідність загибелі (процес, відомий як апоптоз або запрограмована загибель клітини). Коли гени-супресори пухлини не працюють належним чином, клітини можуть рости без контролю, що може призвести до розвитку раку. Ген-супресор пухлини, як правило, утримує клітину від занадто швидкого поділу і в разі порушень у роботі такого геа (наприклад, мутації), поділ клітин може вийти з-під контролю.

Важливою відмінністю між онкогенами і генами-супресорами пухлини є те, що онкогени є результатом активації (включення) прото-онкогенів, але гени-супресори пухлини викликають рак, коли вони інактивовані (вимкнені).

У деяких сімейних ракових синдромах були виявлені спадкові відхилення генів супресорів пухлини. Вони змушують певні типи раку запускатися в сім'ях. Але більшість мутацій генів-супресорів пухлин купуються, а не передаються у спадок. Багато генетичних досліджень різних видів раку виявили гени, зміни в яких сприяють зростанню злоякісних клітин [64]–[66]. У 1971 році американський дослідник Альфред Надсон-молодший висунув припущення, що рідкісна форма раку очей називається ретинобластома спричинена мутаціями позначеного гена RB. Подальші дослідження показали, що мутації цього гена також відіграють певну роль при раку кісток, легенів, молочної залози, шийки матки, простати та сечового міхура. В подальшому було ідентифіковано ряд інших генів-супресорів пухлини (таких як TP53, який кодує білок, відомий як p53). Роль мутованої форми TP53 була показана у більш ніж у 50 відсотків усіх видів раку. Мутації в двох інших генах-супресорах пухлини, BRCA1 та BRCA2,

пов'язані з підвищеною сприйнятливістю до раку молочної залози; вони виявляються в 5%–10% відсотках усіх випадків і приблизно в 85% усіх випадків спадкового раку молочної залози [67], [68].

Дві основні властивості ракових клітин – неконтрольований ріст клітин і здатність вторгатись в інші тканини, – є результатом цих генетичних та епігенетичних порушень. Генетичні порушення включають генетичні мутації, геномну нестабільність, втрату гетерозиготності (LOH) та варіацію числа копій генів (CNV). Навпаки, епігенетичні зміни включають модифікації гістонів, метилювання ДНК та втрату імпринтингу (LOI). Ці модифікації регулюють експресію генів, не змінюючи основної послідовності нуклеотидів [69], [70].

Ген *GPX3*. Нормальні клітини містять антиоксидантні системи, які захищають клітини від пошкоджень та пошкоджень ДНК, індукованих активними формами кисню. Серед цих систем родина глутатіонпероксидаз (glutathione peroxidase family – GPX) є одним з основних сімейств ферментів з антиоксидантною дією, що сприяє зменшенню кількості пероксидів ліпідів, пероксиду водню та органічного пероксиду шляхом відновлення глутатіону [71]. Ген *GPX3* локалізований на хромосомі 5q32 і є єдиним відомим позаклітинним глікозилізованим ферментом серед родини GPX, що може використовувати тіоредоксин, глутаредоксин та глутатеонін в якості донорів електронів для зменшення рівню гідропероксидів. мРНК гену *GPX3* експресується в різних нормальних тканинах людини, включаючи нирки, молочну залозу, серце, легені, мозок та шлунково-кишковий тракт. Проте, більша частина *GPX3* крові має ниркове походження [72]. Знижена активність промотора *GPX3* в результаті метилювання була виявлена для декількох ракових захворювань, таких як рак простати, стравоходу та сечового міхура. Припускається, що *GPX3* виконує роль супресора пухлин для цих видів онкологічних захворювань [73]. Проте роль та клінічне значення *GPX3* при НКК залишаються невідомими.

Ген *APC*. Ген аденоматозного поліпозу кишківника (adenomatous polyposis coli), який розташований на хромосомі 5 людини (локус 5p21-5p22). Ген *APC* є ключовим геном пухлинної супресії. Мутації в ньому були виявлені не тільки у

випадку раку товстої кишки, але і при деяких інших видах раку, в тому числі раку нирок. Продуктом гена *APC* є білок масою 312 кДа. Він складається з декількох доменів, за допомогою яких зв'язується з різними білками, в тому числі *beta-catenin*, *axin*, *CtBP*, *Asefs*, *IQGAP1*, *EB1* і білками мікротрубочок. Дослідження з використанням мутантних мишей і культивованих клітин продемонстрували, що *APC* пригнічує передачу сигналіngu Wnt-шляху, які необхідні для пухлинного розвитку та гомеостазу епітеліальних і лімфоїдних клітин. Подальші дослідження показали, що *APC* грає роль у декількох інших основних клітинних процесах. До них відносяться клітинна адгезія та міграція, організація актину і мікротрубочкових мереж і сегрегація хромосом. Дерегулювання цих процесів, викликаних мутаціями в *APC*, бере участь в ініціації і розширення раку товстої кишки [74]–[76].

Ген *LRRC3B*. При визначенні генетичних та епігенетичних змін хромосоми 3 людини при світлоклітинній карциномі нирки з використанням *NotI*-технології мікрочіпів одним з генів, для якого було ідентифіковано найбільший відсоток змін – 56,5% – був ген *LRRC3B* (leucine-rich repeat containing 3B) [77]. Ген *LRRC3B* розташований на довгому плечі хромосоми 3 (локус 3p24), а його кДНК, що складається з 1718 п.н., кодує 259 амінокислот. *LRRC3B* є трансмембранним білком, що містить еволюційно високо консервативний лейцин-багатий повтор [78].

Хоча функцію *LRRC3B* на даний час повністю не з'ясована, відомо, що *LRR*-вмісні білки беруть участь у багатьох клітинних процесах, таких як забезпечення імунної відповіді, клітинна адгезія, сигнальна трансдукція та апоптоз [79]. Також слід відмітити, що біоінформатичний аналіз показав, що продукція гена *LRRC3B* регулюється метилуванням ДНК і він експресується на високому рівні в нормальних тканинах, в той час, як в багатьох уражених раком тканинах його рівень значно зменшується [78], [80], [81].

Ген *RASSF1*. Загалом суперсімейство Ras малих ГТФ-зв'язуючих білків відіграє вирішальну роль у внутрішньоклітинних шляхах передачі сигналу, головним чином в активації *MAPK* каскаду [82].

Ген *RASSF1* (Ras association domain family 1) розташований на довгому плечі хромосоми 3 (локус 3p21.3) та має вісім екзонів (1 α , 1 β , 2 $\alpha\beta$, 2 γ , 3, 4, 5 і 6). *RASSF1* – досить добре вивчений ген-супресор, який може впливати на клітинний цикл, динаміку тубуліну, апоптоз та стабілізацію мікротрубочок [83]. Існує сім різних ізоформ *RASSF1*, які утворюються завдяки диференціальному використанню двох промоторів, відстань між якими складає 3,5 т.п.н., та альтернативному сплайсингу. На сьогодні встановлена біологічна роль лише двох білкових ізоформ - *RASSF1A* і *RASSF1C*, що є основними ізофрамами гена *RASSF1*. Вони містять домени RA, SARAH та ATM. *RASSF1A* має ще додатковий домен C1. Ізоформа A транскрибується від верхнього промотора, а ізоформа C — від нижнього промотора. Обидві промоторні ділянки містять незалежні CpG-острівці. Було виявлено, що гіперметилування першого промотора асоційовано із виникненням різних типів пухлин [81], [84]–[90].

Ген *PCDH8*. Протокадгерини (PCDH) - це велика група адгезійних і сигнальних білків трансмембранних клітин сімейства кадгеринів, що залежать від кальцію [91]. PCDHs мають різні молекулярні функції в клітині, приймаючи участь у клітинній адгезії, міграції, інвазії, ангіогенезі та клітинному сигналінгу [91]–[96]. *PCDH8* відноситься до некластерних кадгеринів і разом з іншими протокадгеринами (*PCDH10*, *PCDH12*, *PCDH17*, *PCDH18* and *PCDH19*) входить до підгрупи *PCDH 82*, [97]. Цей ген відіграє роль супресора пухлиногенезу при багатьох видах раку, включаючи рак яєчників [98], гліому [95], рак печінки [99], карциному носоглотки [100] та плоскоклітинну карциному стравоходу [96]. Було продемонстровано, що PCDH проявляють функції, що пригнічують і сприяють розвитку пухлини [98], [101], [102]. Все більше доказів показує, що гіперметилування CpG-острівця промоторної ділянки *PCDH8* є ключовою подією, що призводить до мовчання або зменшення транскрипції та висувається в якості маркерів пухлиногенезу, в тому числі і раку нирки [94], [98], [99], [103]. В декількох дослідженнях було показано зв'язок зниженої експресії та

гіперметилування *PCDH8* з поганим прогнозом для хворих з онкологічними захворюваннями [98], [99], [101].

Ген *VHL*. Ген *VHL* було ідентифіковано у 1993 році при вивченні хвороби Гіппеля-Ліндау (Von Hippel-Lindau), прогресія якої пов'язана з утворенням злоякісних та доброякісних пухлин та цист в різних частинах тіла. Найчастіше при захворюванні уражаються такі органи, як наднирники, нирки, очі та центральна нервова система. Особливо часто порушення функцій цього гену зустрічається у пацієнтів з нирково-клітинним раком [104]. Ген *VHL*, що має розмір 10 т.п.н., розташований на короткому плечі хромосоми 3 (локус 3p25.3) і складається з 3 екзонів, які кодують 213 та 160 амінокислот, в результаті чого утворюються дві ізоформи білка VHL розміром 30 кДа (pVHL30) та 19 кДа (pVHL19), що генеруються шляхом альтернативної трансляційної ініціації внутрішнього метіоніну в позиції 54. Було показано, що обидві ізоформи пригнічують утворення пухлин і обидві можуть регулюватися за допомогою індукованого гіпоксією фактору альфа (Hypoxia-inducible factors, HIF-1 α ,) [105]. Найкраще охарактеризованою функцією pVHL є його роль у киснево-опосередкованому шляху (oxygen-sensing pathway). Пацієнти з синдромом Гіппеля-Ліндау дуже схильні до утворення пухлин, тому що вони вже мають один мутантний алель *VHL* у всіх клітинах. Випадкова інактивація другої алелі здатна ініціювати неопластичний ріст. Нирки пацієнтів з синдромом Гіппеля-Ліндау містять тисячі клітин, в яких порушена функція pVHL [106], [107]. Інактивація гена *VHL* була продемонстрована у 57% пацієнтів з спорадичним НКК і у 100% зі спадковим НКК. Ген *VHL* інактивується за допомогою різних механізмів, включаючи геномні мутації (50–80%), мікросателітні зміни (60–80%) та аномальне метилування ДНК (20–25%) [108]. Інактивація гена *VHL* сприяє виживанню та росту ракових клітин через mTOR шлях (mammalian target of rapamycin), що регулюється PI3K шляхом (phosphatidylinositol 3-kinase). В свою чергу, накопичений HIF індукує активацію транскрипції широкого спектру чинників, які регулюють ангіогенез (VEGF), клітинний цикл та ріст (PDGF), а також рН-баланс (CAIX) [109].

Існують дані про те, що мутації, які призводять до виникнення НКК, обумовлені порушенням регуляції HIF. Наприклад, це може бути обумовлене виникненням мутацій в HIF-зв'язуючому домені [110]. Було визначено, що ризик виникнення НКК залежить від типу мутацій, яка визначається амінокислотою, що була заміщена. Наприклад, для 2A типу мутацій pTyr98His і pTyr112His характерний нижчий рівень ризику виникнення НКК, ніж для інших мутацій цієї ділянки. Вважається що це пов'язано з тим, що заміни гістидину мають менший дестабілізуючий вплив і спричиняють меншу дисрегуляцію HIF, що в свою чергу менше призводить до розвитку НКК, ніж заміни інших амінокислот, заміщені в тому ж місці [110].

Ген *CDKN2A*. Ген *CDKN2A* розташований в локусі хромосоми 9p21, який є інтригуючим з кількох причин. По-перше, цей регіон добре відомий в генетиці раку як одне з найбільш поширених місць делеції, що призводить до спадкових форм шкірної злоякісної меланоми [111]. По-друге, дослідження геному повідомляли про значну асоціацію змін хромосоми 9p21 з ішемічною хворобою серця та інфарктом міокарда, а також прогресування атеросклерозу [112].

Ген *CDKN2A* (інгібітор 2A циклін-залежної кінази) контролює синтез декількох білків [113]. Найбільш добре вивчені білки p16 (INK4A) та p14 (ARF) (Рис. 1.1) [114]. Обидва функціонують в якості пухлинних супресорів, тобто оберігають клітини від швидкого або неконтрольованого росту та ділення. Вони також беруть участь у зупинці поділу клітин під час старіння.

Білок p16 (INK4A) зв'язується з двома іншими білками, CDK4 і CDK6. Ці два білки зазвичай регулюють G1 фазу клітинного циклу, що стимулює клітину до подальшого поділу. Однак зв'язування p16 (INK4A) блокує здатність CDK4 та CDK6 стимулювати прогресування клітинного циклу. Таким чином, p16 (INK4A) контролює поділ клітин. Клітини починають продукувати p16 (INK4A), коли вони більше не здатні піддаватися клітинному поділу.

Білок p14 (ARF) захищає білок p53, від розпаду. Білок p53 є важливим супресором пухлин, який є необхідним для регулювання поділу клітин, старіння та самодеструкції (апоптоз). За допомогою захисту p53, p14 (ARF) також

допомагає запобігти утворенню пухлини. Білки p14 (ARF) і p53 часто виробляються в клітинах, які не можуть пройти ділення клітин [114].

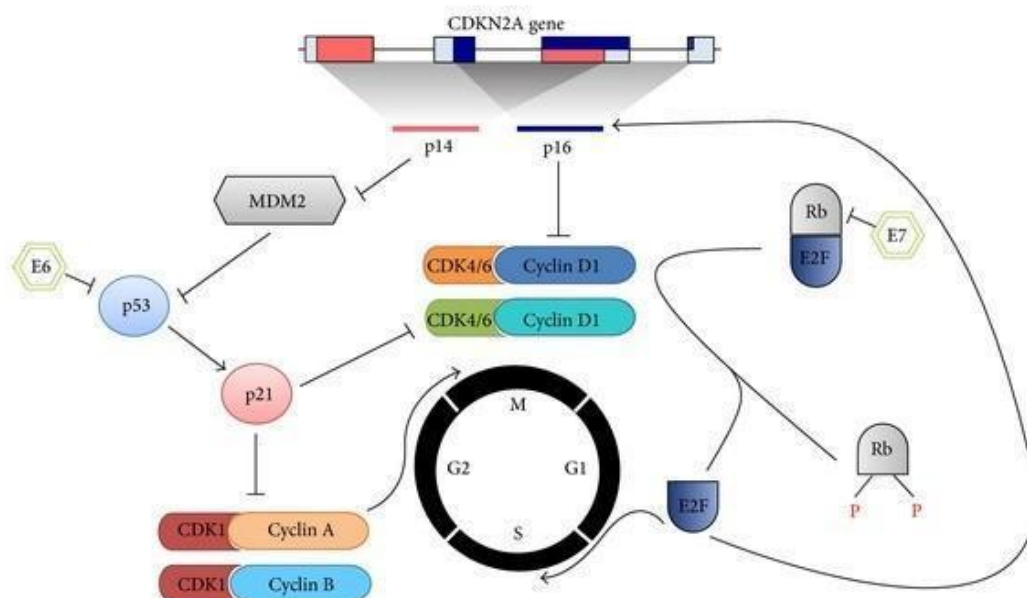


Рис. 1.1. Функції білків $p14^{ARF}$ та $p16$ альтернативного зчитування гена $CDKN2A$ за А. Al-Kaabi, 2014.

Зміни в статусі локусу гена $CDKN2A$ сильно варіюють залежно від типу раку. На додаток до раку шкіри, такого як меланома, зміни $CDKN2A$ були описані в широкому спектрі типів раку, таких як лімфома шлунка, лімфома Беркітта, плоскоклітинний рак голови і шиї, рак ротової порожнини, аденокарцинома підшлункової залози, недрібноклітинна карцинома легенів, плоскоклітинний рак стравоходу, рак шлунка, колоректальний рак, епітеліальна карцинома яєчників, рак простати та нирки [42], [112], [115], [116].

Ген-супресор $TIMP3$. Поряд з мутаціями попередніх генів ($CDKN2A$ і VHL) в цілому ряді пухлин метильований ген-супресор $TIMP3$ (TIMP metallo peptidase inhibitor 3). Білок, який кодується цим геном, є інгібітором матриксних металопротеїназ, бере участь у міжклітинних взаємодіях і індукції апоптозу, може пригнічувати ріст пухлин, а також ангіогенез і метастазування [117].

Інактивація цього гена виявляється у різних злоякісних новоутвореннях людини, включаючи рак нирки. Припускають, що інактивація гена *TIMP3* може відбуватися в результаті гіперметилування CpG-острівців промоторної області, що спостерігається з частотою від 13 до 78% в пухлинах різної локалізації і на різних етапах їх злоякісного переродження. У ряді робіт повідомлялося, що епігенетичні зміни цього гена можуть використовуватися як діагностичний і прогностичний маркер [118], [119], тим не менш, для раку нирки дані отримані на невеликих вибірках і потребують подальших досліджень [120]–[123].

Ген-супресор *RUNX3*. Ген-супресор пухлин *RUNX3* кодує Runt-пов'язаний фактор транскрипції, який є частиною сімейства генів Runx. *RUNX3* потрібен для розвитку CD8 Т-клітин впродовж тімопоезу; має основну роль у визначенні дорзовентрального проекційного паттерну пропріоцептивних і шкірних сенсорних нейронів; відіграє певну роль у формуванні кісткової тканини; знаходиться в мезенхімальних елементах епідермальних придатків; і контролює правильний розвиток шлункових ендотеліальних клітин шляхом апоптозу. Він також діє як ген-супресор пухлин [124](огляд по Cohen, 2009). У дослідженнях 2002 року Li et al. було показано, що у пухлинних та клітинних лініях раку шлунку рівень експресії гена падає за рахунок делеції та/або метилування [125], [126]. Пізніше іншими авторами було показано, що *RUNX3* також інактивується в різних типах інвазивних і пре-інвазивних епітеліальних і мезенхімальних пухлин [127], [128]. *RUNX3* сприяє онкогенезу і метастазуванню на різних рівнях, таких як EMT (Voon et al, 2012), адгезія (Chen et al, 2013), міграція та інвазія (Sakakura et al, 2005). Однак механізми впливу *RUNX3* в онкогенезі і прогресії метастаз поки ще не ясні та потребують подальших досліджень. Проте багато досліджень показали гіперметилування CpG-острівця промотора гена *RUNX3* в пухлинах різних тканин, що впливає на зниження його експресії і пригнічення впливу [129]–[133], в тому числі і в пухлинах світло-клітинного раку нирки [127].

1.4. Характеристика мікроРНК

МікроРНК є нещодавно визначеними посттрансляційними регуляторами біосинтезу білка на рівні мРНК. Перша мікроРНК була відкрита у *Caenorhabditis elegans* у лабораторії Віктора Амрос в 1993. В той же час Гарі Рувкун відкрив першу мРНК, що зв'язувалась з мікроРНК [134]. З цього часу відкрито більше 1900 різних мікроРНК, 300 з яких було знайдено в тканинах серця [135].

Дані молекули синтезуються РНК-полімеразою II з утворенням первинної мікроРНК (pri-miRNA), що містить динуклеотидне стебло зі шпилькою на кінці. Первинний транскрипт піддається модифікаціям першим мікропроцесорним комплексом, до складу якого входить білок з нуклеазною активністю Drosha. В результаті утворюється вкорочена послідовність (біля 70 нуклеотидів), прекурсорна мікроРНК (pre-miRNA) з стебло та шпилькою в центрі послідовності. В такому вигляді молекула транспортується в цитозоль за рахунок Експортину 5, де Dicer (мікроРНК специфічна нуклеаза) вкорочує РНК до близько 22 нуклеотидів [136]. Безпосередній контакт з мРНК утворює 18-25-нуклеотидний кінець (5' або 3', за якими власне мікроРНК і розподіляється на 3p та 5p) розщепленої прекурсорної мікроРНК. Повністю процесована мікроРНК зв'язується з комплексом RISC через білки родини Аргонавтів (AGO).

МікроРНК не можуть працювати самотійно, тому вони функціонують в RISC комплексі після збірки з білками Арогнавт'ами. Механізм, що регулює утворення RISC, є вирішальним для функціонування мікроРНК. Збірка RISC не є простою взаємодією між РНК і AGO, а скоріше слідує впорядкованому шляху, який поділяється на щонайменше два етапи: завантаження і дозрівання. Збірка RISC починається з дуплексного завантаження, в якому дуплекси miRNA/miRNA* (тобто 3' та 5' кінець відносно шпильки, яка була видалена на попередніх етапах) завантажуються в AGO [137]. Отриманий комплекс, що містить AGO і дуплекс мікроРНК, називається «пре-RISC». Дозрівання RISC може бути розділене на два етапи: заклинювання і викид пасажирів (пасажиром

зазвичай називають ланцюг дуплексу мікроРНК, який не бере участь у зв'язуванні мРНК).

При заклинюванні один кінець дуплексу відкритий N домену AGO. Сканування аланіну N-домену людського Ago2, показало, що N-домен є критичним для викиду пасажера з дуплексів miRNA/miRNA*, але не для попереднього завантаження. Слід зазначити, що структурні дослідження прокаріотичних білків AGO показали, що відносне положення домену динамічно змінюється в залежності від станів спарювання основ [138]. Таким чином, після дуплексного завантаження, N-домен, ймовірно, повертається з зовнішнього положення до кінця дуплексу, тим самим порушуючи спарювання кількох пар основ на 3'-кінці основного ланцюга мікроРНК; така конформація необхідна для послідовного викиду пасажирського ланцюга [139].

Останнім кроком є викид пасажера, в якому два короткі ланцюги РНК відокремлені і пасажирський ланцюг викидається з AGO. Даний процес зазвичай відбувається за рахунок ендонуклеазної активності аргонавта: пасажирська РНК розщеплюється по центрі, відповідно, дестабілізується її зв'язок з іншим ланцюгом. Комплекс, що містить AGO і одноланцюгову мікроРНК, називається просто «RISC» або в деяких випадках «зрілий RISC» або «холо-RISC» [139]. Дуплекси miRNA/miRNA* часто мають невідповідності у своїх центральних областях, що перешкоджає AGO розщеплювати один з ланцюгів. Проте білки AGO можуть повільно відокремлювати два кінці мікроРНК за відсутності розщеплення пасажирського ланцюга. Таке виштовхування пасажирської нитки різко прискорюється за існування невідповідностей у конкретних регіонах [140].

Регулярність сортування мікроРНК на різні білки AGO в клітинах ссавців недостатньо вивчена. Спочатку вважалося, що мікроРНК випадковим чином зв'язується з окремими AGO. Разом з тим, РНК-секвенування AGO1, AGO2 і AGO3 пов'язаних мікроРНК довело, що деякі мікроРНК можуть мати значно вищу спорідненість до конкретного AGO [141].

Дуплексне завантаження мікроРНК вимагає гідролізу АТФ у тварин і рослин. Вважається, що енергія АТФ використовується для ініціювання

конформаційної зміни білків AGO, щоб вони могли завантажувати дуплекси. Цей процес опосередкований механізмом з шаперонами Hsc70/Hsp90, який, як відомо, підтримує не тільки згортання, але й активацію/дозрівання білків за рахунок енергії АТФ [142], [143].

У дрізофіл і людей білки AGO локалізуються в немембранних структурах, таких як Р-тіла і/або мембранні органели, такі як ендоплазматичний ретикулум (ER), мультивезикулярні тіла (MVB) і апарат Гольджі [144]. Локалізація білків AGO в ER також спостерігається у рослин. Було висловлено припущення, що локалізація білків AGO в Р-тілах є не дозволяє ефективно зв'язуватись з утворенням RISC; відсутність Р-тіл не впливає на мікроРНК-опосередковану деградацію мРНК. З іншого боку, локалізація AGO в ER і MVB, як повідомляється, має потенційний вплив на деградацію мРНК, ймовірно, через регулювання органелами збірки RISC [145].

Створений комплекс RISC комплементарно (за рахунок послідовності мікроРНК) з'єднується з мРНК в зоні 3'-UTR, що призводить або до деградації мРНК (за повної комплементарності мікроРНК та мРНК), або до пригнічення синтезу білка на відповідній матриці.

Оскільки, мікроРНК може одночасно регулювати експресію сотень генів, вчені припускають, що до 30% білок-кодуючих генів людини піддаються регуляції з боку цієї нуклеїнової кислоти. Таким чином, їх механізм дії дозволяє впливати на безліч важливих біологічних і клітинних процесів включаючи апоптоз, диференціацію, проліферація, метаболізм і трансдукцію сигналу [146]. Дисрегуляція синтезу мікроРНК часто пов'язана з розвитком різних хвороб людини, в тому числі і таких розповсюджених як рак [147], діабет [148] та серцево-судинні захворювання [149].

miR-138-1-3p. Ген мікроРНК hsa-miR-138-1 розташований на хромосомі 3 людини у ділянці 3p21 та регулює багато генів у клітині, впливаючи на її диференціацію, апоптоз тощо (Таблиця 1.1).

Найцікавішою особливістю данної мікроРНК є те, що її експресія регулюється транскрипційним фактором p53 [150]. Експресія miR-138 знижується в різних типах раку, таких як анапластична карцинома щитовидної залози, недрібноклітинний рак легень, карцинома жовчного міхура, гліобластома та пероральний плоскоклітинний рак, що говорить про онкосупресорні властивості цієї РНК [151]–[155]. Зміна експресії мікроРНК з родини miR-138 також спостерігали в клітинних лініях та пухлинах світлоклітинного раку нирки [156]–[158].

МікроРНК miR-138 сприяє апоптозу ракових клітин шляхом регулювання декількох відповідних ефекторів. Стійкість до CD95-опосередкованого апоптозу є важливим характером хронічних лімфоцитарних лейкозів. Більш того, miR-138 активує зовнішній шлях апоптозу з активною каспазою-8 і внутрішній шлях апоптозу, включаючи каспазу-3, Вах і Bcl-2.10. Доведено, що miR-138 негативно впливає на здатність до клітинної міграції, зв'язуючись з мРНК проонкегенного білка TWIST2, що залучений в епітеліально-мезенхімальну трансформацію клітин (EMT) [159]. Крім того, miR-138 може підвищувати рівень індукованого хіміотерапією апоптозу, який діє як супресор пухлини. У клітинах MG-63 і U2OS підвищена експресія miR-138 значно підвищує активність каспази-3, ключового ефектора клітинного апоптозу шляхом спрямування на EZH2, та посилює чутливість остеосаркоми до цисплатину [160].

Таблиця 1.1

Найбільш сприятливі мішені для miR-138-1, підібрані за допомогою сервісу TargetScanHuman

Таргетний ген	Протеїн
<i>ZNF428</i>	Цинковий палець 428
<i>FIP1L1</i>	Фактор взаємодії з PAPOLA та CPSF1
<i>CLEC1A</i>	С-тип лектинового домену сім'ї 1
<i>FAM162A</i>	Родина з послідовністю подібності 162
<i>OR56A1</i>	Нюховий рецептор родини 56
<i>EVA1A</i>	eva-1 гомолог

miR-181a-5p. Родина miR-181 включає чотири мікроРНК (miR-181a / b / c / d). miR-181a і miR-181b транскрибуються з двох розділених локусів гена (miR-181a-1 / miR181b-1 і miR-181a-2 / miR-181b-2), тоді як miR-181c і miR-181d транскрибуються з іншого локусу [161]. Виявлено, що у пацієнтів з резистентним до цисплатину недрібноклітинним раком легень експресія miR-181 помітно знижена. Крім того, в резистентних до цисплатину клітинних лініях аденокарциноми легень A549/DDP, зниження експресії miR-181 сприяло росту клітин і метастазуванню та пригніченню клітинний апоптоз, тоді як гіперекспресія miR-181 мала протилежні ефекти [162].

Члени родини miR-181 виявилися досить гомологічними і можуть однаково впливати на експресію одних і тих самих генів (Таблиця 1.2). Цікаво, що основними мішенями для даної мікро РНК є білки, які містять структуру цинкового пальця. Велика кількість генів родини *ZNF* (білки з цинковими пальцями) негативно регулювалися в клітинах з високою експресією miR-181 порівняно з контрольними клітинами, де такого ефекту не спостерігалось. Фактично, більше десяти відсотків генів *ZNF* (50/451) були інгібовані. Це явище не викликалось експресією інших мікроРНК [163].

Таблиця 1.2

Найбільш сприятливі мішені для miR-181, підібрані за допомогою сервісу TargetScanHuman

Таргетний ген	Білок
<i>ZNF780B</i>	Білок цинкового пальця 780B
<i>ZNF594</i>	Білок цинкового пальця 594
<i>ZNF788</i>	Білок цинкового пальця родини 788
<i>ZNF781</i>	Білок цинкового пальця 781
<i>ZNF471</i>	Білок цинкового пальця 471
<i>ZFP14</i>	ZFP14 білок цинкового пальця

мікроРНК-30. Сімейство мікроРНК-30, що містить п'ять членів і шість різних кінцевих мікроРНК (мікроРНК-30a, -30b, -30c-1, -30c-2, -30d, -30e) кодується шістьма генами, розташованими на хромосомах людини 1, 6 і 8 [164]. Ці мікроРНК мають консенсусну послідовність, розташовану поблизу 5'-кінця, але мають різні компенсаторні послідовності, розташовані поблизу 3'-кінця. Відмінності в компенсаторних послідовностях дозволяють членам сімейства мікроРНК-30 націлюватися на різні гени і шляхи, що іноді призводять до абсолютно протилежної поведінки [165]. Дослідження показують, що члени сім'ї мікроРНК-30, або як пухлино-супресорні мікроРНК, або як онко-мікроРНК, займають місце функціонального центру мережі сигналів мікроРНК, залучених до онкогенезу та інвазії в різних типах пухлин [166], в т.ч. паталогій нирки [167], [168].

МікроРНК-30a була ідентифікована як фактор антиметастазування в різних пухлинах (169). Деякі дослідження показали, що члени сімейства мікроРНК-30 сприяли хіміорезистентності та / або сприяли апоптозу ракових клітин. Ці дані пізніше були підтверджені при раку простати, пухлини молочної залози, скННК і гострої мієлоїдної лейкемії [168], [172]–[176].

miR-200a-3p. Сімейство miR-200, що включає miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141 та miR-429, бере участь у декількох різних аспектах біології раку, включаючи епітеліально мезенхімальний перехід (ЕМТ), ангіогенез пухлини та стійкість до хіміотерапії. Ці властивості здаються зумовлені тим, що члени родини miR-200 регулюють експресію деяких важливих генів-мішеней [170], [177].

Показано, що надекспресія miR-200a веде до пригнічення ЕМТ шляхом безпосереднього націлювання та зниження регуляції ZEB1 та ZEB2 через сайти, що зв'язують miR-200a, розташовані в межах їх 3'UTR у нормальних епітеліальних клітинах молочної залози миші [178], [179].

miR-324-5p. miR-324-5p – це мікроРНК, яка бере участь у рості клітин, апоптозі, раку та інше [180]. Як мікроРНК вона регулює експресію генів шляхом

націлювання на мРНК. Крім того, miR-324-5p – це і внутрішньоклітинна мікроРНК, тобто вона зазвичай знаходиться в мікросередовищі клітини, і одна з кількох мікроРНК, що циркулюють в організмі [181].

Її присутність в організмі як усередині клітини, так і зовні, може сприяти широкому спектру функцій та ролі miR-324-5p у численних патологіях хвороб - особливо раку - в різних системах органів. miR-324-5p приймає участь у запаленні та пухлинному розвитку колоректального раку шляхом регуляції CUEDC2, який регулює запалення за допомогою взаємодії з передачею сигналів NF- κ B [182]. miR-324-5p може інгібувати проліферацію гліоми [183] пригнічувати гепатоцелюлярну карциному та інвазію клітин карциноми носоглотки [184] та регулювати ріст та патологію при множинній мієломі, відігравати роль у розвитку та міграції клітин раку сечового міхура [185]. Крім того, делеції хромосоми 17, які включають делецію miR-324-5p, є у 10% хворих на множинну мієлому і пов'язані з гіршим прогнозом [186].

1.4.1. МікроРНК як біомаркери захворювань. Позаклітинні нуклеїнові кислоти вперше було виявлено у 1948 році, проте можливість детекції різних патологічних процесів, зокрема раку підшлункової залози, описана лише в 1994 [19]. Окрім онкозахворювань, нуклеїнові кислоти в плазмі крові сигналізують також про аутоімунні та серцево-судинні захворювання чи трансплантацію органів [187].

Описано 3 механізми потрапляння нуклеїнових кислот у плазму крові. До них відносяться апоптоз, некроз та секреція [22]. Основним шляхом потрапляння макромолекул у міжклітинний простір та кров є апоптоз, що невідкладно призводить до непатологічної загибелі клітин і є важливою складовою фізіологічної регенерації. Однією із властивостей онкотрансформованих клітин є уникнення запрограмованої смерті, тобто апоптоз не може бути механізмом потрапляння генетичного матеріалу пухлин у біологічні рідини. Інша вірогідна теорія поширення макромолекул, що пояснює зміну концентрації нуклеїнових кислот в крові хворих на рак, пояснюється мікрометастазуванням клітин із

новоутворень в плазмі. Із кращим дослідження процесів некрозу та їх ролі в онкогенезі було встановлено пряму залежність між стадією захворювання та концентрацією нуклеїнових кислот за рахунок саме некрозу в пухлинах.

Позаклітинні РНК (пкРНК), зокрема мікроРНК, були виявлені в плазмі крові людини та інших рідинах організму, як частково резистентні до нуклеаз, і зарекомендували себе як перспективні біомаркери для широкого спектру захворювань людини, включаючи рак [188]. Однак походження пакРНК в плазмі крові все ще недостатньо вивчено. Більш важливо, що є мало інформації, чи впливають клітини крові на концентрацію мікроРНК в плазмі (пкмикроРНК) і чи можуть мікроРНК з клітин крові маскувати мікроРНК з клітин пухлинного походження.

Дослідження показують, що позаклітинні мікроРНК у плазмі крові спільно імунопреципітуються з анти-AGO2 антитілами і залишаються стабільними протягом тривалого часу після загибелі клітин через незвичайну стабільність білка AGO2 у багатому на нуклеази середовищі [189], [190]. Чотири людських білки AGO є тканиноспецифічними, що дозволило висунути гіпотезу щодо існування чітких профілів miRNA-AGO у позаклітинних рідинах організму людини. Відповідно до гіпотез, повинна спостерігатись різка відсутність кореляції між AGR1 і AGO2 профілями мікроРНК в плазмі крові, що свідчить про те, що різні тканини і клітини впливають на вміст пакмікроРНК. Дослідження Turchinovich A. та Burwinkel B. [141] виявило різкі відмінності в профілях зв'язування мікроРНК плазми з AGO1 і AGO2. Відсутність кореляції між вмістом мікроРНК та AGO1 і AGO2 в плазмі можна пояснити тим, що багато тканини виділяють власну мікроРНК в кров. На відміну від плазми, у клітинах крові майже всі мікроРНК були зв'язані з AGO2, що свідчить про те, що пакмікроРНК не виділяються значною мірою цими клітинами.

З огляду на те, що пакмікроРНК безумовно є в клітинах здорових осіб та можуть попадати у кров при досить різних патологіях, їхня концентрація не може бути об'єктивним маркером діагностики раку, лише поєднання цього показника із аналізом метилювання промоторів генів-онкосупресорів та інших

маркерів канцерогенезу (втрата гетерозиготності, мутації, поліморфізм) буде ефективним в розробці неінвазивних тест-систем ранньої діагностики онкозахворювань.

Після аналізу джерел літератури можна дійти висновку, що для створення ефективної панелі маркерів розвитку нирково-клітинної карциноми, потрібно проаналізувати широкий спектр генетичних та епігенетичних змін що впливають на експресію маркерних генів, а також експресію деяких мікроРНК, як найбільш чутливих маркерів патологічних процесів у клітинах, що і було зроблено у представленій роботі.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Обладнання

Міні-центрифуга «Vortex Micro-Spin FV-2400», центрифуга «Eppendorf 5417R» (Eppendorf, Німеччина), центрифуга «Eppendorf 5424» (Eppendorf, Німеччина), спектрофотометр «NanoDrop 2000» (Thermo Scientific, Німеччина), прилади для проведення ампліфікації «Applied Biosystems 2720® thermal cycler» (Applied Biosystems, США) та «MiniAmp Thermal cycler» (Applied Biosystems, США), секвенатор «Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer» (Life Technologies, США), прилади для проведення ПЛР з детекцією у реальному часі «iCycler iQ5 Multicolor Detection System» (Bio-Rad, США) та «iCycler CFX96 Real-Time PCR system» (Bio-Rad, США), камера для горизонтального електрофорезу «Wide Mini-Sub Cell GT System» (Bio Rad Laboratories, США), міні-ротатор «Bio-RS – 24» (BioSan, Латвія), транслюмінатор для візуалізації електрофоретичного розділення продуктів ПЛР і РНК та система гелъ-документації «ChemiDoc™ XRS+ System» (Bio-Rad, США) і програмне забезпечення до нього «ImageLab2.0» (BioRad, США).

2.2. Матеріали і реактиви

Розчини та реактиви для отримання плазми крові: ЕДТА-К3 (3-х заміщена калієва сіль етилендіамінтетраоцтової кислоти, в концентрації 1,2– 2,0 мг (0,00411 моль/л– 0,006843 моль/л) сухого реагенту на 1 мл крові). Розчини та реактиви для виділення пкДНК з плазми крові: набір реагенів «Набір для

виділення ДНК з плазми крові 100х» (БіоСіліка, Росія). Розчини та реактиви для виділення геномної ДНК: набір для виділення геномної ДНК з тканин «Gen Elute Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit» (Sigma, США). Розчини та реактиви для бісульфітної конверсії: набір реагентів для бісульфітної конверсії «E.Z. DNA Methylation Kit» («Zymo Reaserch Corporation», США). Спеціалізовані суміші рзчинів «TRI Reagent для виділення нуклеїнових кислот і білків з такнин та клітин» та з плазми крові «TRI Reagent(R) BD для обробки цільної крові, плазми або сироватки» (Sigma, США). Набір для синтезу кДНК з мікроРНК «High-Specificity miRNA 1st-Strand cDNA Synthesis Kit» (Agilent Technologies, США). Розчини та реактиви для штучного метилювання: набір «CpG Methyltransferase (M. SssI)» (Thermo Scientific, США). Розчини та реактиви для МС-ПЛР: 2х розчин «SYBR Green PCR Mix» (Thermo Scientifi, США). Розчини та реактиви для гель-електрофорезу: ТАЕ-буфер 50х (трис – 24,22 г, ЕДТА – 1,862 г, оцтова кислота (льодяна) – 8,96 мл, вода дистильована до 1 л). 10хТВЕ-буфер: (0.02М ЕДТА, 1М трис, 1М борна кислота, рН 8.3). Агарозний гель: 1,5% агароза (Sigma, Німеччина) в буфері 1х ТАЕ, етидій бромід (Carl Roth, Польща) (10 мг/мл), 10 мкл на 100 мл гелю. Поліакріламідний гель (ПААГ) 8%: 6.665 мл 30% акріламиду, 2,5 мл 10хТВЕ, 200 мкл 10хПСА (персульфат амонія) та 15,650 мл води. Розчини та реактиви для виділення фрагментів ДНК з агарозного гелю: набір для виділення фрагментів ДНК «Silica Bead DNA Gel Extraction Kit» (Thermo Scientific, США). Розчини та реактиви для визначення нуклеотидної послідовності: набір для секвенування «Big Dye@ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit» (Applied Biosystems, США). В роботі використовували пластик (наконечники, пробірки) з маркуванням «вільні від ДНКаз та РНКаз».

2.3. Об'єкти досліджень

У дослідженнях використовували 122 зразки біопсій пухлини та прилеглих умовно-нормальних тканин паренхіми нирки, плазми крові до і через 5 днів

після операції, отримані від пацієнтів з новоутвореннями нирки (ДУ «Інститут урології» НАМН України, м. Київ) та 45 зразків здорових донорів за їх згоди. Середній вік хворих становив $57,5 \pm 2,8$ років. Розподіл пацієнтів з раком нирки за віком та стадією розвитку хвороби представлено в таблиці 2.1 та додатку В. Хворі до оперативного втручання були обстежені в повному обсязі, згідно протоколів Міністерства охорони здоров'я: лабораторно-клінічні аналізи, променеві методи дослідження (ультразвукова діагностика з доплерографією, реносцинтиграфія, спіральна комп'ютерна/магнітно-резонансна томографія органів заочеревинного простору). Зразки біопсій тканин та пухлин нирки до використання зберігали при -70°C . Зразки крові транспортували на льоду при $+4^{\circ}\text{C}$ та зберігались до отримання плазми не більше 4 годин.

Таблиця 2.1

Медичні дані хворих з раком нирки – загальні клініко-патологічні характеристики

Параметри	Значення	Число пацієнтів
1	2	3
Вік, років (n=122):	25-50	31 (25.4%)
	51-60	50 (41.0%)
	61-79	41 (33.6%)
Стать (n=122):	Чоловіки	77 (63.1%)
	Жінки	45 (36.9%)
Ступінь ядерного поліморфізму за Фурман (n=101):	G1	47 (46.5%)
	G2	36 (35.6%)
	G3	16 (15.9%)
	G4	2 (2.0%)

Продовження таблиці 2.1

1	2	3
TNM(n=105):	T1a+bN0M0 pT1a+bN0M1 pT1bNxM1 T2a+b N0M0 pT1bN0M1 pT3aN0M0 pT3aN1M0 pT3bN0M1	71 (67.0%) 2 (2.0%) 1 (1.0%) 23 (22.0%) 1 (1.0%) 4 (4.0%) 2 (2.0%) 1 (1,0%)
Стадія (n=101)	I II III IV	47 (46,5%) 36 (35,6%) 16 (15,9) 2 (2%)
Гістологічні форма новоутворень нирки (n=122):	Світлоклітинний Папілярний Хромофобний Ангіоміоліпома Онкоцитوما Лейоміофіброма інші новоутворення	98 (79.5%) 7 (5.7%) 1 (0.8%) 3 (2.5%) 9 (7.4%) 1 (0.8%) 4 (3.3%)

2.4. Виділення ДНК та оцінка її якості

2.4.1. Отримання вільної від еритроцитів фракції крові. Збір крові проводили в пластикові пробірки об'ємом 5 мл, що містять ЕДТА в якості антикоагулянта. ЕДТА запобігає зсіданню крові шляхом блокування іонів кальцію. На внутрішній стінці пробірки нанесені мікро краплі розчину ЕДТА-К3 в концентрації 1,5 мг сухого реагенту на 1 мл крові. Кров відстоювали протягом

2–4 год при +4 °С, ретельно відбирали вільну від еритроцитів фракцію крові, переносили у нові центрифужні пробірки і поетапно центрифугували при +4 °С, кожен раз переносючи супернатант у нову центрифужну пробірку: 1500 об/хв протягом 7 хв, 1800 об/хв – 8 хв, 2200 об/хв – 10 хв. Таким чином з 10 мл крові отримували від 2 до 4,5 мл плазми у здорових донорів і 3,5–5,5 мл – у хворих. Плазму фасували у пробірки по 200 мкл і зберігали при –70 °С. Отриману плазму використовували для виділення позаклітинної ДНК та РНК крові.

2.4.2. Виділення позаклітинної ДНК. Виділення пкДНК з плазми крові проводили за допомогою набору реактивів «Набір для виділення ДНК з плазми крові 100х» (БіоСіліка). Перед початком роботи прогрівали розчин для сорбції протягом 5–10 хвилин при температурі 55–56 °С до повного розчинення солей. До 200 мкл розмороженого зразку плазми додавали два об'єми розчину для сорбції, перемішували на вортексі. Наносили на колонку з фільтром 100 мкл розчину для промивки 1 і зразок для виділення. Центрифугували 1 хв при 13000 об/хв. Після чого наносили на фільтр 300 мкл розчину для промивки 1 і знову центрифугували 1 хв при 13000 об/хв, видаляли фільтрат. Наносили на фільтр колонки 500 мкл розчину для промивки 2 і центрифугували 1 хв при 13000 об/хв. Видаляли фільтрат і повторювали промивку розчином 2. Потім пробірку з мікроколонкою центрифугували 30 секунд при 13000 об/хв для видалення залишків розчину. Після чого витягали мікроколонку та переміщали її в нову пробірку на 1,5 мл. Наносили на фільтр 50 мкл дистильованої води для елюції пкДНК і інкубували при кімнатній температурі протягом 2 хв. Для елюції пкДНК пробірку з колонкою центрифугували 2 хв при 13000 об/хв.

Концентрацію виділеної пкДНК визначали, вимірюючи екстинцію при довжині хвилі 260 нм за допомогою спектрофотометра «NanoDrop 2000» (Thermo Scientific, США). Отримані зразки зберігали до використання при –20 °С.

2.4.3. Виділення геномної ДНК. Виділення геномної ДНК зі зразків пухлин та прилеглих умовно-нормальних тканин нирки хворих з раком

проводили за допомогою набору «Gen Elute Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit» (Sigma, Німеччина).

Для дослідження зважували 10–25 мг досліджуваного матеріалу та поміщали у стерильні пробірки на 1,5 мл типу Епендорф з маркуванням «вільні від ДНКази та РНКази». До кожного зразку додавали по 180 мкл розчину для лізису (Lysis Solution) та по 20 мкл Протеїнази К з концентрацією 20 мл/мл (Thermo Scientific, США). Всю суміш перемішували на вортексі та інкубували протягом ночі при температурі +55 °C до повного розчинення. Після цього до розчиненого матеріалу додавали по 200 мкл розчину для лізису С (Lysis Solution С) та перемішували на вортексі протягом 15 с. Далі суміш інкубували 10 хв при температурі +70 °C. В цей час в кожену колонку з фільтром (Gen Elute Miniprep Binding Column) додавали по 500 мкл розчину для колонки (Column Preparation Solution) та центрифугували протягом 1 хв при 12000 об/хв для врівноваження колонок. Після проходження 10 хв інкубування до досліджуваної суміші додавали по 200 мкл перегнаного етанолу (95%–100%), перемішували за допомогою вортексу до однорідності. Всю суміш з пробірок переносили в окремі підготовлені колонки з фільтрами (Gen Elute Miniprep Binding Column) та центрифугували 1 хв при 6500 об/хв. Після цього колонки з фільтрами переносили в нові підставки для колонок на 2 мл та додавали на фільтр по 500 мкл розчину для промивання (Wash Solution), центрифугували 1 хв при 6500 об/хв. Після чого робили повторне промивання з центрифугуванням 3 хв при 12000 об/хв. Кожну колонку з фільтром переносили в нову пробірку на 1,5 мл з додаванням на фільтр по 200 мкл деіонізованої води для елюції ДНК. Колонки з фільтрами інкубували при кімнатній температурі протягом 5 хв і далі центрифугували 1 хв при 10000 об/хв.

Визначали концентрацію виділеної геномної ДНК за допомогою спектрофотометра «NanoDrop 2000» (Thermo Scientific, США). Якість виділеної гДНК оцінювали за допомогою ПЛР з використанням праймерів до гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази (*GAPDH*). Отримані зразки зберігали до використання при –20°C.

2.4.4. Дизайн олігонуклеотидних праймерів для оцінки якості позаклітинної ДНК. Якість пкДНК, виділеної з плазми крові, оцінювали за допомогою ПЛР-аналізу коротких фрагментів з використанням праймерів до гена *GAPDH*. Дизайн праймерів проводили за допомогою програми Oligo 6.31 (Molecular Biology Insights, Inc.). Послідовності олігонуклеотидів розробляли на основі нуклеотидної послідовності відповідної ДНК-матриці, представленої в базі даних Національного центру досліджень США (NCBI), підбираючи їх таким чином, аби прямий та зворотній праймери знаходилися в інтронах гену, а розміри отриманих фрагментів не перевищували 200 п.н. Для ампліфікації фрагмента гена *GAPDH*, що відповідає ділянці 6537417 - 6537560 п.н. (145 п.н.) послідовності NC_000012.12 *Homo sapiens* chromosome 12 genomic contig GRCh38.p2, були підібрані наступні олігонуклеотидні затравки: GAP-F 5'-GGCTCCCACSTTTCTCATC-3' та GAP-R 5'-AGCGTACTCCCCACATCA-3'.

2.4.5. Оцінки якості виділеної ДНК методом полімеразної ланцюгової реакції. ПЛР з праймерами до послідовності гена *GAPDH* проводили в приладі «Applied Biosystems 2720® thermal cycler» (Applied Biosystems, США) з використанням набору реагентів «DreamTaq™ Green DNA Polymerase» («Thermo Scientific», США). Для оцінки якості виділеної пкДНК використовували праймери, описані в підпункті 2.4.3. Для оцінки якості виділеної гДНК використовували праймери: F 5'-CAAGGTCATCC ATGACAACSTTTG-3' та R 3'-GTCCACCACCSTGTTGCTGTAG-5' (496 п.н.). Реакцію проводили в 20 мкл суміші згідно протоколу до використаного набору реагентів. Ампліфікацію здійснювали за таких умов: денатурація – 94 °C, 40 с (в першому циклі – 4 хв); температура реасоціації праймерів – 56 °C (для фрагменту гена *GAPDH* розміром 145 п.н.) та 58 °C (для фрагменту гена *GAPDH* розміром 496 п.н.), 40 с; синтез – 72 °C, 30 с; 40 циклів.

2.4.6. Електрофоретичне розділення продуктів полімеразної ланцюгової реакції. Продукти ПЛР наносили окремо в паралельні доріжки. Для визначення розміру фрагментів використовували маркер молекулярних мас «GeneRuler™ DNA Ladder Mix» (Thermo Scientific, США). Електрофоретичне розділення утворених фрагментів ДНК проводили в 1,5% агарозному гелі при напрузі 5 В/см, використовуючи 20 мМ трис-ацетатний електрофорезний буфер та гліцеринний розчин для нанесення проб.

2.5. Визначення концентрації позаклітинної ДНК методом кількісної полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі

Отриману позаклітинну ДНК попередньо розбавляли у співвідношенні 1:10 в деіонізованій воді і 5 мкл очищеної ДНК плазми ампліфікували з використанням 0,3 мкМ кожного праймеру до гена β -актину (ACTB-F 5'-ССА САСТGTGСССАТСТАСG-3' і ACTB-R 5'-AGGATCTTCATGAGGTAGTCAG TCAG-3') і 0,25 мкМ флуоресцентного зонду (5'-FAM-ATGCCСТСССС САТGCCАТСТTGCGT-BHQ1-3'). ПЛР проводили за таких умов: 10 хв при температурі 95 °С, потім 40 циклів по 15 с при 95 °С і 1 хв при 60 °С. Кількісні стандартні криві були одержані з використанням серій розбавленої геномної ДНК людини відомої концентрації. Флуоресценції ампліфікованих продуктів ПЛР виявляли за допомогою системи детекції в реальному часі «iCycler CFX96» (BioRad, США). Результати аналізу представляють середнє з трьох незалежних експериментів, кожен з яких проводився у двох повторях.

2.6. Визначення концентрації позаклітинної ДНК методом інтеркаляції флуоресцентного барвника

Визначення концентрації ДНК в зразках 27-ми пацієнтів з раком нирки та 15-ти здорових донорів проводили непрямым шляхом за допомогою

вимірювання флуоресценції інтеркаляційного барвника [73]. До 195 мкл розчину барвника SYBR Green I (1:10 000) в буфері 1x PBS додавали 5 мкл зразку або таку ж кількість стандартного розчину геномної ДНК відомої концентрації (від 0,05 до 50 нг/мкл) і витримували 10 хвилин. З кожного зразка або стандарту готувалося 2–3 ідентичні суміші для більшої точності визначення концентрації. Флуоресценцію отриманих сумішей вимірювали за допомогою флуориметра «Victor³ Multilabel Cjunter 1420» (Perkin Elmer, США) з використанням фільтрів FITC (485/535 нм) і накопиченням сигналу 1 с. Концентрацію ДНК в зразках розраховували за допомогою статистичних функцій програмного забезпечення Microsoft Excel 2007, виходячи з рівнів флуоресценції стандартних розчинів.

2.7. Аналіз ступеню метилювання CpG–острівців промоторних ділянок генів-супресорів

2.7.1. Бісульфітна обробка отриманої ДНК. Для бісульфітної обробки брали по 45 мкл пкДНК (50–243 нг) та по 500 нг геномної ДНК. Бісульфітну конверсію проводили за допомогою набору «EZ DNA Methylation Kit» (Zymo Research Corporation, США) за наступним протоколом. Перед початком роботи готували бісульфітну суміш: до реагенту CT (conversion reagent) додавалось 750 мкл іонізованої H₂O та 210 мкл M-dilution buffer до повного розчинення реагенту CT.

До 45 мкл розчину ДНК додавали 5 мкл М-буферу та інкубували 15 хв при температурі +37 °С. Одразу після інкубації додавали бісульфітну суміш. Після цього проби інкубували при температурі +50 °С протягом 16 годин та переносили на 15 хв на льодяну баню при +4 °С. Після інкубації бісульфітну суміш наносили на колонки Zymo-spin IC Column, додавали 400 мкл М-буферу для зв'язування, колонки декілька разів перевертали для рівномірного змішування, центрифугували при 10000 g 30 с. Потім до колонок додавали 100 мкл буфера для промивання та центрифугували при 10000 g 30 с. Після цього до колонок додавали 200 мкл буферу для десульфування. З ним колонки інкубували

20 хв при температурі +30 °С, після чого колонки двічі промивали 200 мкл буферу для промивки Wash. Після промивки колонки ще раз додатково центрифугували 2 хв при максимальних обертах. Елюцію ДНК проводили за допомогою 12 мкл буфера M-Elution. Бісульфітно-оброблену ДНК зберігали при –20 °С до використання.

2.7.2. Штучне метилювання за допомогою метилтрансферази. В якості позитивного контролю для проведення метил-специфічної ПЛР використовували ДНК, штучно метильовану за допомогою C5-цитозин-ДНК-метилтрансферази SssI (M.SssI), що розпізнає CpG-динуклеотиди (Thermo Scientific, США). Реакція складалась з 2 мкл 10x M.SssI Buffer, 0,4 мкл 50x S-аденозилметіоніну (SAM) в якості кофактору, 500 нг геномної ДНК, 1 мкл M.SssI (4 од/мкл) та деіонізованої води, загальним об'ємом 20 мкл. Суміш ретельно перемішували та інкубували протягом 15 хв при температурі 37 °С. Реакцію зупиняли нагріванням протягом 20 хв при температурі +65 °С для інактивації ферменту.

2.7.3. Проведення метил-специфічної полімеразної ланцюгової реакції. Для визначення статусу метилювання CpG-острівців промоторів генів на пкДНК у крові пацієнтів, хворих на рак нирки і здорових донорів, а також на ДНК пухлин та умовно здорових тканин нирки, використовували метил-специфічну ПЛР (МС-ПЛР) у приладі для проведення ампліфікації у режимі реального часу «iCycler CFX96» (Bio-Rad, США).

Реакційна суміш для проведення метил-специфічної ПЛР складалась з 12,5 мкл 2x розчину «SYBR Green PCR Mix» (Thermo Scientific, США), 2 мкл бісульфітно-обробленої ДНК, 200 мкМ кожного праймеру та води, загальним об'ємом 20 мкл. Ампліфікацію здійснювали за таких умов: денатурація – +95 °С, 15 с (в першому циклі – 10 хв); синтез – +72 °С, 20 с; 40 циклів. Температура реасоціації праймерів та їх послідовність представлені в таблиці 2.2. В якості позитивного контролю використовували ДНК, штучно метильовану за допомогою SssI-метилтрансферази. Для ідентифікації очікуваних фрагментів

виконувався аналіз кривих плавлення ампліфікованих з SYBR Green I продуктів та електрофорез ПЛР-продуктів у 2 % ТАЕ-агарозному гелі за методом, що був описаний в підрозділі 2.4.6. Кожна МС-ПЛР проводилася у трьох незалежних повторях.

Таблиця 2.2.

Послідовності праймерів та умови проведення метил-специфічної ПЛР

Назва гену	T °C	Послідовність праймерів 5'––3'	Розмір (п.н.)
<i>RASSF1A</i>	58	GTGTTAACGCGTTGCGTATC	169
		AACCCCGCGAACTAAAAACGA	
<i>RASSF1C</i>	59	GGGTTTTGCGAGAGCGCG	105
		GCTAACAAACGCGAACCG	
<i>APC</i>	56	TATTGCGGAGTGCGGGTC	97
		TCGACGAACTCCCGACGA	
<i>LRRC3B</i>	66	GGTGCGAGGAAGGTAGGC	149
		ACCAATACCTCGCCGACG	
<i>GPX3</i>	59	TATGTTATTGTCGTTTCGGGAC	171
		GTCCGTCTAAAATATCCGACG	
<i>p14ARF</i>	60	GTGTTAAAGGGCGGCGTAGC	132
		AAAACCCTCACTCGCGACGA	
<i>p16</i>	65	TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC	150
		GACCCCGAACCGCGACCGTAA	
<i>RUNX3</i>	60	TTACGAGGGGCGGTCGTACGCGGG	220
		AAAACGACCGACGCGAACGCCCTCC	
<i>VHL</i>	60	TGGAGGATTTTTTTTGCGTACGC	158
		GAACCGAACGCCGCGAA	
<i>PCDH8</i>	60	CGGTTATTGGTTATTCGGTTCG	134
		CGAACTCTAAAAACGCGCG	
<i>TIMP3</i>	59	CGTTTCGTTATTTTTTGTTCGGTTTC	116
		CCGAAAACCCCGCCTCG	

Для аналізу кривих плавлення ПЛР-продукти нагрівались в інтервалі від +65 °C до +92 °C з кроком 0,5 °C та фіксувалась флуоресценція продуктів, ампліфікованих з SYBR Green I. Пік плавлення порівнювався з позитивним контролем.

2.7.4. Виділення фрагментів ДНК з агарозного гелю. Виділення фрагментів було проведено за допомогою набору реагентів «Silica Bead DNA Gel Extraction Kit» (Thermo Scientific, США). До наважки агарозного гелю з фрагментом ДНК додавали три об'єми Binding Buffer. Пробірки типу епандорф з сумішшю інкубували 10 хв при температурі +55 °C, періодично перемішуючи, до повного розчинення агарозного гелю. Далі до кожного зразка було додано по 5 мкл Silica Powder Suspension та перемішано на вортексі. Абсорбування ДНК на кремнеземових кульках здійснювали за допомогою міні-ротатора Bio-RS-24 (BioSan, Латвія) протягом 15 хв. Пробірки разом зі зразками центрифугували 30 с при 8000 об/хв. Далі проводили промивку в три повтори: відбирали рідину; додавали по 500 мкл буферу New Wash, центрифугували пробірки 30 с при 8000 об/хв. Далі робили кінцеве центрифугування протягом 30 с при максимальній швидкості та відбирали залишки рідини. Пробірки підсушували на міні-ротаторі Bio-RS-24 («BioSan», Латвія) за максимальної швидкості протягом 10–15 хв з відкритими кришками. Після підсушування в кожную пробірку додавали по 10 мкл dH₂O та перемішували на вортексі. Пробірки інкубували при температурі +55 °C протягом 10 хв, після чого центрифугували протягом 2 хв при максимальній швидкості. Надосадову рідину відбирали в чисті мл пробірки типу епіндорф. Виділені фрагменти ДНК зберігали при температурі –20 °C.

2.7.5. Визначення нуклеотидної послідовності продуктів МС-ПЛР. В нашій роботі ми визначали нуклеотидні послідовності фрагментів ДНК, отриманих за допомогою МС-ПЛР. Перевірку проводили з використанням

набору для секвенування «BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit» (Applied Biosystems, США) та прямого праймеру до ПЛР-продукту згідно інструкцій виробника за допомогою автоматичного ДНК-секвенатора «Genetic Analyser 3130» (Applied Biosystems, США). Послідовність аналізували за допомогою програмного забезпечення «Sequencing Analysis» (Applied Biosystems, США) та Chromas 1.55 (Technelysium LTD, Австрія).

Всі нуклеотидні послідовності були отримані з бази даних Національного Центру Біотехнологічної Інформації (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov). Вирівнювання нуклеотидних послідовностей проводили за допомогою програмного забезпечення SnapGene Viewer 1.5 (GSL Biotech LLC, Boston, MA, США) та сервісу BLASTN (NCBI, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

2.8. Проведення мікросателітного аналізу

2.8.1. Детекція алельного дисбалансу у поліакриламідному гелі. Для проведення мікросателітного аналізу STR-маркерів на геномній ДНК хворих на рак нирки використовували ПЛР у приладі для проведення ампліфікації «Thermal Cycler 2720» (Applied Biosystems, США).

Реакційна суміш для проведення ПЛР, загальним об'ємом 20 мкл, складалась з 300 нг геномної ДНК, 1X DreamTaq Green Buffer (Thermo Scientific, США), 200 мкМ dNTP, 1,5 од. DreamTaq DNA polymerase (Thermo Scientific, США) і 200 мкМ кожного з праймерів. Ампліфікацію здійснювали за таких умов: денатурація – +96 °C, 1 хв (в першому циклі – 4 хв); реасоціація праймерів впродовж 1 хв. з відповідними температурами (див. табл. 2.3); синтез – +72 °C, 1 хв; 40 циклів.

Таблиця 2.3.

Послідовності праймерів та умови проведення ПЛР для мікросателітного аналізу

Маркер	T°C	Послідовність праймерів	Розмір (п.н.)
D3S966 [191]	58°C	F 5'–TACCTCCTCACTGTTTCATATTAG–3'	120
		R 5'–CACATAGTATGTCTCGGCTAAGAG–3'	
D3S1568 [192]	60°C	F 5'–CCATGAACAGAACCTCCCTA–3'	284
		R 5'–CCGCTGTCCTGCTGTAAG–3'	
D3S1038 [192]	55°C	F 5'–TCCAGTAAGAGGCTTCCTAG–3'	115
		R 5'–AAAGGGGTTCAGGAAACCTG–3'	
D9S916 [116]	55°C	F 5'– GATGTCCAGTTGTCCCTTCATAA –3'	193
		R 5'– ATAGACTGCCAAATTTTGGACC –3'	
D9S974 [116]	55°C	F 5'– CCTGGTCTGGATCATAAAATGAA –3'	204
		R 5'– TGTGGAAATTTTCTGTCTGGTTC –3'	

Розділення продуктів ПЛР за молекулярними масами проводили за допомогою методу вертикального гель-електрофорезу в 8% ПААГ у 1х TBE буфері (0,02 М ЕДТА, 1М трис, 1М борна кислота, рН 8,3). Для приготування ПААГ брали 6,665 мл 30% акриламиду, 2,5 мл 10х TBE, 200 мкл 10х ПСА (персульфат амонія) та 15,650 мл води. Для нанесення 10 мкл реакції ПЛР змішували з 5 мкл формаміду і 2 мкл буферу для нанесення, який в якості барвника містить ксиленціанол. Візуалізацію, після фарбування бромістим етидієм, проводили за допомогою приладу «ChemiDoc™ XRS+ System» (Bio-Rad, США) та програмного забезпечення до нього «ImageLab 2.0».

2.8.2. Детекція алельного дисбалансу шляхом розділення продуктів ПЛР капілярним гель-електрофорезом. Після ампліфікації 0,5 мкл ПЛР-продукту змішували з 0,5 мкл маркеру фрагментів GeneScan 500 LIZ dye Size

Standard (Applied Biosystems, США) та 9 мкл формаміду Hi-Di™ Formamide (Applied Biosystems, США). Суміш денатурували 2 хв при 95 °С, швидко охолоджували на льоду і розділяли за допомогою автоматичного ДНК-аналізатора «Genetic Analyser 3130» (Applied Biosystems, США). Послідовність аналізували за допомогою програмного забезпечення GeneMapper Software V3.0 (Applied Biosystems, США)

Втрата гетерозиготності (LOH) визначалася обчисленням відношення інтенсивностей двох алелей зі зразка пухлини до зразка прилеглої тканини, який служив в якості еталонної ДНК. LOH інтерпретувалася якщо кінцевий коефіцієнт був менше, ніж 0,6 або більше ніж 1,67. Гомозиготи і відсутність піків, які можна вивчати, позначали як неінформативні випадки.

2.9. Проведення кількісної ПЛР для визначення індексу цілісності пкДНК. Для визначення індексу цілісності проводили кількісну ПЛР з використанням праймерів до фрагментів β-актину, розміром 106 п.н. (F 5'–TCGTGCGTGCGTGACATTAAGGAG–3', R 5'–GGCAGCTCGTAGCT CTTCTC–3') та 384 п.н. (F 5'–GCTATCCCTGTACGCCTCTG–3', R 5'–AGG AAGGAAGGCTGGAAGAG–3'). ПЛР проводили у приладі для проведення ампліфікації у режимі реального часу «iCycler CFX96» (Bio-Rad, США) в 20 мкл суміші з використанням 2х розчину SYBR Green PCR Mix (Thermo Scientific, США), 2 мкл пкДНК, 200 мкМ кожного праймеру та води. Ампліфікацію здійснювали відповідно до умов, запропонованих фірмою виробника: 95 °С, 15 с (в першому циклі – 10 хв); 60 °С, 60 с; 40 циклів. Аналіз кривих плавлення проводили для підтвердження специфічності ПЛР-продукту. Експеримент проводився в трьох незалежних повторях, кожен експеримент включав зовнішні стандарти і негативний контроль.

2.10. Аналіз експресії мікроРНК за допомогою методу кількісної ЗТ-ПЛР у реальному часі

2.10.1. Виділення РНК. Виділення РНК та проводили за допомогою TRI Reagent (Sigma, США), відповідно рекомендацій виробника. Для виділення брали 100 мг розтертої у порошок в рідкому азоті тканини та додавали 1 мл TRI Reagent. Для отримання розділення суміші на три фази (протеїни, ДНК та РНК) суміш перемішували на міні-центрифузі «Vortex Micro–Spin FV-2400» та центрифугували 15 хв при 10000 g при +4 °С в центрифюзі «Eppendorf 5417R» (Eppendorf, Німеччина).

Для виділення РНК обережно відбирали верхню фазу та додавали 0,5 мл ізопропанолового спирту на кожен мл TRI Reagent, перемішували та інкубували 5–10 хв за кімнатної температури. Для утворення осаду РНК суміш центрифугували 10 хв при 2000 g за +4 °С. Відбирали супернатант та промивали осад додаванням 1 мл 75% етанолу на 1 мл TRI Reagent, перемішували та центрифугували 5 хв при 7500 g за 4 °С. Для видалення спирту інкубували на льоду 5–10 хв, але не даючи осаду РНК випаруватись остаточно. Осад розчиняли у 40 мкл буферу для РНК. Концентрацію виділеної РНК вимірювали за допомогою спектрофотометра «NanoDrop 2000» (Thermo Scientific, США). Зберігали виділену РНК при –70°С.

2.10.2. Очистка виділеної РНК. Якщо при перевірці чистоти та концентрації РНК показниками A260/A280 та A260/A230 виходили за межі 1,7–2,2 (зокрема для більшості пухлин показник A260/A230 був нижче 1,7), то проводився додатковий етап очистки РНК за описаним нижче протоколом. Всі операції проводились на льоду.

Спочатку об'єм зразків доводили вільною від РНКаз водою до 300 мкл. для зручності подальших маніпуляцій. Додавали рівний об'єм хлороформу. Зразки активно струшували 3 рази протягом 5 хв. та центрифугували при 14000 g

протягом 5 хв. за температури $+4^{\circ}\text{C}$. Відбирали верхню фазау, що складалась з води та РНК і переносили в нові пробірки. Додавали натрій ацетат (0,1 об'єм від відібраної фракції) та 3 об'єми (від відібраної фракції) 96% етанолу. Залишали зразки в кельвінаторі за температури -80°C 30 хв. Після цього, центрифугували пробірки при 14000 g протягом 15 хв за температури $+4^{\circ}\text{C}$. Обережно відбирали супернатант та проводили 3 промивки, додаючи 1 мл 96% етанолу та центрифугуючи при 14000 g протягом 5 хв за температури $+4^{\circ}\text{C}$. Надалі висушували та розчиняли РНК за описаною вище методикою.

2.10.3. Реакція поліаденілювання. Після виділення та очистки РНК проводили поліаденілювання з використанням набору High-Specificity miRNA 1st-Strand cDNA Synthesis Kit (Agilent Technologies, США). Спочатку в пробірки об'ємом 200 мкл. додавали вільну від РНКаз воду таким чином, щоб фінальний об'єм становив 20 мкл. (оскільки додавались різні об'єми проб з тотальною РНК в залежності від їх концентрації). Далі, по черзі додавали реактиви з набору: 5x poly A polymerase buffer – 4 мкл.; rATP (10 мМ) – 1 мкл. Далі до суміші додавали тотальну РНК в такому об'ємі, щоб в 20 мкл. містилось 1 мкг. РНК. В кінці додавали 1 мкл *E.coli* poly A polymerase та обережно перемішували вміст пробірок.

Інкубували зразки 30 хв. при $+37^{\circ}\text{C}$ для активного поліаденілювання та зупиняли процес підвищуючи температуру до $+95^{\circ}\text{C}$ протягом 5 хв. Одразу після цього переносили пробірки на лід. Отримані зразки одразу використовувались для синтезу кДНК або зберігались в низькотемпературному холодильнику за температури -80°C .

2.10.4. Зворотно-транскрипційна реакція. Зворотну транскрипцію проводили з використанням набору High-Specificity miRNA 1st-Strand cDNA Synthesis Kit (Agilent Technologies, США) за відповідним протоколом. Спочатку

в пробірки (200 мкл.) додавали 11,2 мкл. вільної від РНКаз води, далі – 2 мкл. реактиву 10x AffinityScript RT buffer, 4 мкл. поліаденільованої РНК, 0,8 мкл. dNTP mix (100 мМ), 1 мкл. RT adaptor primer (10 мМ) та 1 мкл. AffinityScript RT/RNase Block enzyme mixture. Обережно перемішували вміст пробірок.

Інкубували проби 5 хв при 55°C, 15 хв при 25°C, 30 хв при 42°C для проходження процесу зворотної транскрипції та 5 хв при 95°C для зупинки реакції.

Отриману кДНК розчиняли в 280 мкл вільної від РНКаз води та зберігали при -20°C до використання у ПЛР у реальному часі.

2.10.5. Кількісне визначення мікроРНК методом ПЛР у реальному часі. Визначення концентрацій мікро РНК в досліджуваних зразках проводили шляхом кількісної ПЛР у реальному часі за допомогою набору 5X HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus (no ROX) (Solis BioDyne, Естонія). R18S використовувалась як референсна РНК, відносно якої вимірювалась концентрація досліджуваних мікроРНК. До R18S використовували праймери, подані в Таблиці 2.4. В якості зворотнього праймеру для мікроРНК використовувався універсальний зворотній праймер з набору для синтезу кДНК з мікроРНК High-Specificity miRNA 1st-Strand cDNA Synthesis Kit (Agilent Technologies, США).

ПЛР у реальному часі проходив за наступних умов: 15 хв при 95°C для активації полімерази в першому циклі, 15 с при 95°C, 20 с при 60°C. Останні два етапи повторювали 40 разів. Після чого отримували криві плавлення продуктів реакції для підтвердження відповідності отриманого продукту. Для кожного зразку реакції ставились у трьох повторах як для референсної, так і для мікроРНК. Якщо всі 3 цикли виходу входили в межі [0,0-0,5], вираховувалось їх середнє значення. В іншому випадку вираховувалось середнє значення між двома найбільш наближеними циклами виходу продукту.

Таблиця 2.4

Послідовності праймерів для визначення мікро РНК

мікроРНК	Послідовність праймеру 5' – 3'
hsa-miR-324-5p	CGCATCCCCTAGGGCATTGGTG
hsa-miR-200a-3p	TAACACTGTCTGGTAACGATGT
hsa-miR-181a-5p	AACATTCAACGCTGTCGGTGAGT
hsa-miR-30a-5p	TGTAAACATCCTCGACTGGAAG
hsa-miR-30c-5p	TGTAAACATCCTACACTCTCAGC
18S F	CGCCGCTAGAGGTGAAATTC
18S R	CATTCTTGGCAAATGCTTTTCG

Рівень експресії мікроРНК вимірювали по відношенню до рівню експресії гена R18S в пробі, після чого порівнювали відносні рівні експресії мікроРНК в досліджуваних зразках. Відносний рівень значень експресії мікроРНК розраховували методом $2^{-\Delta C_t}$, де ΔC_t дорівнює різниці між ΔC_{tR18S} (цикл виходу продукту референсної РНК R18S) та $\Delta C_{t\text{мікрнк}}$ (цикл виходу продукту досліджуваних мікроРНК).

2.11. Статистична обробка отриманих даних.

Розміри вибірки досліджуваних зразків розраховували за формулою, описаною в [193], припускаючи α і β значення 0,05 та 0,2 відповідно. Ми використовували стандартне відхилення, отримане в наших попередніх експериментах, і оцінили різницю в середніх показниках як 150%. Для оцінювання статистичної значимості відмінностей між групами виконувався

непараметричний тест Манна-Уїтні або тест Хі-квадрат у випадку категоріальних змінних. Відмінності вважали статистично значущими для всіх видів аналізу, якщо $p < 0,05$. Щоб оцінити дискримінаційну силу параметрів, що вивчаються для діагностики раку нирок, ми побудували бінарні моделі логістичної регресії для обраних змінних прогнозування та всіх їх можливих комбінацій, використовуючи SPSS версії 25 (IBM, США). За цими моделями розраховували ймовірності позитивного результату (тобто виникнення раку). Ці ймовірності використовувались для аналізу характеристик робочих характеристик приймача (ROC). Побудова ROC та оцінка AUC (Area Under Curve) проводилася за допомогою GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) Порівняння ROC-кривих проводили за допомогою програми MedCalc (MedCalc Software Ltd, Бельгія).

Тест рангової кореляції за Спірменом застосовували для пошуку кореляцій між рівнями метилювання CpG-острівців промоторів досліджуваних генів на ДНК пухлин та пкДНК плазми крові пацієнтів.

Для аналізу прогностичної цінності метилювання CpG-острівців промоторів окремих генів був використаний однофакторний логістичний регресійний аналіз. Тільки гени, які були значущими при однофакторному аналізі, були включені до мультифакторного регресійного аналізу. Метод прямого регресійного аналізу був використаний для мультифакторного регресійного аналізу, що проводився за допомогою програми SPSS 25 (IBM, США).

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ЕСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Рак нирки (РН) практично не чутливий до променевої та хіміотерапії, тому хірургічне видалення пухлини є основним методом лікування таких хворих. Певні успіхи пов'язані з впровадженням в практику таргетних препаратів, механізм дії яких безпосередньо пов'язаний з генетичними порушеннями в пухлинних клітинах [194]. У зв'язку з цим питання про лікування метастатичного РН і місцевопоширених форм захворювання вимагає максимально точної оцінки прогнозу розвитку первинної пухлини, знання її особливостей на молекулярно-генетичному рівні.

Таким чином, комплексне дослідження змін експресії мікроРНК, метилування 5'-регуляторних областей генів-супресорів та втрати гетерозиготності генів, задіяних у розвитку РН, сприятиме розробці системи нових молекулярно-генетичних маркерів. В даній роботі було проведене дослідження змін експресії мікроРНК у зразках біопсій пацієнтів з РН у порівнянні з умовно здоровою тканиною нирки для визначення можливих молекулярних маркерів уточнювальної діагностики, що можуть допомогти більш достовірно визначати тип, поширеність та стадії злоякісності пухлин нирки. Також було проведено дослідження з виявлення мікросателітних змін, для чого нагеномній ДНК (гДНК) пухлин та прилеглих до пухлини умовно-нормальних тканин відповідних пацієнтів було перевірено локуси, що асоційовані з генами-супресорами раку нирки. Було досліджено зміни концентрації та індексу цілісності пкДНК плазми крові пацієнтів з РН в порівнянні з здоровими донорами. Для визначення маркерів розвитку світлоклітинного раку нирки на пкДНК було проведено порівняння статусу метилування CpG-острівців промоторних ділянок обраних генів на зразках гДНК з пухлин та пкДНК плазми

крові від одних і тих же пацієнтів. В якості негативного контролю гДНК було використано біопсії прилеглих до пухлини тканин відповідних пацієнтів. Для контролю метилювання генів на пкДНК використовували зразки плазми здорових донорів.

3.1. Рівні експресії мікроРНК у пацієнтів з раком нирки

3.1.1. Визначення сайтів-мішеней до мікроРНК у 3'-нетрансльованих ділянках досліджуваних генів. Для визначення сайтів-мішеней до мікроРНК у 3'-UTR мРНК генів-супресорів, що впливають на розвиток та прогресію раку нирки, використовували біоінформатичні *on-line* ресурси TargetScan та DIANA. Оскільки ці ресурси використовують різні алгоритми пошуку, а також тому, що мікроРНК для зв'язування з мРНК не повинна обов'язково мати 100% гомологію з сайтом-мішенню, дані ресурси визначали різні набори мікроРНК для тих самих генів. Однак вони все одно передбачували одні й тіж самі мікроРНК, хоча і визначали для них різний рівень достовірності зв'язування з певною мРНК гена.

Отримані за допомогою обох ресурсів масиви передбачуваних мікроРНК були порівняні між собою і з них були визначені ті мікроРНК, що зустрічалися в обох групах. Серед них, було вибрано ті мікроРНК, що можуть впливати на декілька з досліджуваних генів. Для свого дослідження, ми зупинилися на декількох мікро РНК людини (hsa-мікроРНК): miR-30a-5p, miR-30c-5p; miR-138-1, miR-324-5p, miR-181a-5p та miR-200a-3p (Таблиця 3.1).

3.1.2. Вміст мікроРНК у зразках пацієнтів з раком нирки. Після виділення тотальної РНК, її якість перевіряли гелі-електрофорезом у 1% денатуруючому гелі (рис. 3.1). Для синтезу кДНК на мікроРНК відбирали тільки якісну, не деградовану РНК, які мали співвідношення смуг, що відповідають 28S та 18S у діапазоні від 2:1 до 1:1.

Таблиця 3.1

Гени, задіяні у процесах канцерогенезу, що можуть регулюватися обраними мікроРНК

hsa-miR-30a/c-5p	hsa-miR-138-1	hsa-miR-181a-5p	hsa-miR-200a/b-3p	hsa-miR-324-5p
<u>DNMT3A</u>	<u>RASSF1</u>	<u>RASSF1</u>	<u>PCDH8</u>	<u>GPX3</u>
<u>SMAD1</u>	<u>PTEN</u>	<u>VHL</u>	<u>DNMT3B</u>	<u>ITGA9</u>
<u>KRAS</u>	<u>KRAS</u>	<u>PTEN</u>	<u>PTEN</u>	
<u>ITGA9</u>	<u>DNMT3A</u>	<u>KRAS</u>	<u>SOX2</u>	
<u>AHNAK</u>	<u>DNMT3B</u>	<u>ZEB1</u>	<u>ZEB1</u>	
<u>WASL</u>	<u>ZEB1</u>	<u>AHNAK</u>	<u>MTFR1</u>	
<u>NOTCH1</u>	<u>SMAD2</u>	<u>WASL</u>	<u>SNAI2</u>	
<u>AMER1</u>	<u>AMER1</u>	<u>GNAQ</u>	<u>KRAS</u>	
	<u>POU3F2</u>		<u>SMAD2</u>	
	<u>PAX9</u>		<u>TSC22D1</u>	
			<u>AHNAK</u>	

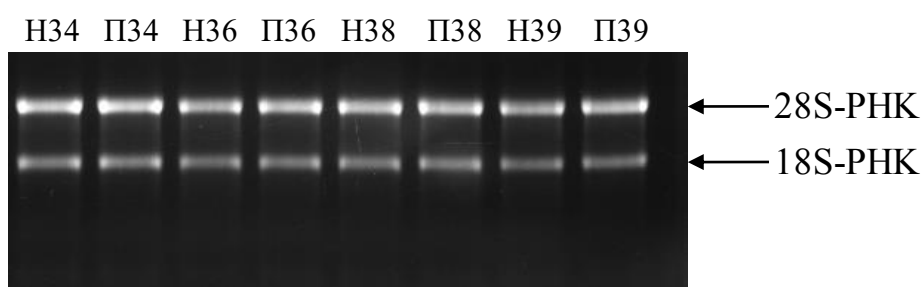


Рис. 3.1. Розділення РНК у денатуруючих умовах. П – РНК з пухлин нирки, Н – РНК з прилеглих до пухлини умовно-нормальних танин нирки

Аналіз результатів проведеної нами кількісної ПЛР у реальному часі показав статистично достовірне зниження концентрації для мікроРНК hsa-miR-30a/c-5p, hsa-miR-138-1 та hsa-miR-324-5p у пухлинах нирки відносно прилеглої

до неї умовно-нормальної тканини. В той же час для hsa-miR-181a-5p та hsa-miR-200a-3p, не було виявлено статистично значущої різниці між відотною концентрацією мікроРНК в пухлинах та прилеглих умовно-нормальних тканинах (рис. 3.2).

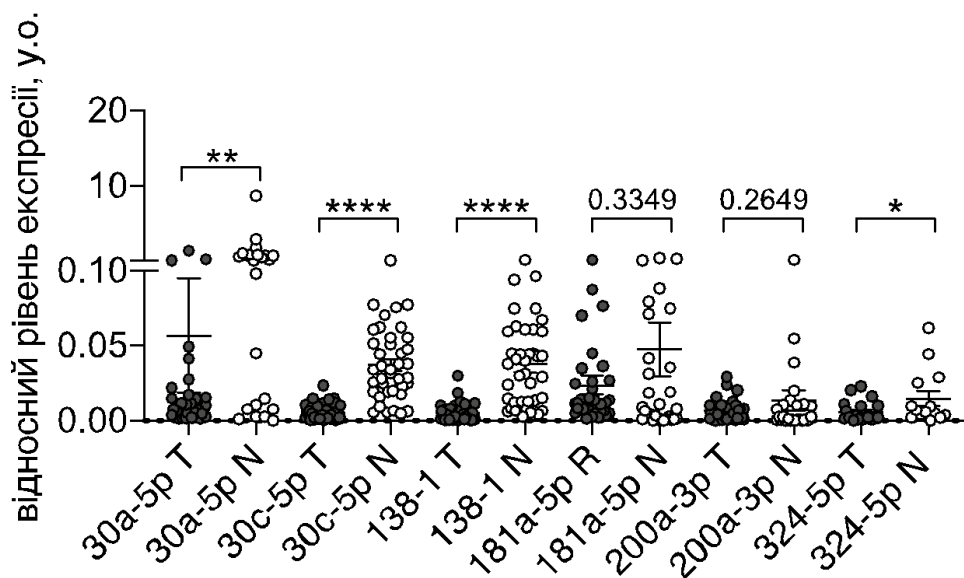


Рис. 3.2. Рівні відносної експресії мікроРНК у тканинах хворих з новоутвореннями нирки (Т) та умовно-нормальних тканинах нирки (N)

*– різниця статистично значуща за $p \leq 0,05$

**– різниця статистично значуща за $p \leq 0,001$

****– різниця статистично значуща за $p < 0,0001$

Аналіз ROC-кривих з визначенням площі під кривою (AUC) для цих мікроРНК показав хороший результат для використання їх як потенційних діагностичних маркерів. На рисунку 3.3 представлені ROC-криві з показниками AUC для кожної із ретельно досліджуваних мікроРНК. Як видно з графіків, найкращі показники в якості біомаркерів мають hsa-miR-30c-5p та hsa-miR-138-1 (AUC=0,8753 та AUC=0,8973) та hsa-miR-30a-5p (AUC=0,7474). Найнижчий показник було визначено для hsa-miR-200a-3p (AUC=0,5844), що говорить про неможливість використання цієї мікроРНК в якості самостійного маркеру новоутворень нирки.

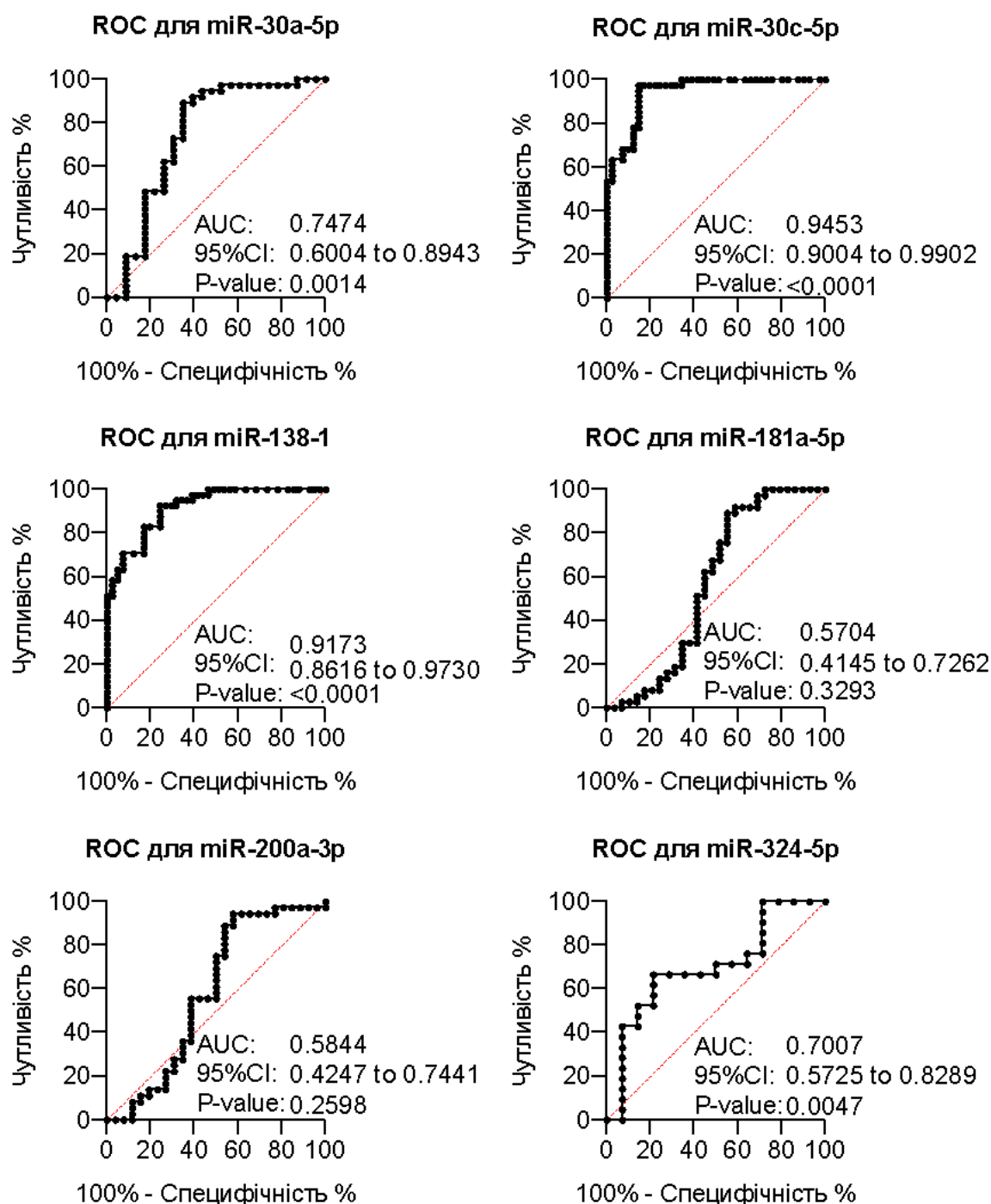


Рис. 3.3. Аналіз ROC-кривої показників концентрацій мікроРНК hsa-miR-30a-5p (А), hsa-miR-30c-5p (Б), hsa-miR-138-1 (В), hsa-miR-181a-5p (Г), hsa-miR-200a-3p (Д) та hsa-miR-324-5p (Е) у пухлинах хворих з новоутвореннями нирки у порівнянні з прилеглою тканиною

У дослідженні використовували зразки пацієнтів не тільки з пухлинами карциноми нирки (світлоклітинний, папілярний, хромофобний), а також і зразки пацієнтів з доброякісними новоутвореннями. Тож було перевірено можливість використання кількісних показників мікроРНК для визначення «злоякісності» пухлини. Аналіз даних показав, що в цьому випадку тільки hsa-miR-200a-3p має потенціал для визначення типу пухлини: доброякісної чи злоякісної (рис. 3.4).

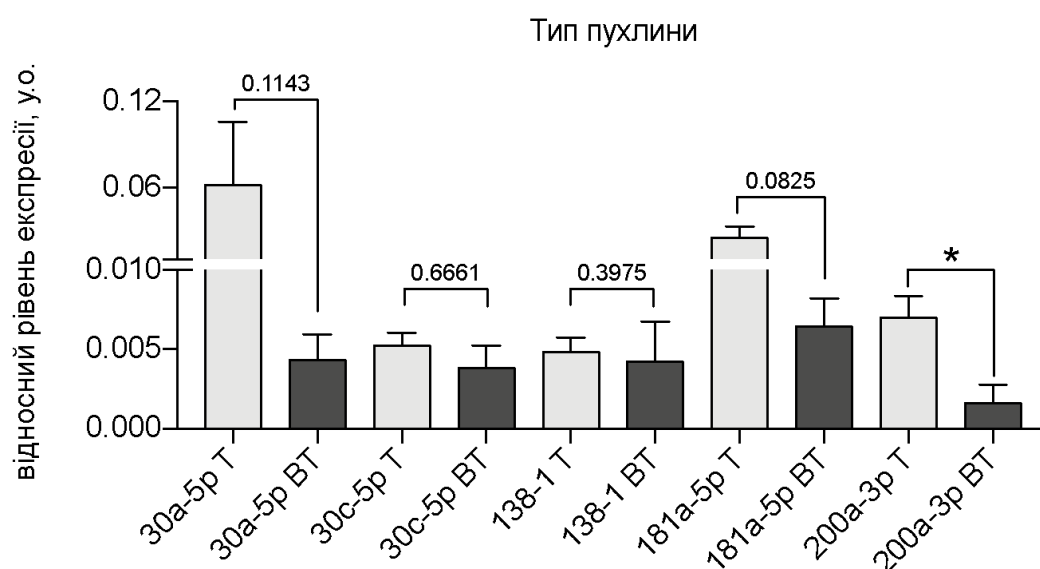


Рис. 3.4. Рівні відносної експресії мікро РНК хворих зі злоякісними (Т) та доброякісними (ВТ) новоутвореннями нирки

*– різниця статистично значуща за $p \leq 0,05$

Крім того, аналіз ROC-кривої з визначенням площі під кривою для hsa-miR-200a-3p показав високий діагностичний потенціал цього маркера ($AUC=0,8203$) саме для розділення пухлин нирки злоякісного та доброякісного походження (Рис. 3.5).

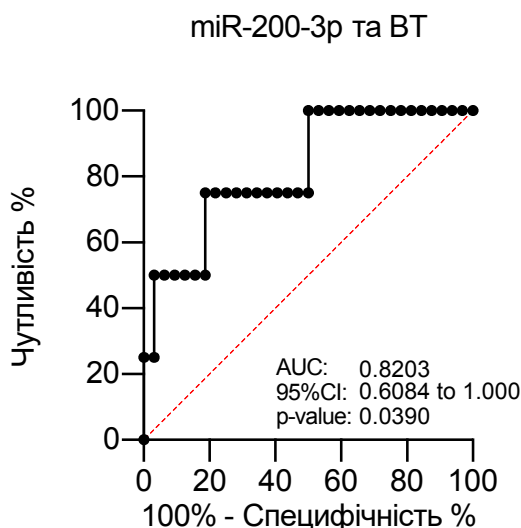


Рис. 3.5. Аналіз ROC-кривої показників концентрацій мікроРНК miR-200a-3p у зразках хворих зі злоякісними пухлинами нирки (Т) у порівнянні з показниками зразків хворих з доброякісними пухлинами нирки (BT)

Для всіх досліджуваних мікроРНК були проаналізовані можливі діагностичні передбачення і інших клініко-морфологічних показників хворих на нирково-клітинну карциному (НKK): стать, вік, стадія хвороби, розмір і поширеність пухлини (TNM) та морфологія клітин за Фурман.

Проведений статистичний аналіз результатів значень експресії досліджуваних мікроРНК не показав вагомої різниці за такими показниками як стать, вік, стадія хвороби, розмір і поширеність пухлини (TNM) та морфологія клітин за Фурман.

Серед проаналізованих мікроРНК не було визначено достовірної різниці між рівнями концентрацій у чоловіків і жінок. Однак при порівнянні цих значень в межах однієї статі між хворими та здоровими індивідуами було виявлено, що для hsa-miR-30a-5p спостерігається достовірна різниця у рівнях концентрації за цими показниками. При чому, для чоловіків ця різниця більш виражена ($p=0,0011$), ніж для жінок ($p=0,0442$) (рис. 3.6). Для hsa-miR-30c-5p цей показник був однаковим для обох статей ($p<0,0001$) (рис. 3.6). Для hsa-miR-138-1 для жінок трохи нижчий ($p=0,0001$), ніж для чоловіків ($p<0,0001$) (рис. 3.6). Для hsa-miR-200a-3p достовірної різниці між рівнями мікроРНК у хворих і здорових

жінок виявлено не було ($p=0,5952$) (рис. 3.6). Однак для зразків мікроРНК, виділених з пухлин та умовно-нормальних тканин нирки чоловіків ця різниця існує ($p=0,0296$). Так само і для hsa-miR-324-5p ($p=0,7302$ для жінок і $p=0,0408$ у випадку чоловіків) (рис. 3.6). Отже, можемо зробити припущення, що при новоутвореннях нирки, у чоловіків може потрапляти в кров менша кількість гіпоекспресованих мікроРНК (рис. 3.6) і для них цей біомаркер може слугувати в якості гарного контролю за здоров'я.

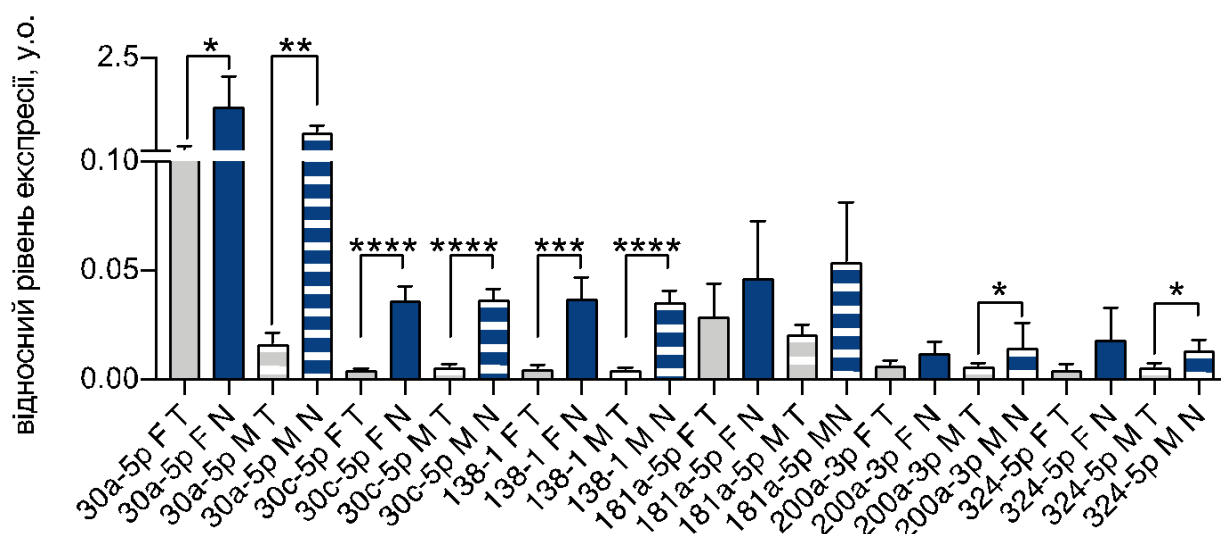


Рис. 3.6. Рівні відносної експресії мікроРНК у зразках хворих з НКК в залежності від статі. F – жінки, M – чоловіки, T – хворі з раком нирки, N – здорові донори. * – різниця статистично значуща за $p \leq 0,05$, ** – різниця статистично значуща за $p \leq 0,001$, *** – різниця статистично значуща за $p \leq 0,0001$, **** – різниця статистично значуща за $p < 0,0001$

З усіх досліджуваних мікроРНК, для hsa-miR-181a-5p не було визначено достовірної різниці у визначених рівнях концентрацій в зразках пухлин та прилеглих умовно-нормальних тканин хворих за статтю.

Важливість отриманих результатів та їхня можлива діагностична значимість підтверджуються і аналізом ROC-кривих з визначенням площі під кривою (AUC) (рис. 3.7, рис. 3.8).

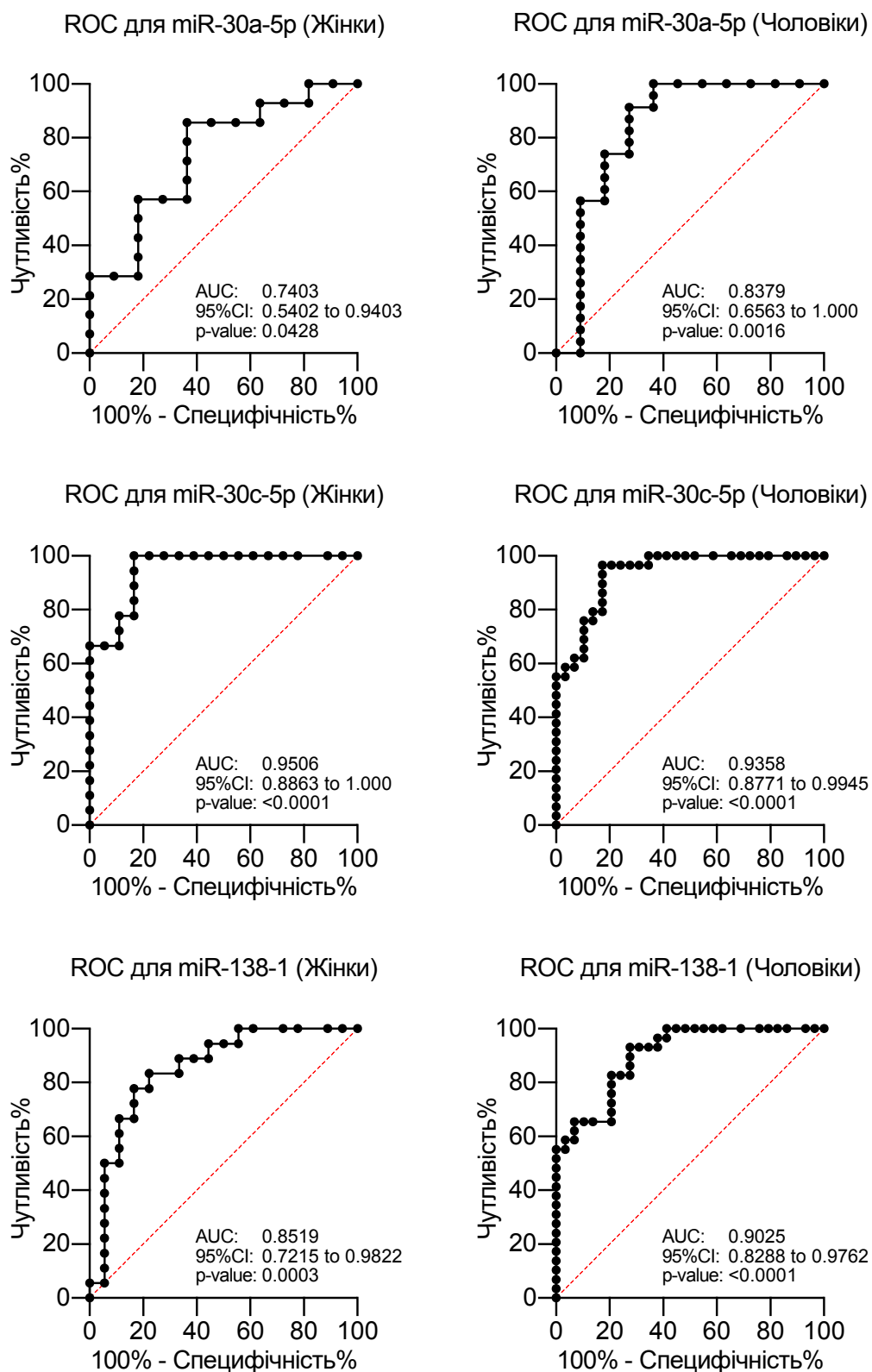


Рис. 3.7. Аналіз ROC-кривих показників концентрацій мікроРНК hsa-miR-30a-5p, hsa-miR-30c-5p та hsa-miR-138-1 у пухлинах НКК у порівнянні з показниками в умовно-нормальних тканинах нирки, залежно від статі пацієнтів

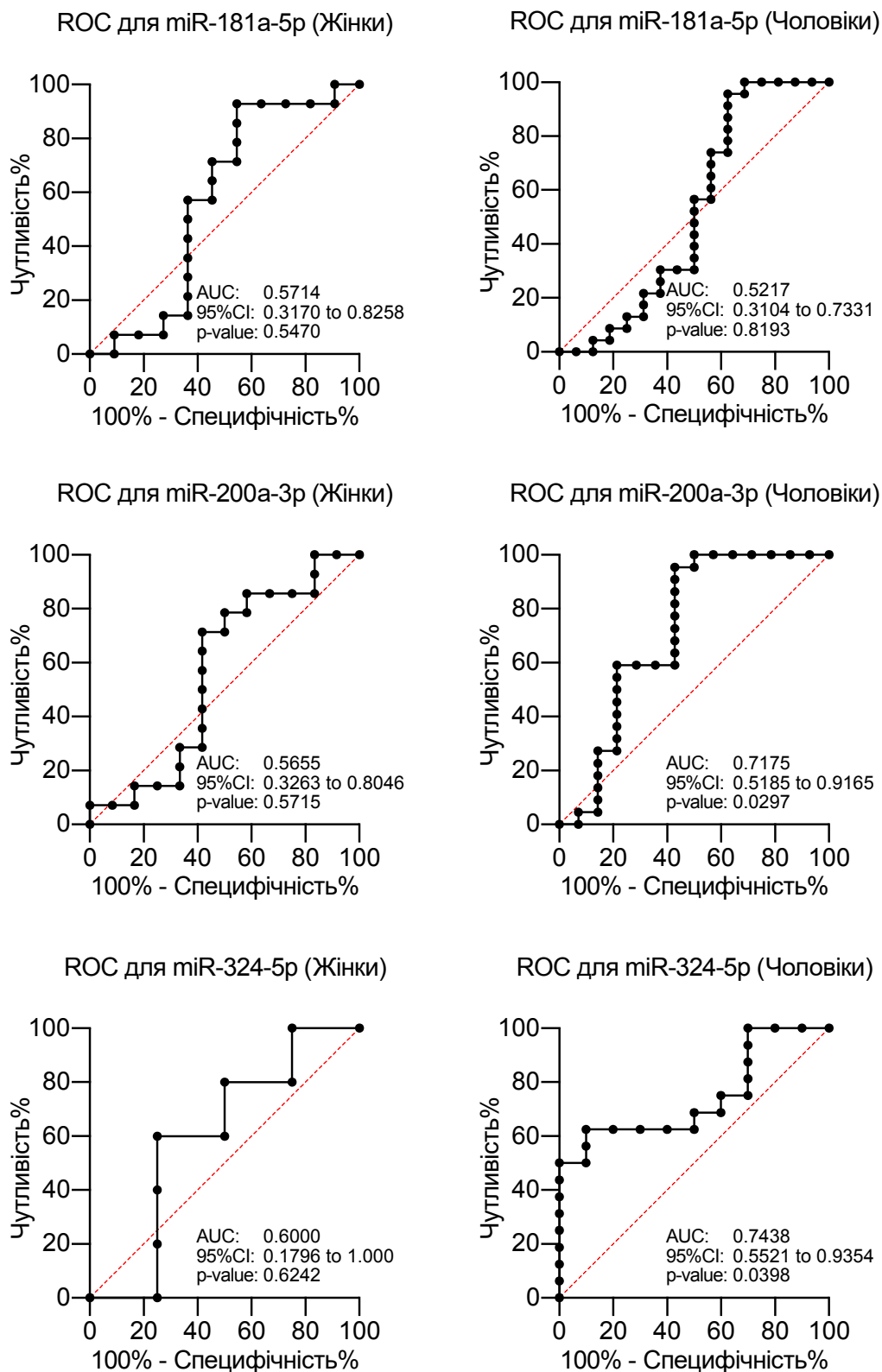


Рис. 3.8. Аналіз ROC-кривих показників концентрацій мікроРНК hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-200a-3p та hsa-miR-324-5p у пухлинах НКК у порівнянні з показниками в умовно-нормальних тканинах нирки, залежно від статі пацієнтів

Аналіз результатів кількісної ПЛР показав, що використання запропонованих мікроРНК-маркерів доречно використовувати не для всіх вікових груп населення. Пацієнти були поділені на 3 групи: I – індивідууми віком від 23 до 54 років, II – віком від 55 до 64 років, та III група – від 65 до 78 років. Контрольні групи підбиралися відповідно. Тільки для hsa-miR-30c-5p та hsa-miR-138-1 визначена достовірна різниця в усіх вікових категоріях (рис. 3.9). Ще для трьох мікроРНК була визначена достовірна різниця для деяких вікових груп: для hsa-miR-30a-5p – для I і II вікових груп, для hsa-miR-200a-3p – для II вікової групи. (рис. 3.9).

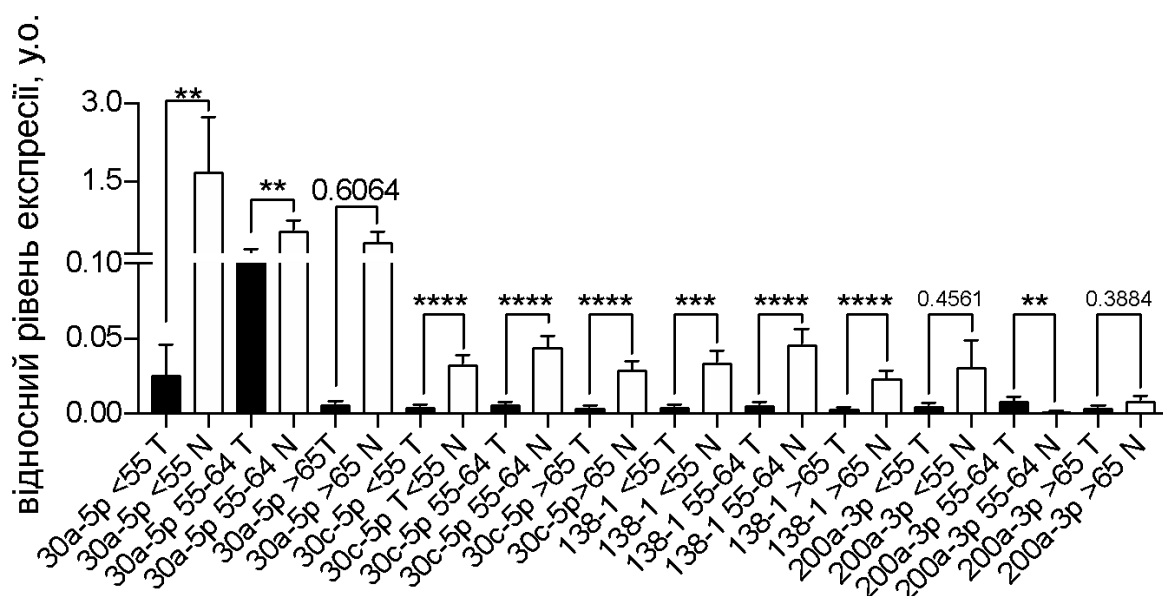


Рис. 3.9. Рівні відносної експресії мікроРНК у зразках хворих (Т) трьох вікових груп з новоутвореннями нирки по відношенню до умовно-нормальних тканин (N)

**– різниця статистично значуща за $p \leq 0,001$

***– різниця статистично значуща за $p \leq 0,0001$

****– різниця статистично значуща за $p < 0,0001$

Важливими показниками прогресії хвороби є стадія, розмір і поширеність пухлини (TNM) та морфологія клітин за Фурман.

Достовірно зниження кількості мікроРНК в зразках хворих з першою та другою стадіями розвитку світлоклітинної нирково-клітинної карциноми (скНKK) по відношенню до контрольних тканин було визначено для hsa-miR-30a-5p, hsa-miR-30c-5p та hsa-miR-138-1 (рис. 3.10). Для мікроРНК miR-30a-5p відмічено також достовірну різницю концентрацій між I та II стадіями прогресії пухлин (рис. 3.10 та рис. 3.11). Тож вона може використовуватися для більшої деталізації хвороби.

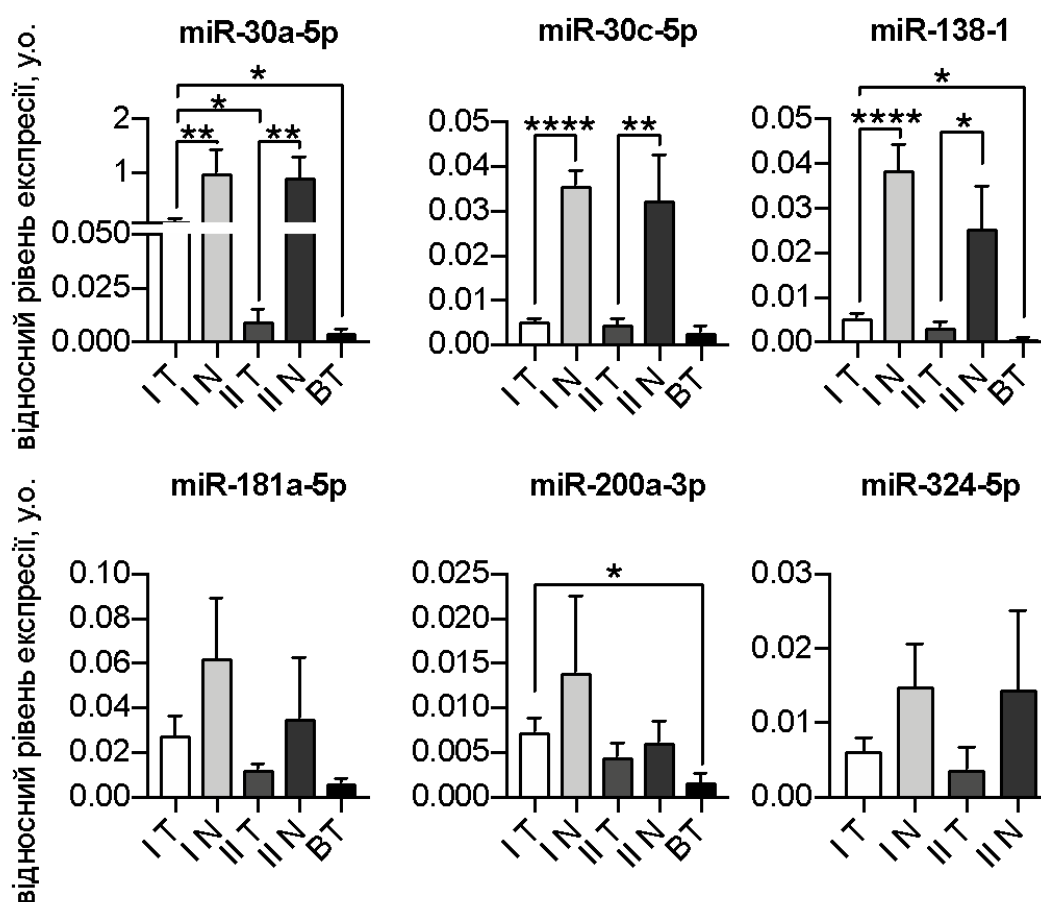


Рис. 3.10. Рівні відносної експресії мікроРНК у пухлинах скНKK (T) на різних стадіях хвороби (I та II) по відношенню до умовно-нормальних тканини (N) та доброякісних новоутворень нирки (BT)

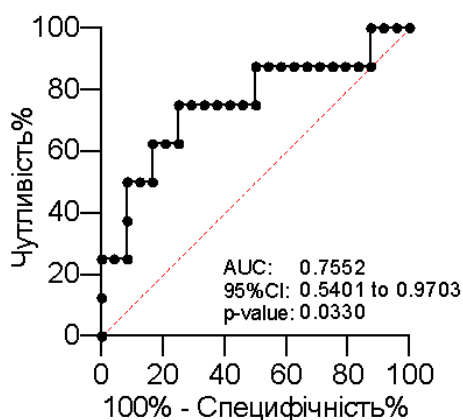
*— різниця статистично значуща за $p \leq 0,05$

**— різниця статистично значуща за $p \leq 0,001$

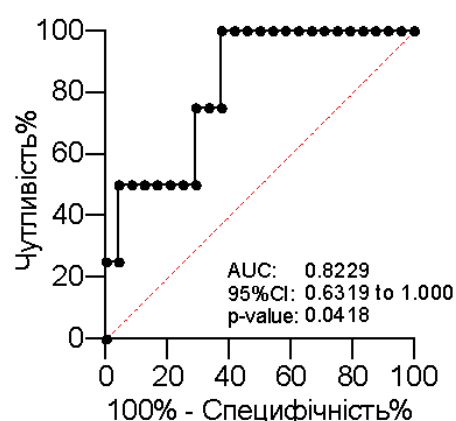
****— різниця статистично значуща за $p < 0,0001$

Визначення значень площі під кривою (AUC) при аналізі ROC-кривих підтверджує можливу діагностичну значимість отриманих даних щодо розрізнення I та II стадій хвороби за мікроРНК miR-30a-5p (рис. 3.11 а), а також можливість розрізнити I стадію та доброякісне походження пухлин нирки за даними для мікроРНК miR-30a-5p, miR-138-1 та miR-200a-3p (рис. 3.11 б, в, г).

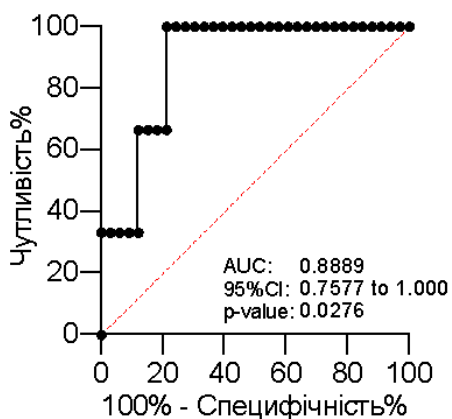
а ROC для miR-30a-5p стадія I та II



б ROC для miR-30a-5p стадія I та BT



в ROC для miR-138-1 стадія I та BT



г ROC для miR-138-1 стадія I та BT

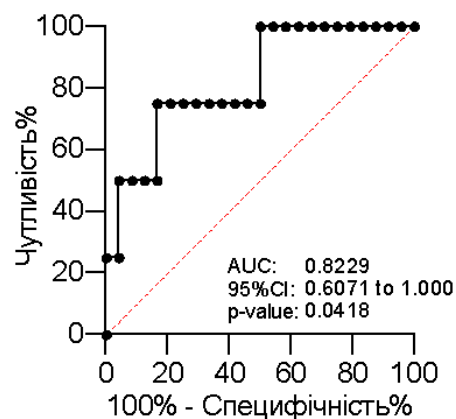


Рис. 3.11. Аналіз ROC-кривих показників концентрацій мікроРНК у зразках хворих з скНKK у порівнянні з показниками хворих з доброякісними пухлинами нирки (BT), залежно від стадії хвороби (I та II стадії)

З огляду на можливість використання досліджуваних мікроРНК в подальшому як діагностичних маркерів для визначення розміру і поширеності

пухлини (TNM) було з'ясовано, що hsa-miR-30a-5p, hsa-miR-30c-5p та hsa-miR-138-1 мають достовірну різницю експресії з контролем для пухлин нирки обох перших стадій: до 7 см (T1N0M0) та понад 7 см (T2N0M0) в найбільшому розмірі. Однак достовірної різниці у концентраціях мікроРНК не виявлено для того, щоб розрізнити пухлини за розміром (рис. 3.12).

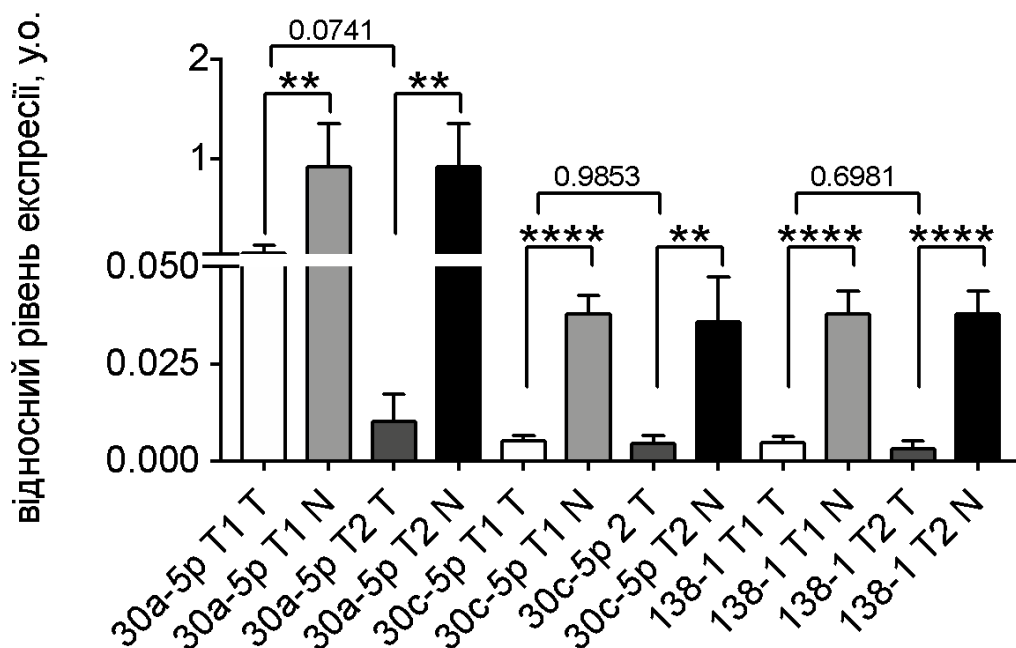


Рис. 3.12. Рівні відносної експресії мікроРНК в пухлинах хворих з скНKK (T1, T2) різного ступеню злоякісності (TNM) по відношенню до експресії в умовно-нормальних тканинах (N)

**– різниця статистично значуща за $p \leq 0,001$

****– різниця статистично значуща за $p < 0,0001$

При аналізі даних щодо різниці градації атипії клітин за Фурман (Fuhrman), що є однією з основних характеристик злоякісності саме пухлин нирки для вибору стратегії лікування таких хворих, були отримані достовірні результати різниці щодо hsa-miR-30c-5p та hsa-miR-138-1 для трьох категорій даних (G1, G2 та G3+4). Для hsa-miR-30a-5p різниця достовірна для стадій G1 та G2 по відношенню до контролю. Для hsa-miR-324-5p різниця виявлена для

стадій G2 та G3+4. Крім того, визначено асоціацію показників концентрацій мікроРНК та стадіями градації за Фурман: hsa-miR-138-1 – для розрізнення G2 від G3+4 стадії, hsa-miR-200a-3p – для розрізнення стадій G1 та G2 від G3+4 (рис. 3.13).

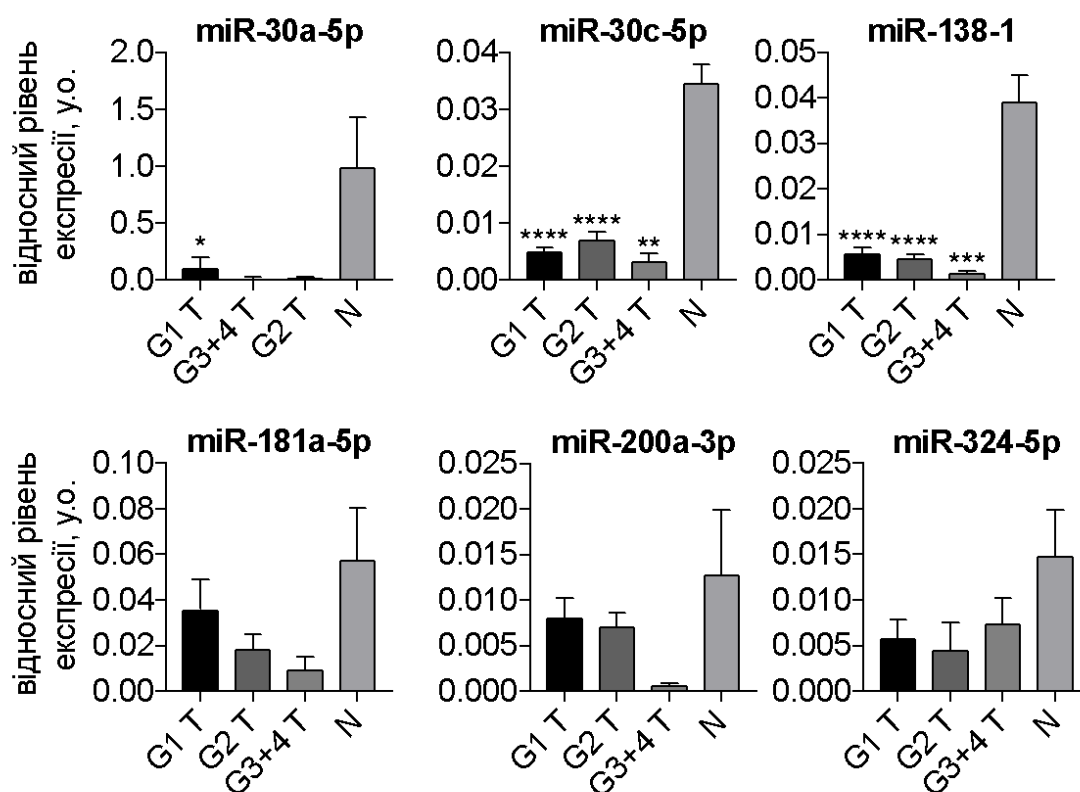


Рис. 3.13. Рівні відносної концентрації мікроРНК у зразках хворих на скННК (Т) у порівнянні з умовно-здоровою тканиною (N), визначені за таким показником як атипія клітин за Фурман

*– різниця статистично значуща за $p \leq 0,05$

**– різниця статистично значуща за $p \leq 0,001$

***– різниця статистично значуща за $p \leq 0,0001$

****– різниця статистично значуща за $p < 0,0001$

Показники визначених концентрацій для досліджуваних мікроРНК, що давали можливість розрізнити стадію хвороби за таким параметром, як атипія за

Фурман, були проаналізовані з побудовою ROC-кривих та визначенням площі під кривою (рис. 3.14). Ці результати показали, що використання hsa-miR-200a-3p – для розрізнення стадій G2 від G3+4 має надзвичайно високе значення площі під ROC-кривою ($AUC=1.0$, рис. 3.14 а), а також для розрізнення стадій G1 від G3+4 ($AUC=0,9792$, рис. 3.14 б), що робить його беззаперечним маркером цього показника. Можливе використання hsa-miR-138-1 – для розрізнення G2 від G3+4 стадії також має високий діагностичний потенціал ($AUC=0,8333$, рис. 3.14 в).

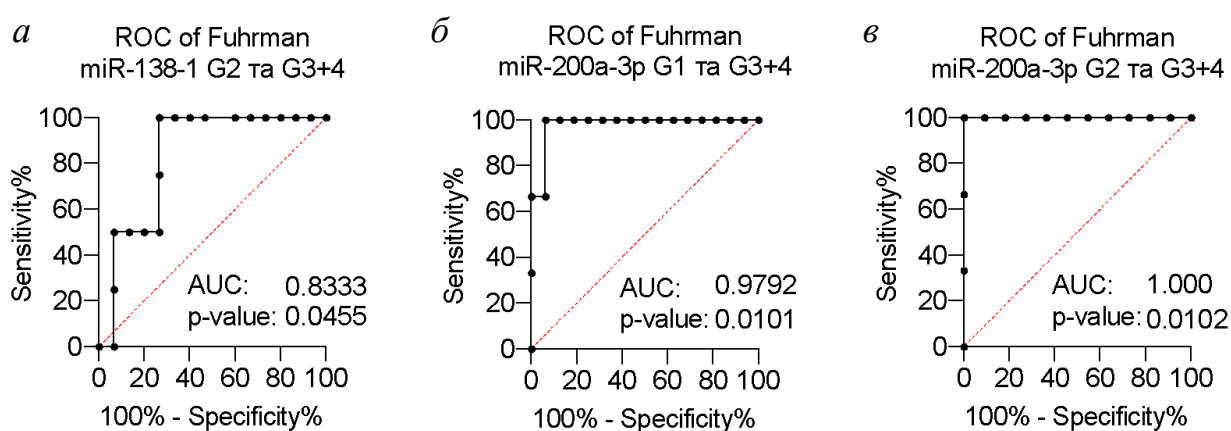


Рис. 3.14. Аналіз ROC-кривих показників концентрацій мікроРНК у пухлинах скНKK відносно умовно-нормальних тканин нирки в залежності від стадії хвороби відповідно до параметрів атипії морфології клітин за Фурман

Таким чином, підсумовуючи проаналізовані дані, можемо зробити висновки, щодо можливості використання в подальшому значень концентрації мікроРНК hsa-мікроРНК: hsa-miR-30a-5p, hsa-miR-30c-5p, hsa-miR-138-1, hsa-miR-324-5p та hsa-miR-200a-3p в пухлинах нирки для уточнювальної діагностики раку нирки та диференційного визначення таких показників як стадія хвороби, розмір пухлини та градація клітин за Фурман. Отримані дані також дають змогу для використання визначених мікроРНК для перевірки в плазмі крові з метою складання діагностичних наборів.

Оскільки показники експресії мікроРНК у пухлині з великою вірогідністю можуть відповідати відображенню у плазмі крові, можливо буде розробити діагностичні системи з урахуванням віку та статі досліджуваних осіб, що забезпечить більшу чутливість таких систем.

Для ранньої діагностики світлоклітинної карциноми нирки у жінок варто скласти набір для визначення мікроРНК hsa-miR-30a-5p, hsa-miR-30c-5p та hsa-miR-138-1. Крім можливості визначити за зниженням експресії цих мікроРНК новоутворень нирки, показники для мікроРНК miR-30a-5p можуть вказати стадію розвитку пухлини (I, II стадія злоякісності чи доброякісна пухлина). Також використання мікроРНК hsa-miR-138-1 може бути додатковим підтвердженням висновку щодо належності передбачуваного ноутворення нирки до доброякісної пухлини, та, в разі скНKK, розрізнити ступінь диференціації клітин за Фурман (G2 або G3+4 стадії).

Тест-система для ранньої діагностики раку нирки у чоловіків може мати додаткові набори для визначення мікроРНК hsa-miR-324-5p та hsa-miR-200a-3p. Їх використання може бути додатковими маркерами: hsa-miR-324-5p знижена у хворих чоловіків, на відміну від жінок, а зниження hsa-miR-200a-3p може допомогти у визначенні доброякісного типу пухлини та визначення зміни морфології клітин за Фурман (G1 від G3+4 стадії або G2 від G3+4 стадії) в разі світлоклітинної пухлини нирки.

Висновки до підрозділу 3.1

Виходячи з опублікованих даних в міжнародних виданнях, та спираючись на аналіз баз даних мікроРНК *on-line* ресурсів TargetScan та DIANA, було обрано декілька мікроРНК - кандидатів для аналізу їхньої експресії у зразках пухлин як потенційних біомаркерів канцерогенезу нирки: hsa-miR-30a-5p, hsa-miR-30c-5p, hsa-miR-138-1, hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-200a-3p, hsa-miR-324-5p.

Виявлено зміни експресії мікроРНК hsa-miR-30a-5p, hsa-miR-30c-5p, hsa-miR-138-1, hsa-miR-324-5p, hsa-miR-181a-5p та hsa-miR-200a-3p у новоутвореннях нирки в порівнянні зі здоровою контрольною тканиною.

Вперше показано достовірне зниження мікроРНК hsa-miR-30a-5p у пацієнтів з II стадією світлоклітинної карциноми нирки, на відміну від I стадії (AUC=0,7552)

Вперше показана доцільність використання показників експресії мікроРНК hsa-miR-30a-5p (AUC=0,8229), hsa-miR-138-1 (AUC=0,8889) та hsa-miR-200a-3p (AUC=0,8229) для можливості встановлення I стадії чи доброякісності пухлин нирки.

Вперше було з'ясовано, що hsa-miR-30a-5p, hsa-miR-30c-5p та hsa-miR-138-1 мають достовірне зниження експресії у порівнянні зі здоровим контролем для визначення пухлин нирки перших стадій (розміром до 7 см (T1N0M0) та понад 7 см (T2N0M0)).

Вперше показана кореляція зниження кількості мікроРНК hsa-miR-30c-5p, hsa-miR-138-1, hsa-miR-200a-3p та hsa-miR-324-5p в пухлинах нирки з градаціями атипії пухлинних клітин за Фурман.

Вперше визначено набори мікроРНК, які можуть бути використані для уточнювальної діагностики новоутворень нирки за такими клініко-морфологічними показниками: стадія, класифікація TNM, атипія клітин за Фурман

Результати досліджень, викладені у підрозділі, опубліковані в працях:

1. Войціцький Т. В., Дашенко М. С., **Онищенко К. В.** , Григоренко В.М., Перета Л.В., Скрипкіна І. Я. Визначення рівня експресії мікроРНК miR-30c-5p у плазмі крові як діагностичного біомаркеру світлоклітинного раку нирки. науково-практична конференція молодих вчених «Фундаментальна медицина:

інтегральні підходи до терапії хворих з онкопатологією», м.Київ Онкологія, 2019, Т.21, №1, с.60

2. T.V. Voitsitskyi, M. S. Dashchenko, **K. V. Onyshchenko**, V. M. Grygorenko, L. V. Pereta, A.P. Onyshchuk, I. Ya. Skrypkin. miR-138-1 expression in tumor and patient blood plasma as diagnostic biomarker of clear cell renal cell carcinoma. XVI Міжнародна наукова конференцій студентів, молодих вчених та фахівців "Актуальні питання сучасної медицини", Збірка тез, Харків, 2019, с.377

3. **K. Onyshchenko**, T. V. Voitsitskyi¹, Grygorenko V. M., L. V. Pereta, I. Ya. Skrypkin. HSA-MIR-30A-5P and HSA-MIR-200C-3P expression in tumor and patient blood plasma as diagnostic biomarker of clear cell renal cell carcinoma. XIII IMBG All-Ukrainian Conference of Young Scientists. Biopolymers and Cell. 2019. Vol. 35. N 5, P.402

4. **Onyshchenko K.V.**, Voitsitskyi T.V., Grygorenko V.M., Saidakova N.O., Pereta L.V., Onyschuk A.P., Skrypkin I.Ya. Expression of micro-RNA hsa-miR-30c-5p and hsa-miR-138-1 in renal cell carcinoma. Exp Oncol. 2020;42(2):115-119. DOI: 10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-42-no-2.14632.

3.2. Виділення позаклітинної ДНК плазми крові та геномної ДНК з пухлин і навколопухлинних тканин хворих з раком нирки та оцінка їх якості

Для коректного аналізу рівня циркулюючої пкДНК в крові слід дуже ретельно відділити ДНК-вмісні клітини крові від плазми, аби помилково не отримати завищені рівні ДНК, які не відповідають реальним процесам в організмі. З цією метою нами було використано поетапне м'яке фракціонування клітин крові таким чином, щоб у процесі отримання безклітинної складової не підвищити рівень циркулюючої пкДНК за рахунок вивільнення ДНК з лейкоцитарної фракції.

Якість виділеної пкДНК з плазми крові та геномної ДНК пухлин та навколопухлинних тканин перевіряли за допомогою ПЛР з використанням праймерів до гену *GAPDH*.

Після електрофоретичного розділення продуктів ПЛР в агарозному гелі на електрофорезі мають виявлятися смуги розміром 145 п.н., що відповідають фрагментам гена *GAPDH* для апоптичної пкДНК (рис. 3.15 а) та смуги, розміром 496 п.н., що відповідають фрагменту гена *GAPDH* для гДНК (рис. 3.15 б). На доріжках, де розділяються фрагменти ПЛР пкДНК можуть виявлятися додаткові смуги більшого розміру, що свідчить про присутність високомолекулярної пкДНК, і отже – більш важкої форми захворювання. Наявність таких високомолекулярних ДНК може бути наслідком некрозного руйнування клітин пухлини, або виділення гДНК окремих клітин пухлини, що попадають у кров'яне русло внаслідок відокремлення клітин пухлини на більш пізніх стадіях хвороби.

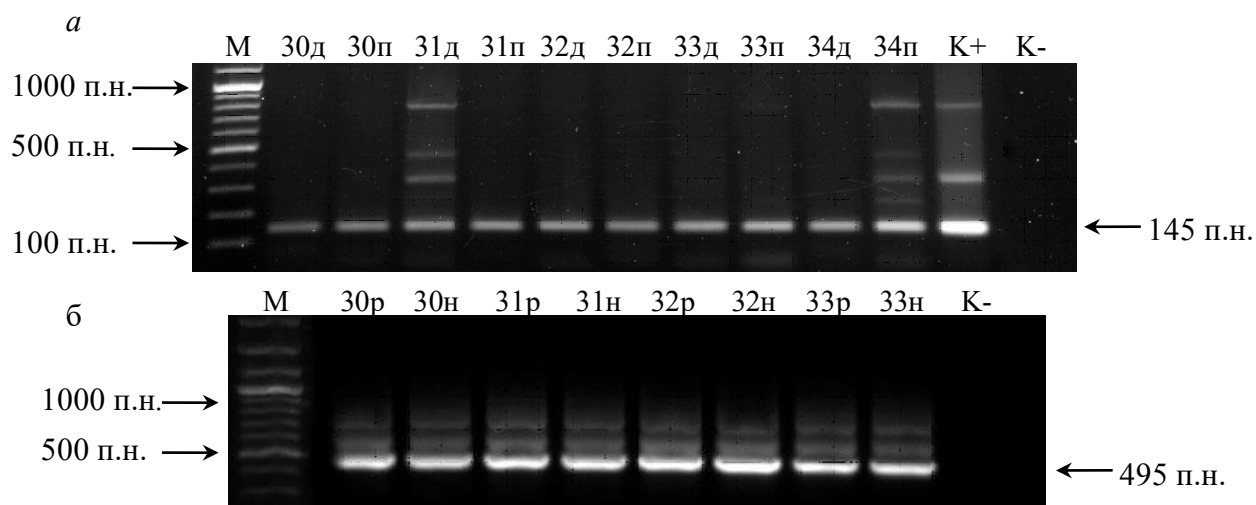


Рис. 3.15. Електрофореграма продуктів ПЛР зразків ДНК хворих на рак нирки з праймерами до гена *GAPDH*: а) ПЛР на доопераційному (д) і післяопераційному (п) матеріалі позаклітинної ДНК хворих з раком нирки, б) ПЛР на геномній ДНК пухлин нирок (р) та умовно нормальних тканин нирок (н); К- – негативний контроль ПЛР без додавання матриці; М – маркер молекулярних мас GeneRuler™ DNA Ladder Mix («Thermo Scientific», США)

Це підтверджується і тим фактом, що на пкДНК здорових донорів такі смуги не виявляються. Знижений рівень концентрації пкДНК у здорових донорів, по відношенню до онкохворих, підтверджується і при визначенні концентрації за допомогою спектрофотометру NanoDrop 2000 (ThermoScientific, США), що дозволяє з високою точністю визначати концентрації ДНК у малих об'ємах (1-2 мкл розчину).

3.3. Аналіз мікросателітних маркерів на геномній ДНК пацієнтів з раком нирки

3.3.1. Визначення мікросателітних змін локусів генів шляхом детекції у ПААГ. Результати ПЛР до ділянок геномної ДНК, що зазнають втрати гетерозиготності (Loss of heterozygosity, LOH) по STR-маркерам внаслідок мікроделецій, були спершу проаналізовані у 8% ПААГ, інформативність якого варіювала для різних маркерів (рис. 3.16, додаток Е). Для дослідження були обрані маркери хромосоми 3 та 9 людини, втрата гетерозиготності по яких найчастіше зустрічається в пухлинах, зокрема у пухлинах нирки. STR-маркери хромосоми 3 D3S1568 та D3S966, втрата яких асоційована з інактивацією гена *RASSF1*, та D3S1038, VHL2 та D3S1317, асоційованих з інактивацією гена *VHL* та STR-маркери хромосоми 9, пов'язані з інактивацією гена *CDKN2A*: D9S916 та D9S974.

При обчисленні значення LOH інформативними вважалися ті зразки, що були гетерозиготними за досліджуваним маркером, що дозволяло обчислення за даним методом. Адже втрата гетерозиготності визначалася обчисленням відношення інтенсивностей двох алелів зі зразка пухлини до зразка прилеглої умовно-нормальної тканини, який служив в якості еталонної ДНК.

У разі виявлення гомозиготи за досліджуваним маркером таке обчислення стає неможливим. Також неінформативними були зразки, на ДНК яких не могли отримати продукт ПЛР до досліджуваних маркерів. З огляду на те, що всі ДНК попередньо перевірялися після виділення на присутність референсного гена *GAPDH*, ми припускаємо, що в цих зразках велика кількість ДНК могла мати протяжні делеції хромосом 3 та 9, що характерні для пухлин нирки і ми візуально не змогли детектувати продукт із-за невеликої його кількості. Це підтвердилося і подальшим аналізом методом візуалізації флуоресцентно мічених фрагментів ПЛР, який має набагато більшу чутливість.

Отримані нами результати показали втрату гетерозиготності по STR-маркеру D3S1568 гена *RASSF1* у 16 з 62 інформативних зразків (ІЗ) ДНК пухлин пацієнтів з скНKK (25,8%) та по маркеру D3S966 – у 10 з 64 інформативних ДНК пухлин (15,6%) (рис. 3.16 а, б, рис. 3.17, Таблиця Г.1 додатку Г). В той же час аналіз результатів ПЛР за STR-маркером D3S1038 гена *VHL* показав втрату гетерозиготності у 31,7% (19 з 60 ІЗ), за маркером VHL2 – у 25,0% (11 з 44 ІЗ) та за STR-маркером D3S1317 – у 21,4% (12 з 56 ІЗ) пацієнтів зі світлоклітинним раком нирки (рис. 3.16 в, г, рис. 3.17). Для маркерів, зміна яких асоційована з втратою гена *CDKN2A*, було виявлено втрату гетерозиготності у 6 з 34 ІЗ D9S916 (17,6%) та у 9 з 44 ІЗ D9S974 (20,5%) (рис. 3.16, рис. 3.17, Таблиця 3.2).

Одночасні делеції 7-ми досліджуваних маркерів не були детектовані у жодному з проаналізованих зразків. З 50-ти зразків, у яких визначали LOH по усіх 7-ми маркерах, 76% ДНК пухлин скНKK (38 зразків) зазнавали втрати хоча б 1-го маркера, 42 – 2х (21 зразок), 24 – 3-х (12 зразків), 8% - 4х (4 зразки) і у 4% зразків (2 зразки) було визначено одночасну втрату гетерозиготності по 5 маркерах.

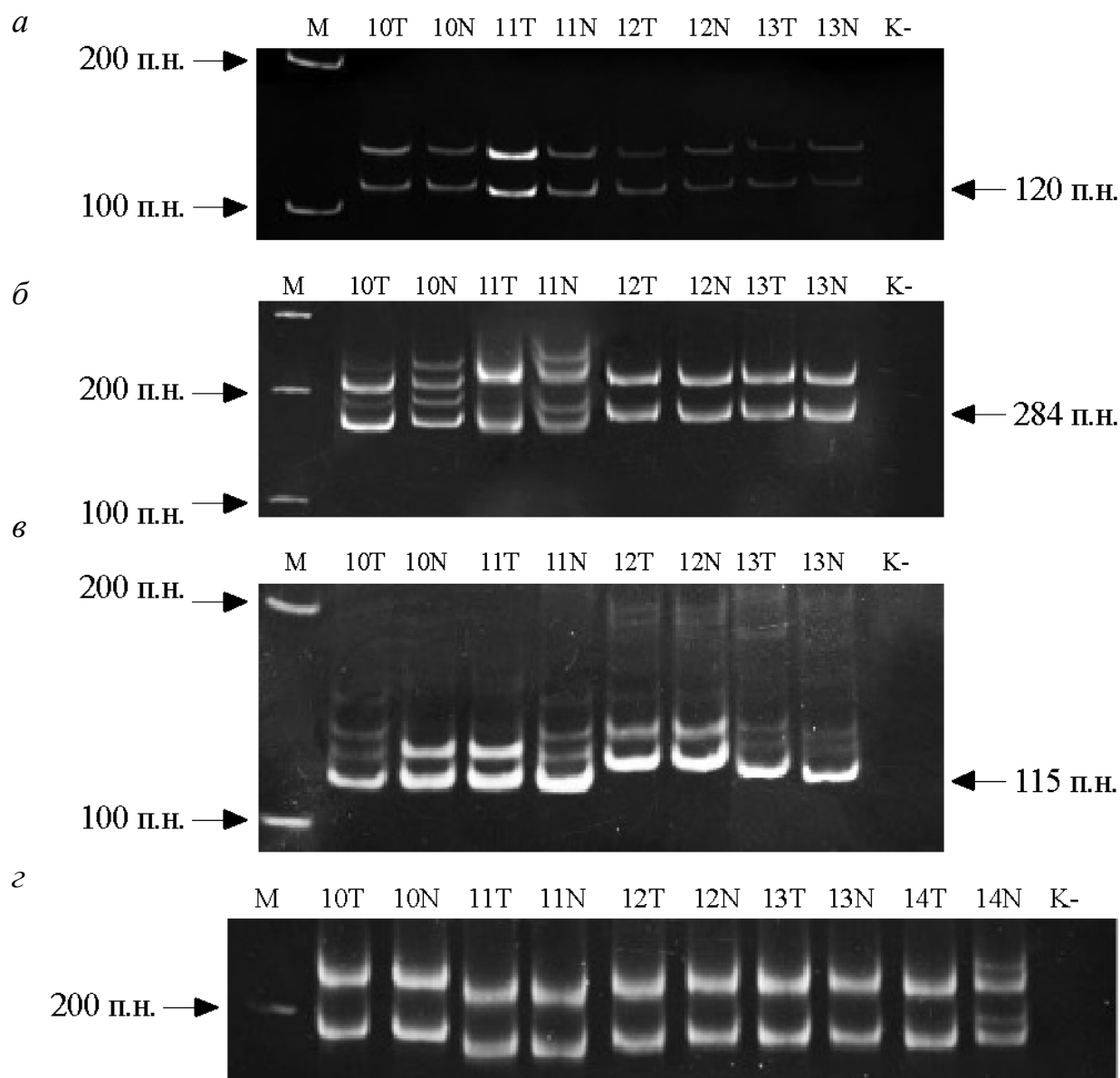


Рис. 3.16. Електрофореграма продуктів ПЛР зразків геномної ДНК, виділених з біопсій пухлин (Т) та умовно-нормальних тканин нирки пацієнтів з скННКК: *а*) ПЛР з використанням праймерів до мікросателітного маркеру D3S966 гена *RASSF1*; *б*) ПЛР з використанням праймерів до мікросателітного маркеру D3S1568 гена *RASSF1*; *в*) ПЛР з використанням праймерів до мікросателітного маркеру D3S1038 гена *VHL*; *г*) ПЛР з використанням праймерів до мікросателітного маркеру D3S1317 гена *VHL*. К- – негативний контроль ПЛР без додавання матриці; М – маркер молекулярних мас GeneRuler™ DNA Ladder Mix

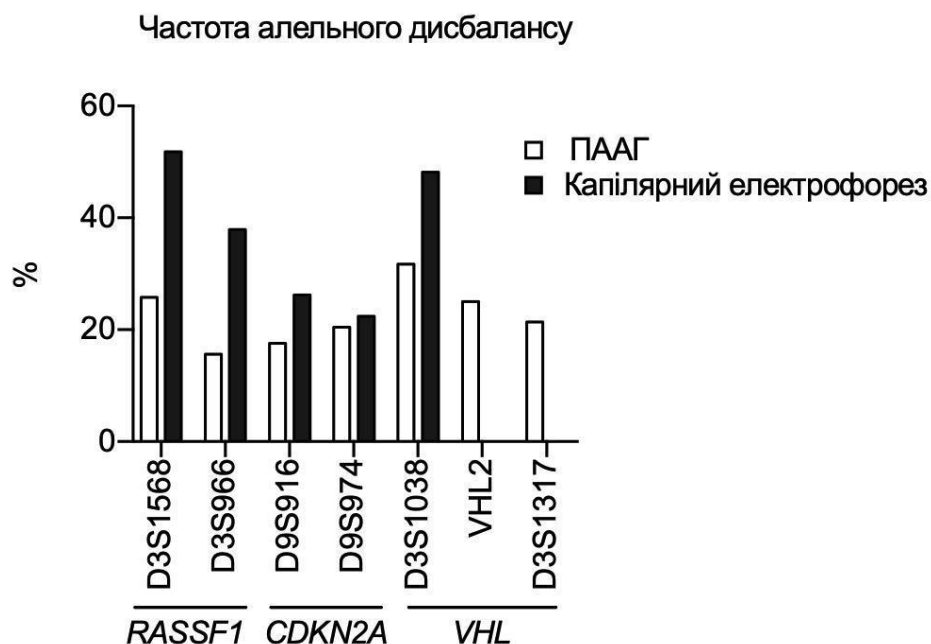


Рис. 3.17. Кількість зразків пухлин скНKK, в яких було виявлено мікросателітні зміни по маркерах D3S966, D3S1568, D3S1038 та D3S1317 хромосоми 3 та D9S916 та D9S974 хромосоми 9 на геномній ДНК

Сумарна інформативність обох маркерів для гена *RASSF1* склала 97% (70 з 72 зразків) і сумарну втрату гетерозиготності у 37% зразків (26 з 70 ІЗ). Для гена *VHL* – інформативність по всім маркерам склала 90% (65 з 72), та LOH – 37 (24 з 72 ІЗ). Для гена *CDKN2A* загальна інформативність використання маркерів склала 98% (49 зразків з 50), а втрата гетерозиготності по двом маркерам виявилася у 26,5% інформативних зразків з пухлин скНKK (Таблиця 3.2).

Нижча інформативність використання маркерів D3S1038 та D3S1317 гена *VHL* (90%) проти маркерів D3S1568 та D3S966 для визначення алельного дисбалансу гена *RASSF1* (97%) пояснюється тим, що на короткому плечі хромосоми 3 людини нирки спостерігаються не тільки мікросателітні зміни, але й втрати більш довгих ділянок ДНК при деяких типах раку, а також при

світлоклітинній карциномі нирки, що частіше пов'язано саме з ділянкою гена Фон Гіппеля-Ліндау (*VHL*). Саме тому з порушеннями цього гену спершу пов'язували розвиток раку нирки [195]–[197].

Таблиця 3.2

Результати визначення мікросателітних змін зразків ДНК пухлин, отриманих від хворих з скНKK

Ген	Маркер	Інформативність маркера		Частота алельного дисбалансу*	
		ПААГ	Капілярний електрофорез з	ПААГ	Капілярний електрофорез
<i>RASSF1</i>	D3S1568	86,1%	88,9%	25,8%	51,8%
	D3S966	88,9%	92,0%	15,6%	37,9%
Всього	<i>RASSF1</i>	97,2%	100%	37,1%	68,3%
<i>VHL</i>	D3S1038	83%	93,3%	31,7%	48,2%
	VHL2	88%	-	25,0%	-
	D3S1317	78%	-	21,4%	-
Всього	<i>VHL</i>	86%	93,3%	48%	48,2%
<i>CDKN2A</i>	D9S916	68%	89,7%	17,6%	26,2%
	D9S974	88%	72,1%	20,5%	22,4%
Всього	<i>CDKN2A</i>	98%	98,5	26,5%	32,8%
Разом	<i>RASSF1</i> + <i>VHL</i> + <i>CDKN2A</i>	100%	100%	76%	81,7%

* відносно інформативних зразків

Деякі, раніше проведені дослідження, показали зв'язок втрати гетерозиготності та наявності мутації в гені *VHL*, а отже і інактивації цього гена у пухлинах НКК з більш сприятливим прогнозом для пацієнтів [108], [198]. В нашому дослідженні ми провели кореляційний аналіз клініко-патологічних параметрів пухлин, а також аналіз виживаності досліджуваної групи пацієнтів в залежності від наявності або відсутності втрати гетерозиготності в генах *VHL* та *RASSF1*, але будь-яких статистично значущих асоціацій виявлено не було ($p < 0.05$).

Отримані нами результати в даному дослідженні не співпадають з даними, отриманими іншими дослідниками, що може бути пов'язаним з особливістю української популяції хворих. Також низька інформативність використання даних маркерів та не високий результат з детекції мікросателітних змін може пояснюватись низькою роздільною здатністю електрофорезу у поліакіламідному гелі, де можна виявити втрату тільки не менше ніж 4-6 п.н., в той час, коли різниця може бути у втраті 2 п.н. в більшості обраних маркерів.

Тому для розділення фрагментів ПЛР додатково використовували більш точний метод фрагментного аналізу, що проводили на автоматичному ДНК-аналізаторі «Genetic Analyser 3130» (Applied Biosystems, США), за допомогою якого можна виявити навіть одонуклеотидний поліморфізм.

3.3.2. Визначення мікросателітних змін локусів генів шляхом детекції за допомогою капілярного електрофорезу. Застосування фрагментного аналізу мікросателітних маркерів за допомогою розділення флуоресцентно-мічених ПЛР-фрагментів підвищило інформативність використання досліджуваних STR-маркерів, що асоційовані з генами *RASSF1*, *CDKN2A* та *VHL* (Таблиця 3.2). Це дозволило виявити алельний дисбаланс у більшій кількості зразків і підвищити достовірність використання даних маркерів для характеристики пухлин світлоклітинного раку нирки. Не дивлячись на використання меншої кількості маркерів, що асоційовані з втратою ділянок генів, розташованих на хромосомах 3 (*RASSF1* та *VHL*) та 9 людини (*CDKN2A*), і порушення яких характерне для пухлин нирки, застосування більш чутливого методу детекції ЛОН дозволило виявити більший відсоток втрати гетерозиготності у досліджуваних пухлинах.

Визначення довжини та кількості флуоресцентно-мічених фрагментів (рис. 3.18, рис. 3.19), що містять STR-маркери, показало 89% (56 з 63 зразків) інформативності для маркера D3S1568 та 92% (58 з 63 зразків) для маркера D3S966 гена *RASSF1* (Таблиця 3.2). Для маркера D3S1038 гена *VHL*

інформативність становила 93% (56 з 60 зразків), для D9S916 та D9S974 гена *CDKN2A* – 90% (61 з 68) та 72% (49 з 68) відповідно (Таблиця 3.2).

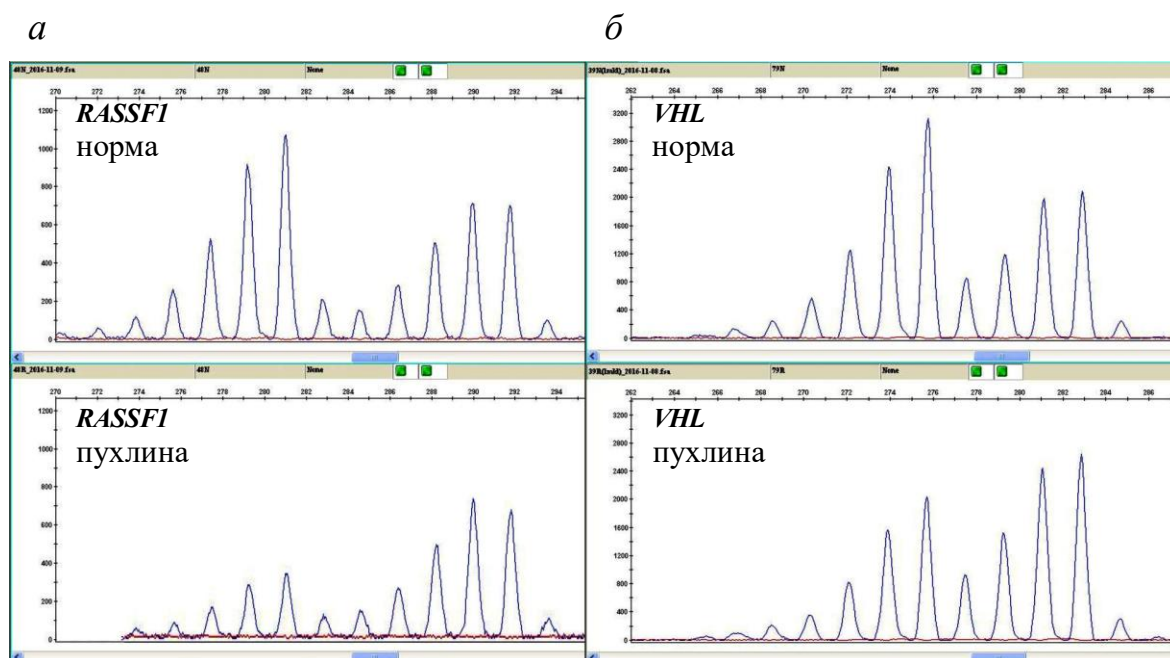


Рис. 3.18. Приклад результатів аналізу втрати гетерозиготності (LOH) за мікросателітними маркерами D3S1568 (а) та D3S1038 (б), виявлений у ДНК пухлин пацієнтів зі світлоклітинною карциномою у порівнянні з прилеглою умовно-нормальною тканиною нирки того ж пацієнта. Флуоресцентно-мічені фрагменти ПЛР розділяли за допомогою капілярного гель-електрофорезу на генетичному аналізаторі і оцінювали за допомогою програми GeneMapper V3.0. Абсциса вказує довжину продукту ПЛР, в той час як ордината дає інформацію про інтенсивність флуоресценції, представлена у вигляді піків

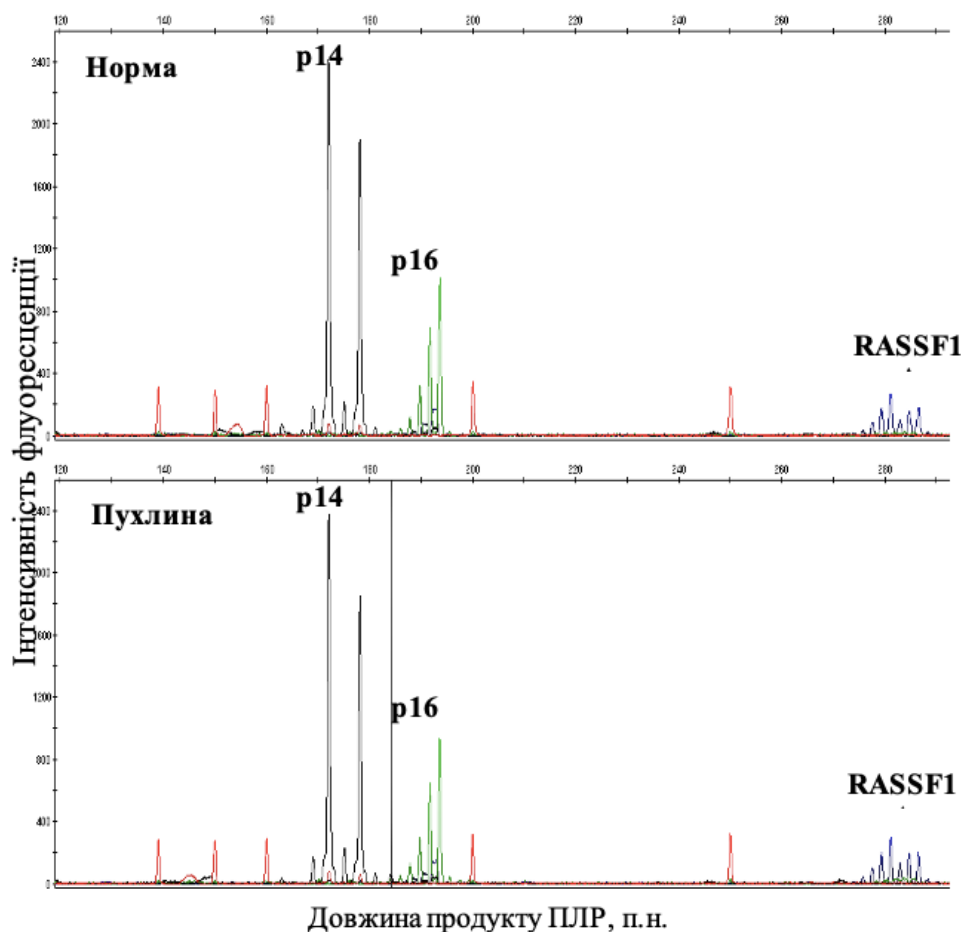


Рис. 3.19. Приклад результатів аналізу втрати гетерозиготності за мікросателітними маркерами D9S916, D9S974, D3S1568, виявлених у ДНК пухлин пацієнтів зі світлоклітинною карциномою у порівнянні з умовно-нормальною тканиною нирки того ж пацієнта. Флуоресцентно-мічені фрагменти ПЛР розділяли за допомогою капілярного гель-електрофорезу на генетичному аналізаторі Genetic Analyser 3130 і оцінювали за допомогою програмного забезпечення GeneMapper V3.0

Сумарна інформативність за досліджуваними маркерами склала для гена *RASSF1* 100% (63 з 63 зразків), сумарна втрата гетерозиготності – 38% зразків (22 з 63) пацієнтів з скНKK. Для гена *VHL* інформативність була обчислена лише по одному маркеру D3S1038, проте підвищена чутливість метода, на відміну від розділення фрагментів у ПААГ, все одно дала більший відсоток інформативності

(93%, 56 з 60 зразків). Для гена *CDKN2A* інформативність зразків по двох одночасно досліджуваних маркерах склала 99% (67 з 68 зразків).

Аналіз результатів розділення флуоресцентномічених фрагментів ПЛР-STR виявив втрату гетерозиготності по маркеру D3S1568 гена *RASSF1* у 29 з 56 інформативних зразків ДНК пухлин скНKK пацієнтів (52%) та по маркеру D3S966 – у 22 з 58 ІЗ пухлин (38%) (рис. 3.18, Таблиця 3.2). В той же час аналіз результатів ПЛР за маркером D3S1038 гена *VHL* виявив втрату гетерозиготності у 48% (27 з 56 ІЗ) пацієнтів зі світлоклітинним раком нирки, а для маркерів гена *CDKN2A* D9S916 та D9S974 – у 26% (16 з 61) та 22% (11 з 49) інформативних зразків відповідно (рис. 3.19, Таблиця 3.2). Як і у випадку аналізу за допомогою розділення фрагментів у ПААГ, одночасне детектування втрати гетерозиготності по всім п'яти досліджуваним маркерам, виявлено не було. Проте відсоток одночасно виявлених даним методом змін маркерів 3-ї та 9-ї хромосом в пухлинах нирки був вищий.

Так, з 60-ти зразків, у ДНК яких визначили ЛОН по усіх 5-ти маркерах, у 49 зразках (81,7%) визначено втрату хоча б 1-го маркера, у 34 зразках (56,7%) – 2-х, у 15 зразках (25%) – 3-х, у 4 зразках (6,7%) – 4х STR-маркерів (додаток Е).

Кілька досліджень, проведених іншими групами науковців показали, що крім 3-ї хромосоми, критичну область втрати при раку нирки має також хромосома 9 [42], [116] і ЛОН за маркером D9S916 безпосередньо пов'язана зі стадією і метастазуванням, тобто з більш агресивним раком нирки. Однак, в нашому дослідженні більша ЛОН спостерігалася для маркерів D3S1568 (52%), D3S1038 (48%), та D3S966 (38,0%), ніж для D9S916 (26%). У дослідженні втрати гетерозиготності використовували зразки 9 померлих від онкозахворювання пацієнтів та 3х – з повторним рецидивом хвороби (1 – помер). Найбільше в цих зразках сумарно втрата гетерозиготності визначено по маркеру гена *VHL* (5 та 3 ЛОН відповідно), що підтверджує важливу участь цього гена у розвитку і прогресуванні раку нирки. Також виявлено втрату гетерозиготності і для інших маркерів. Серед 9-ти зразків ДНК з пухлин померлих внаслідок прогресування скНKK були виявлені також і гомозиготи (Hz) по досліджуваним ділянкам, тож

на таких ДНК не було можливим з'ясування мікроделецій у даних ділянках геному пухлин хворих (Таблиця 3.3).

Таблиця 3.3

Детекція втрати гетерозиготності по STR-маркерам у пацієнтів з тяжким перебігом нирково-клітинного раку

	<i>RASSF1</i>		<i>VHL</i>	<i>CDKN2A</i>	
	D3S966	D3S1568	D3S1038	D9S916	D9S974
Померлі, n=9	2 (22,2%)	3 (33,3%)	5 (55,6%)	2 +1 Hz (22,2%+1,1%)	3 +1 Hz (33,3%+11,1%)
Рецидив, n=4	1 +1 Hz (1,1%+1,1%)	3 (33,3%)	2 (22,2%)	1 (11,1%)	2 +2 Hz (22,2%+ 22,2%)

Висновки до підрозділу 3.3

Було детектовано мікросателітні зміни STR-маркерів генів *RASSF1* у 68,3%, *VHL* – у 48,2%, *CDKN2A* – 32,7% інформативних зразків досліджуваної групи хворих на рак нирки навіть на перших стадіях розвитку пухлини, що підтверджує їхню роль у розвитку цієї патології і, найбільше, гена *RASSF1*. Детектовано мікросателітні зміни STR-маркерів гена *RASSF1* у 68,3%, *VHL* – у 48,2%, *CDKN2A* – 32,7% інформативних зразків досліджуваної групи хворих на рак нирки.

Підтверджено доцільність використання методу детекції мікросателітних змін, що мають короткі повторювальні елементи (2-4 нуклеотиди), за допомогою розділення флуоресцентно-мічених фрагментів ПЛР методом капілярного електрофорезу завдяки його більшій роздільній здатності, а отже – чутливості.

Отримані нами результати підтверджують роль гена *VHL* у канцерогенезі світлоклітинної карциноми, проте статистичний аналіз отриманих даних показав недоцільність використання даних маркерів для включення цього параметру у

тест-систему ранньої діагностики раку нирки із-за низького відсотку детектованих змін.

Результати досліджень, викладені у підрозділі, опубліковані в працях:

1. **Onyshchenko K.V.**, Kashparova O.V., Dubrovskaya H., Skrypkin I.Ya. Microsatellite alterations of *RASSF1* and *VHL* and DNA integrity in renal cell carcinoma. XIV International Scientific Conference of Students, PhD Students; Young Scientists; Shevchenkivska Vesna: Biology. Ukraine, P.17-18.
2. **Onyshchenko K.V.**, Kashparova O.V., Rynditch A.V., Gryhorenko V.M., Pereta L.V., Skrypkin I. Ya. DNA methylation of *GPX3* and loss of heterozygosity of *RASSF1* and *VHL* in renal cell carcinoma. X Parnas Conference. Poland, Wrocław, 2016, P.53.
3. Дубровська Г. В., **Онищенко К. В.** Втрата гетерозиготності локусу гена *VHL* у карциномах нирки. 11 th International Young Scientists' Biology Conference "From A Molecule Up To The Biosphere". Ukraine, Kharkiv, 2016. 39-40
4. Дубровська Г.В., **Онищенко К.В.**, Перета Л.В., Кашпарова О.В., Григоренко В.М., Скрипкіна І.Я. Мікросателітні зміни та метилування гена *RASSF1* у хворих на нирково-клітинний рак. Фактори експериментальної еволюції організмів», 2018, 23, с.192-196.
DOI: <https://doi.org/10.7124/FEEO.v23.1013>
5. **Онищенко К.В.**, Дубровська Г.В., Смаль М.П., Никитченко Н.В., Григоренко В.М., Вікарчук М.В., Ролевич А.И., Гончарова Р.И., Скрипкіна І.Я. Інактивація гена-онкосупресора *CDKN2A* у злоякісних новоутвореннях нирки та сечового міхура. Анотований збірник проектів спільного конкурсу ДФФД-БРФФД - Академперіодика, 2018, с. 79-83
6. Dubrovskaya H., **Onyshchenko K.**, Kashparova O., Gryhorenko V., Pereta L., Skrypkin I. Microsatellite alterations and DNA methylation of *RASSF1* in renal cell carcinoma. 4th International Conference of Cell Biology, Cracow, Poland, 2018, P. 421

7. **Onyshchenko K.**, Kashparova O., Dubrovska H., Pereta L., Gryhorenko V., Skrypkinska I. Detection of aberrant methylation and loss of heterozygosity of cancer suppressor genes in cfDNA as markers of renal cell carcinoma. XII annual Conference of Young Scientists Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine, Biopolymers and Cell. 2018. Vol. 34. N 2. P.162
8. Дубровська Г.В., **Онищенко К.В.**, Перета Л.В., Григоренко В.М., Скрипкіна І.Я. Діагностичне та прогностичне значення гена *rassf1* у хворих на нирково-клітинний рак. Урологія, 2018 (87), 22 (4), с 24-28, DOI: 10.26641/2307-5279.22.4.2018.152471
9. **Onyshchenko K.**, Kashparova O., Dubrovska H., Pereta L., Gryhorenko V., Skrypkinska I. Genetic and epigenetic changes on plasma cell-free dna as markers of renal cell carcinoma. XI Parnas Conference – Young Scientists Forum, 2018, Ukr Biochem J, Vol.18, Special Issue, P.85.
10. Григоренко В.М., Скрипкіна І.Я., Перета Л.В., **Онищенко К.В.**, Кашпарова О.В. Патент на корисну модель № 134876 «Спосіб ранньої діагностики раку нирки». Зареєстровано в Державному реєстрі патентів України на корисну модель 10.06.2019 р.

3.4. Концентрація позаклітинної ДНК, виділеної з плазми крові хворих на рак нирки та здорових донорів

Визначення концентрації отриманої пкДНК з плазми крові 27-ми пацієнтів з раком нирки та 15-ти здорових донорів проводили двома методами: за рівнем флуоресценції інтеркаляційного барвника SYBR Green I та шляхом кількісної ПЛР у реальному часі до послідовності гена β -актину.

Використання кількісної ПЛР у реальному часі дозволило визначити статистично достовірне збільшення концентрації пкДНК в крові онкохворих у широкому діапазоні (23–1176 нг/мл плазми, медіана – 80,9 нг/мл). Як видно, ці значення для пацієнтів з НКК значно вищі у порівнянні з визначеними

концентраціями пкДНК у здорових донорів (3–147 нг/мл плазми, медіана – 35,1 нг/мл) (рис. 3.20 а, 3.21 а, Таблиця Д.1 додатку Д).

Таблиця 3.4.

Статистичні дані визначення концентрації позаклітинної ДНК пацієнтів зі світлоклітинним раком нирки методом кількісної ПЛР в реальному часі та методом інтеркаляції флуоресцентного барвника

Показник	Значення для методів	
	кількісної ПЛР в реальному часі	інтеркаляції флуоресцентного барвника
Площа під ROC-кривою	0,8049 (95% CI: 0,6602 - 0,9497)	0,7679 (95% CI: 0,6242- 0,9116)
Чутливість	62,50 %	59,80 %
Специфічність	69,30 %	67,60 %
Медіана (RCC)	80,9	235,5
Медіана (контроль)	35,1	53,7
U-критерій Манна-Уїтні	$p < 0,0008$	$p < 0,0037$

Результати вимірювання рівнів флуоресценції барвника Sybr Green I показали, що концентрації пкДНК у плазмі хворих різняться між пацієнтами та знаходиться в межах від 11 до 2249 нг/мл (медіана – 235,5 нг/мл), в той час, як розбіжності концентрацій пкДНК в плазмі здорових донорів значно менші, від 4 до 426 нг/мл (медіана – 53,7 нг/мл) (рис. 3.20 б, 3.21 б, Таблиця Д.1 додатку Д).

Результати статистичної обробки даних отриманих за допомогою використання двох методів показані в таблиці 3.4.

Відмінності в абсолютних значеннях концентрації пкДНК, визначеної двома різними методами, можуть бути наслідком підвищеного вмісту низькомолекулярної ДНК у зразках, виділених із плазми пацієнтів та донорів, порівняно з контрольною ДНК, розведення якої використовували для ПЛР у реальному часі. Одержані результати узгоджуються з даними інших досліджень, згідно з якими визначення концентрації пкДНК з використанням флуоресцентних барвників дає вищі абсолютні значення, ніж метод кількісної

ПЛР у реальному часі [199]. Проведені іншими дослідниками експерименти також показали підвищений вміст пкДНК у крові хворих на рак нирки у порівнянні зі здоровими донорами [200], [201] і підтверджують, що тільки незначні кількості ДНК циркулюють в крові здорових людей.

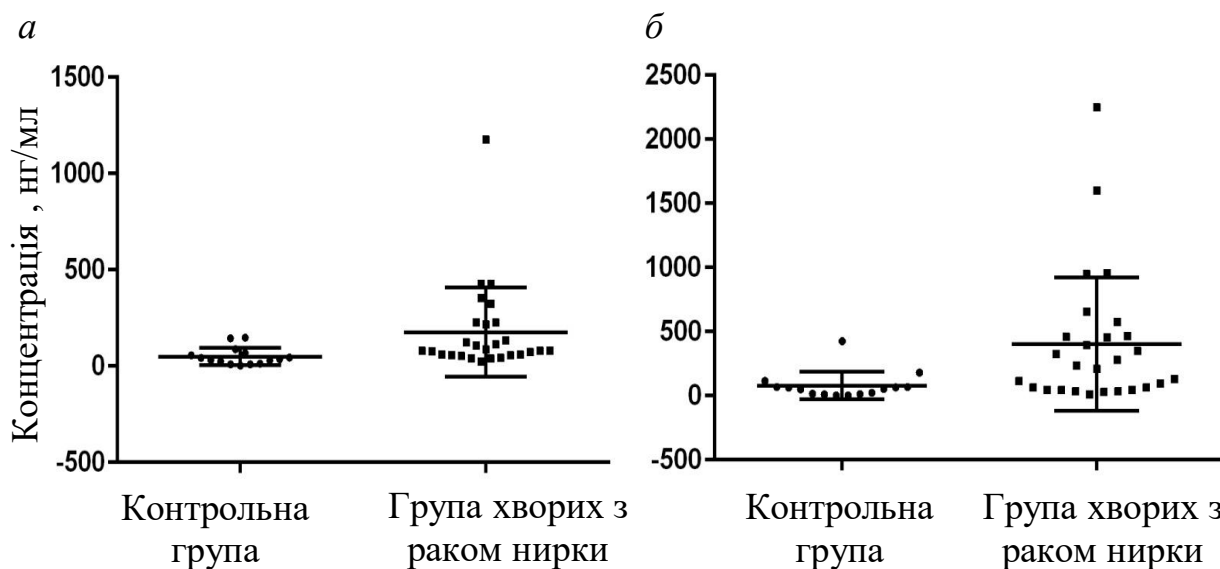


Рис. 3.20. Концентрація позаклітинної ДНК, виділеної з плазми крові пацієнтів з раком нирки (n=27) та контрольної групи (n=15), визначена за допомогою:

а – методу кількісної ПЛР в реальному часі відносно гену β -актину, різниця статистично значуща за $p < 0,0008$;

б – методу інтеркаляції флуорисцентного барвника SYBR Green I, різниця статистично значуща за $p < 0,0037$

Отриманні результати свідчать про те, що обидва методи дозволяють визначити індивідумів з паталогією. Однак, використання методу кількісної ПЛР до гену β -актину при визначенні концентрацій пкДНК в зразках плазми крові пацієнтів з раком нирки є більш точним для діагностики захворювання, ніж метод визначення інтеркаляції флуорисцентного барвника. Отриманні дані також вказують на можливість застосування даного методу як додаткового маркеру при первинній діагностиці раку нирки.

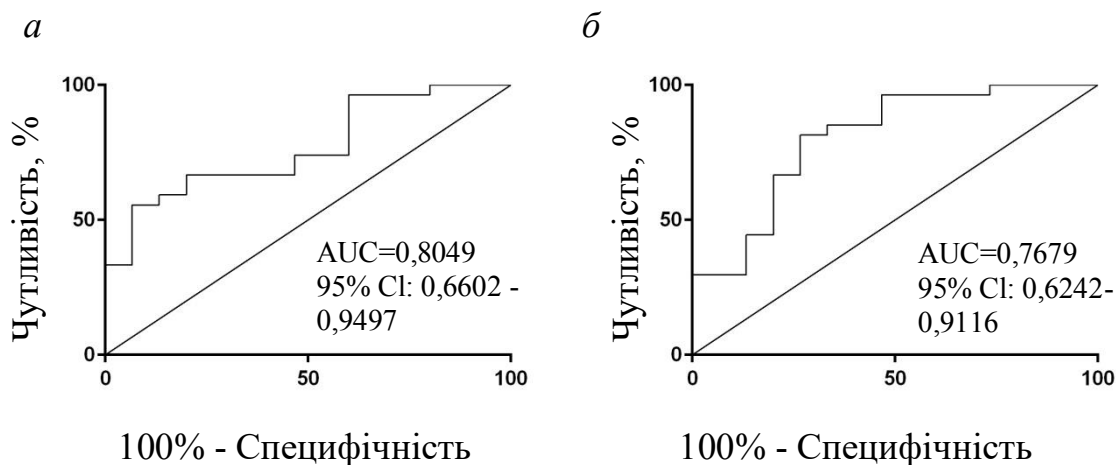


Рис. 3.21. Результати ROC-аналізу концентрації позаклітинної ДНК, виділеної з плазми крові пацієнтів з раком нирки ($n=27$) та контрольної групи ($n=15$), визначені за допомогою:

а – методу кількісної ПЛР до гену β -актину, різниця статистично значуща за $p < 0,0012$;

б – методу інтеркаляції флуорисцентного барвника SYBR Green I, різниця статистично значуща за $p < 0,0044$

Висновки до підрозділу 3.4

Встановлено достовірне зростання концентрації пкДНК у плазмі крові пацієнтів зі скННК на відміну від контрольної групи донорів та показано, що використання для цього методу кількісної ПЛР у реальному часі, є більш точним для діагностики захворювання, ніж метод інтеркаляції флуоресцентного барвника.

Результати досліджень, викладені у підрозділі, опубліковані в працях:

1. **Онищенко К., Циба Л., Ніколаєнко О., Мордерер Д., Скрипкіна І.** Визначення концентрації позаклітинної ДНК та ген-специфічного метилування у

плазмі крові пацієнтів із раком нирок. IX Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів "Молодь і поступ біології", Львів, Україна, 2013, 378-379.

2. Skrypkina I., Tsyba L., **Onyshchenko K.**, Morderer D., Kashparova O., Nikolaienko O., Panasenko G., Vozianov S., Romanenko A., Rynditch A.V. Concentration and Methylation of Cell-Free DNA from Blood Plasma as Diagnostic Markers of Renal Cancer. *Disease markers* 08/2016; 2016(14). DOI:10.1155/2016/3693096.

3. **Onyshchenko K.**, Kashparova O., Dubrovska H., Pereta L., Gryhorenko V., Skrypkina I. Genetic and epigenetic changes on plasma cell-free dna as markers of renal cell carcinoma. XI Parnas Conference – Young Scientists Forum, 2018, *Ukr Biochem J*, Vol.18, Special Issue, P.85.

4. Григоренко В.М., Скрипкіна І.Я., Перета Л.В., **Онищенко К.В.**, Кашпарова О.В. Патент на корисну модель № 134876 «Спосіб ранньої діагностики раку нирки». Зареєстровано в Державному реєстрі патентів України на корисну модель 10.06.2019 р.

3.5. Індекс цілісності позаклітинної ДНК, виділеної з плазми крові пацієнтів з раком нирки

Для оцінки кількості та ступеню фрагментації пкДНК було використано метод, запропонований і використаний раніше [200], [202]. Метод базується на тому, що пкДНК, яка потрапляє в кров в результаті нормальних процесів, що відбуваються в організмі, має значно менші розміри, ніж пкДНК, що походить від некрозу ракових клітин. В експерименті було використано два праймери до послідовності гену β -актину, які дозволяють ампліфікувати фрагменти розміром 106 п.н. та 384 п.н. Праймери підбиралися таким чином, щоб сайти реасоціації праймерів *ACTB-106* знаходилися в середині послідовності, що фланкується праймерами *ACTB-384*. В результаті *ACTB-106* є специфічним і до великих і до

малих фрагментів пкДНК і має детектуватися на вищому рівні, ніж *ACTB-384*, що є специфічним лише до великих фрагментів пкДНК (рис. 3.22).

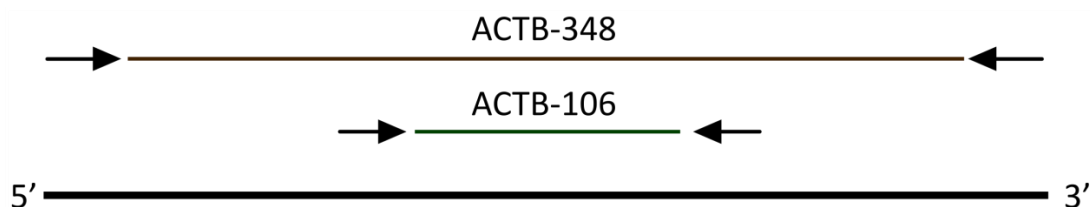


Рис. 3.22. Схематичне зображення розташування праймерів до ділянки *ACTB-106* по відношенню до праймерів, специфічних до ділянки *ACTB-384*

Таким чином, відношення *ACTB-384* до *ACTB-106* називають «індексом цілісності», що характеризує ступінь фрагментації пкДНК в сироватці/плазмі крові. Цілісність пкДНК дорівнює одиниці, якщо ДНК-матриця не фрагментована і нулю, якщо ДНК повністю усічена до фрагментів меншого розміру, ніж 384 п.н. Результати, отримані на пкДНК виділеної з плазми крові хворих на рак нирки та здорових донорів, представлені в додатках Г та Е відповідно.

Статистичний аналіз отриманих результатів (додаток Г, додаток Е) проводили за допомогою програмного забезпечення "GraphPad Prism" (табл. 3.5). Індекс цілісності пкДНК аналізували за допомогою U-критерію Манна-Уїтні (рис. 3.23). Площа під ROC-кривою, чутливість та специфічність були визначені за допомогою аналізу ROC-кривої (рис. 3.24).

Аналіз результатів дослідження показав абсолютно різні дані для онкохворих зі світлоклітинною карциномою нирки та контрольної групи здорових донорів (рис. 3.23, рис. 3.24, табл. 3.5). В контрольній групі пкДНК виявилася помірно фрагментованою (медіана для $ACTB384/ACTB106=0,685$), в той час як у хворих на НКК спостерігався значно більший ступінь фрагментації (медіана для $ACTB384/ACTB106=1,126$). Отримані значення є близькими до даних, отриманих іншими дослідниками [200].

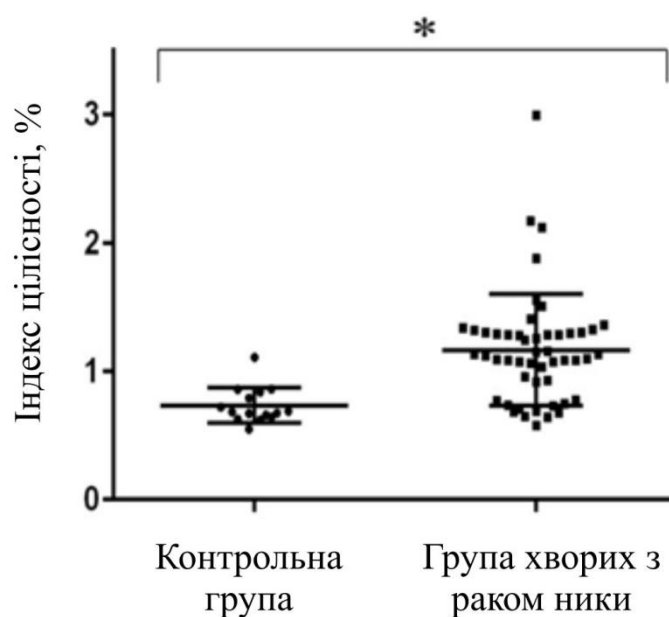


Рис. 3.23. Індекс цілісності позаклітинної ДНК, виділеної з плазми крові пацієнтів зі світлоклітинним раком нирки (n=50) та здорових донорів (n=15)

* – різниця статистично значуща за $p < 0,0001$

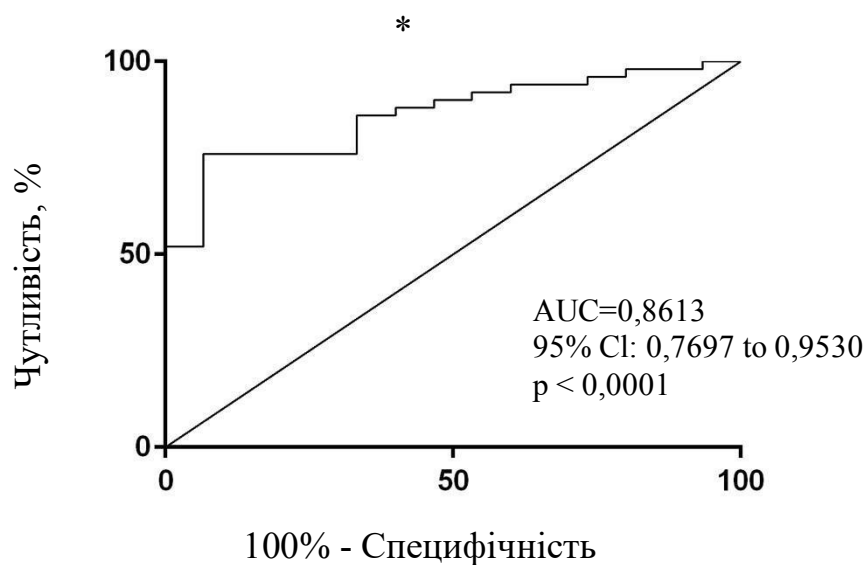


Рис. 3.24. Результати ROC-аналізу індексу цілісності позаклітинної ДНК, виділеної з плазми крові пацієнтів з (n=50) та здорових донорів (n=15)

* – різниця статистично значуща за $p < 0,0001$

Таблиця 3.5

Статистичні дані індексу цілісності пкДНК, визначеного для пацієнтів зі світлоклітинним раком нирки (n=50) та здорових донорів (n=15)

Показник	Значення
Площа під ROC-кривою	0,8613 (95% CI: 0,7697 to 0,9530)
Чутливість	58,9 %
Специфічність	77,9 %
Медіана (RCC)	1,126
Медіана (контроль)	0,685
U-критерій Манна-Уїтні	$p < 0,0001$

Отримані нами дані показують, що вміст високомолекулярної пкДНК в плазмі крові пацієнтів з раком нирки більший, ніж в плазмі крові здорових донорів і підтверджують теорію про некротичне походження пкДНК [22]. Отриманні результати вказують на можливість застосування методу визначення індексу цілісності як додаткового критерію при первинній діагностиці раку нирки та для моніторингу наявності в організмі пацієнтів метастатичних клітин, не видалених під час операції [46].

Висновки до підрозділу 3.5

Показано збільшення індексу цілісності пкДНК, отриманої з плазми крові пацієнтів з раком нирки, що вказує на можливість використання цього показника для попередньої діагностики раку, а також є важливим для моніторингу наявності в організмі пацієнта метастатичних клітин, не видалених під час операції.

Результати досліджень, викладені у підрозділі, опубліковані в працях:

1. **Onyshchenko K.V.**, Kashparova O.V., Dubrovska H., Skrypkinia I.Ya. Microsatellite alterations of *RASSF1* and *VHL* and DNA integrity in renal cell

carcinoma. XIV International Scientific Conference of Students, PhD Students; Young Scientists; Shevchenkivska Vesna: Biology. 6-8 April, Kyiv, Ukraine, P.17-18

2. Григоренко В.М., Скрипкіна І.Я., Перета Л.В., **Онищенко К.В.**, Кашпарова О.В. Патент на корисну модель № 134876 «Спосіб ранньої діагностики раку нирки». Зареєстровано в Державному реєстрі патентів України на корисну модель 10.06.2019 р

3.6. Метилування CpG-острівців промоторів генів на ДНК пацієнтів з раком нирки

Визначення метилування промоторів генів у рідких біопсіях є перспективним маркером для неінвазивної діагностики, включаючи як ранню діагностику пухлини, так і моніторинг лікування. Тож нами було вибрано декілька перспективних генів, промотори яких з великою ймовірністю піддаються метилуванню в пухлинах нирки. Для перевірки відповідності метилування CpG-острівців промоторів генів на пкДНК плазми крові та гДНК пухлин хворих з раком нирки було обрано відомі гени-супресори *APC*, *RASSF1*, *LRRC3B*, *GPX3*, *p14ARF*, *p16*, *TIMP3*, *VHL*, *RUNX3* та *PCDH8*, для яких показано гіперметилування при багатьох видах раку. Результати визначення метилування зразків ДНК онкохворих представлені у таблиці Ж.1 (додаток Ж), плазми крові здорових донорів – у додатку Е.

3.6.1. Аналіз статусу метилування CpG-острівця промоторної ділянки гена *GPX3*. Отримані нами результати показали метилування CpG-острівця промотора гена *GPX3* на гДНК пухлини у 75,28% пацієнтів (67 з 89) і на пкДНК плазми крові до операції у 46,07% пацієнтів (41 з 89). CpG-острівець гена *GPX3* виявився метильованим на гДНК умовно нормальної тканини нирки у 29,21%

обстежених пацієнтів (26 з 89). Метилювання пкДНК здорових донорів виявили у 6,67% пацієнтів (3 з 45), а на пкДНК після операції – у 14% (7 з 50) перевірених зразків крові. У всіх пацієнтів (навіть з I стадією захворювання), у яких було виявлено метилювання промоторної ділянки гена на гДНК пухлини, було також виявлено метилювання гена і на пкДНК, що показує специфічність цього тесту. Була обрахована чутливість при використанні даного гену на пкДНК, що склала 46%, та специфічність, що склала 71% (Таблиця Г.1).

З метою використання даного маркера в якості складової тест-системи діагностики була обчислена площа під кривою ROC, яка показала гарний діагностичний потенціал використання метилювання промотора гена *GPX3* на пкДНК плазми крові ($AUC=0,6970$) (рис. 3.25).

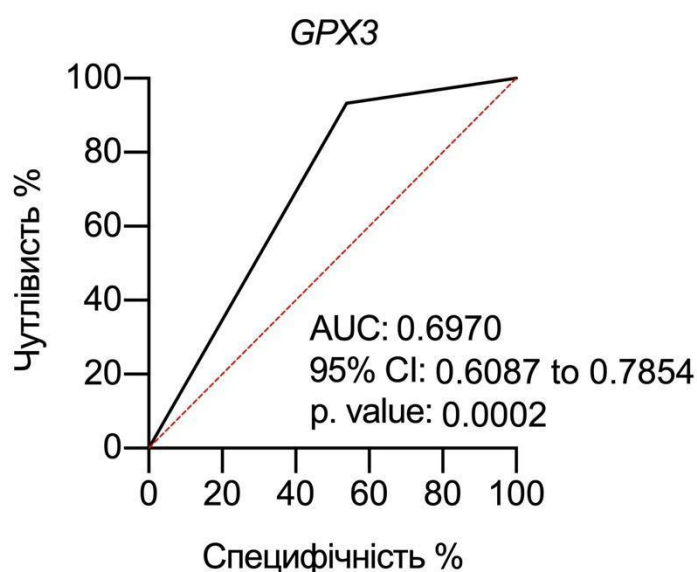


Рис. 3.25. Результати ROC-аналізу метилювання CpG-острівця гена *GPX3* на позаклітинної ДНК, виділеної з плазми крові пацієнтів з нирково-клітинною карциномою та здорових донорів

3.6.2. Аналіз статусу метилювання CpG-острівців промоторів альтернативних транскриптів гена *RASSF1*. Наступний ген, обраний як ще один з потенційних маркерів пухлин скНKK – *RASSF1* – має два різні промотори,

що ведуть до утворення двох важливих (з п'яти основних) транскриптів: *RASSF1A* та *RASSF1C* і містять два незалежні CpG-острівці в районі відповідних промоторів (рис. 3.26). Другий CpG-острівець знаходиться в межах першого екзону з відкритої рамки зчитування у транскрипті *RASSF1A*. Метилування кожного з них вимикає транскрипцію *RASSF1*, тому дослідники у своїх роботах розглядають саме гіперметилування цього транскрипту, але здебільшого не вказують, метилування якого з CpG-острівців було досліджено, що є важливим для вивчення канцерогенезу пухлини та виявлення ген-специфічних маркерів.

Метилування CpG-островця першого промотора гена *RASSF1* (транскрипт *RASSF1A*) було виявлено в нашій досліджуваній групі у 74,1% (66 з 89 пацієнтів) зразків пухлин та у 67,4% (60 з 89 пацієнтів) зразків пкДНК з плазми доопераційних пацієнтів з скНKK (Таблиця Г.1 додатку Г).

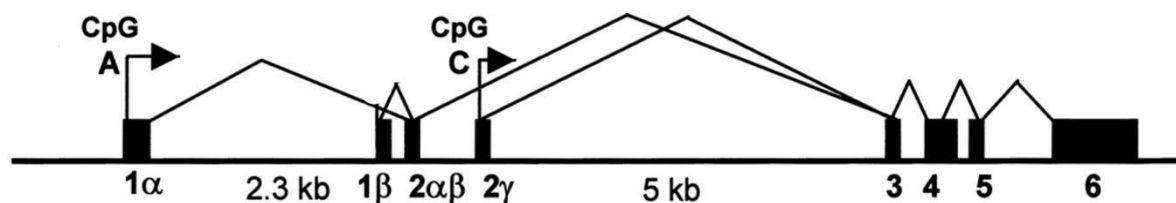


Рис. 3.26. Схема гена *RASSF1* на 3p21.3, що кодує різні ізоформи. Два CpG-острівці розташовані на промоторах *RASSF1* (A та C)

Відсоток метильованих CpG-острівців для першої промоторної ділянки гена *RASSF1* у контрольних зразках становив 57,3% (51 з 89 зразків) для гДНК умовно-здорової тканини нирки, 41,5% (27 з 65) – для пкДНК плазми крові пацієнтів після операції та 8,9% – на пкДНК здорових донорів (4 з 45). Була обрахована чутливість при використанні даного гену на пкДНК плазми крові, що склала 68%, та специфічність, що склала 43% (Таблиця Г.1 додатку Г). Обчислення площі під ROC-кривою показало гарний діагностичний потенціал для використання цього маркера на пкДНК плазми крові (AUC=0,7926) (рис. 3.27).

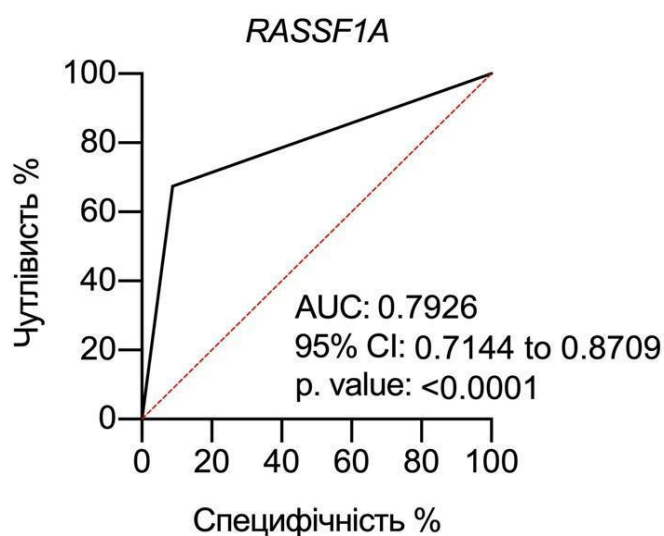


Рис. 3.27. Результати ROC-аналізу метилювання першого CpG-острівця гена *RASSF1A* на позаклітинній ДНК, виділеної з плазми крові пацієнтів зі світлоклітинною нирково-клітинною карциномою та здорових донорів

МС-ПЛР у реальному часі до другого CpG-острівця *RASSF1* (*RASSF1C*) виявила метилювання ДНК пухлин у 48,3% (43 з 89) пацієнтів, ДНК умовно-нормальних тканин – 10% (9 з 89), пкДНК плазми крові пацієнтів до операції – 20% (13 з 65) (Таблиця Г.1 додатку Г). У плазмі крові пацієнтів після операції метилювання було виявлено лише у 12% (6 з 50), а у здорових донорів метилювання другого CpG-острівця гена *RASSF1* виявлено не було. Чутливість при використанні даного параметру на пкДНК становить 20% (Таблиця Ж.2 додатку Ж).

Обчислення площі під ROC-кривою показало невисокий діагностичний потенціал для використання цього показника в якості самостійного маркеру на пкДНК плазми крові (AUC=0,6000) (рис. 3.28).

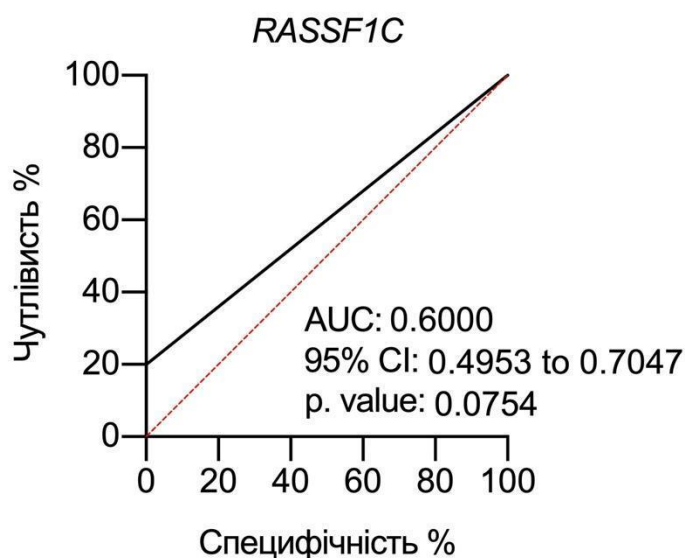


Рис. 3.28. Результати ROC-аналізу метилювання другого CpG-острівця гена *RASSF1(C)* на позаклітинній ДНК, виділеної з плазми крові пацієнтів з скНKK та здорових донорів

3.6.3 Аналіз статусу метилювання CpG-острівця промоторної ділянки гена *LRRC3B*. Результати дослідження статусу метилювання CpG-острівця промотора гена *LRRC3B* показали позитивний результат у 56% (28 з 50) на зразках біопсій пухлин нирки і 50% (25 з 50) на пкДНК до операції (Таблиця 3.6, 3.7). В той же час для даного гену виявлено високий відсоток метилювання CpG-острівця в умовно-нормальних зразках тканин та пкДНК після операції у 48% (24 з 50) в обох випадках, і найбільший відсоток метилювання CpG-острівця промотора гена у контрольних зразках здорових донорів – 33,3% (15 з 45). Була обрахована чутливість при використанні даного гену, що становила 50%, та специфічність, що становила 66,7% (Таблиця Ж.2 додатку Ж).

Обчислення площі під ROC-кривою підтвердило недоцільність використання цього маркеру на пкДНК плазми крові ($AUC=0,5833$) (рис. 3.29).

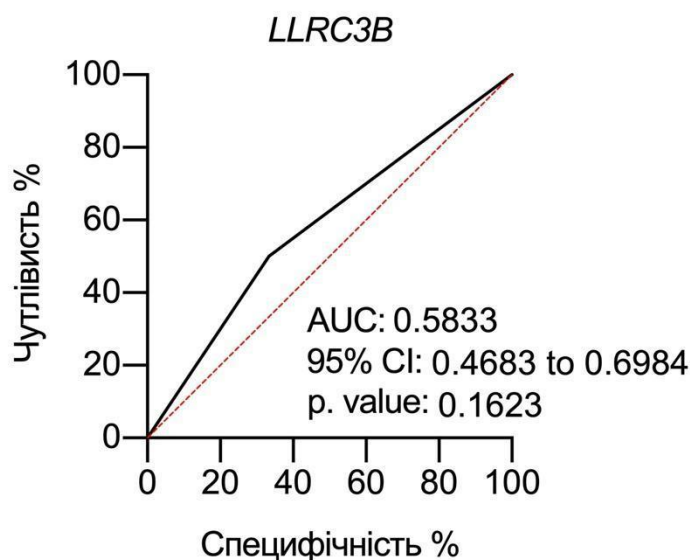


Рис. 3.29. Результати ROC-аналізу метилювання CpG-острівця гена *LLRC3B* на позаклітинний ДНК, виділеної з плазми крові пацієнтів з скНKK та здорових донорів

3.6.4. Перевірка нуклеотидних послідовностей отриманих фрагментів МС-ПЛР. Отримані для трьох генів (*LLRC3B*, *RASSF1C* та *GPX3*) продукти МС-ПЛР, як до метильованої форми ДНК, так і до неметилюваної, було вибірково перевірено секвенуванням. Для цього, після електрофоретичного розділення, ДНК-фрагменти виділялися з гелю та аналізувалися за допомогою набору для секвенування «Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit» (Applied Biosystems, США). Аналіз визначених нуклеотидних послідовностей ДНК-фрагментів підтвердив достовірність проведення МС-ПЛР (рис. 3.30).

Порівняння, проведене за допомогою програмного забезпечення BLASTN, представленого в базі даних NCBI, послідовностей досліджуваних CpG-острівців транскриптів генів *LLRC3B*, *GPX3*, *RASSF1C* та послідовностей отриманих після секвенування відповідних фрагментів МС-ПЛР показало, що цитозини в CpG-динуклеотидах не змінилися, що підтверджує їх метилювання в даних зразках. В той же час, цитозини не в CpG-парах змінились на тиміни, що говорить про правильність проведення бісульфітної конверсії. Результати свідчать про

ROC-кривою ($AUC=0,7619$), яке показало гарний діагностичний потенціал для використання цього маркеру на пкДНК плазми крові (рис. 3.31).

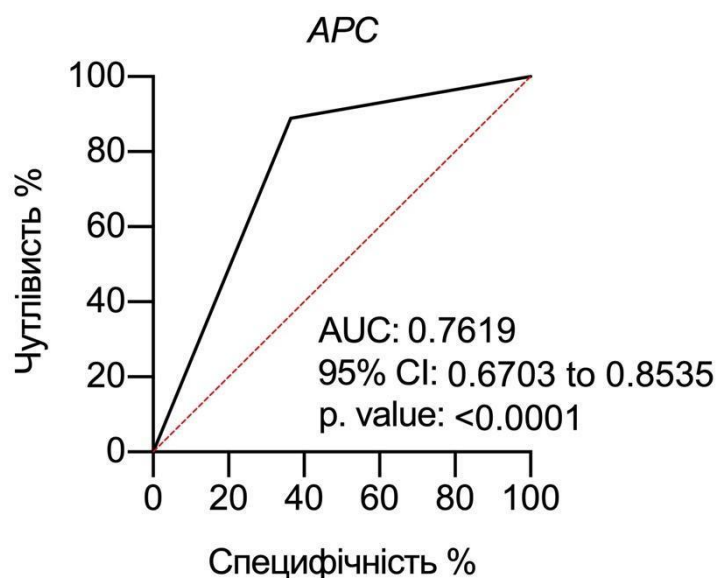


Рис. 3.31. Результати ROC-аналізу метилювання CpG-острівця промотора гена *APC* на позаклітинній ДНК, виділеної з плазми крові пацієнтів з скНKK та здорових донорів

3.6.6. Аналіз статусу метилювання CpG-острівця промоторної ділянки гена *VHL*. Для CpG-острівця промотора гена *VHL* визначено метилювання на гДНК пухлини у 77% інформативних зразків (17 з 43) (рис. 3.32, Таблиця Ж.1 додатку Ж). Результати по зразках 7 пацієнтів (14%) були неінформативні. Це збігається з виявленою неінформативністю визначення втрати аллельного дисбалансу по мікросателітних маркерах гена *VHL* і може бути обумовлене наявністю делецій в ділянці даного гену, що притаманна для хромосоми 3 людини у клітинах цього виду пухлин [203], [204]. У прилеглих до пухлин умовно-нормальних тканинах нирки було виявлено 2 зразки, метилювання у яких неможливо було визначити, що також може бути пов'язане з делеціями 3-ї хромосоми. Адже неможливо виявити 100% нормальну тканину у прилеглих до

пухлини тканині. Метилювання CpG-острівця промотора гена *VHL* умовно-нормальної тканини нирки в інформативних зразках (48) визначили у 2-х зразках, що становить 4%. Таким чином, чутливість при використанні даного гену, склала 77%, специфічність – 92%. На позаклітинній ДНК визначити статус метилювання промотора даного гена не вдалося.

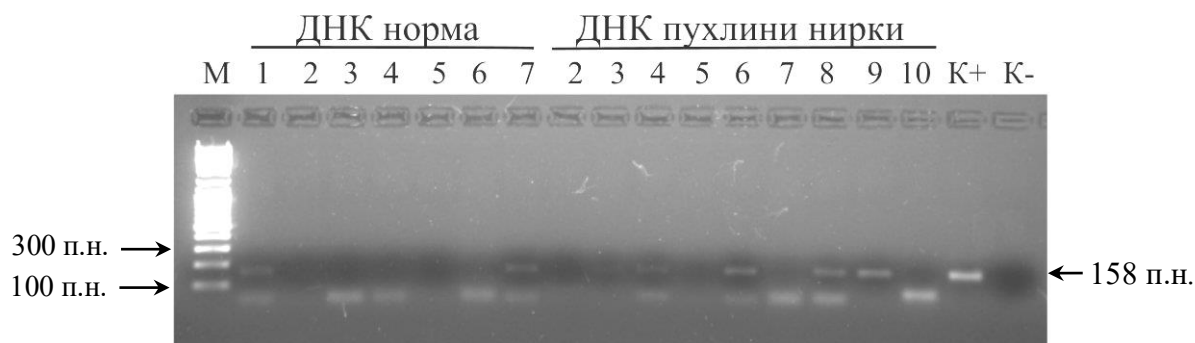


Рис. 3.32. Електрофореграма продуктів МС-ПЛР зразків ДНК, виділених з пухлин та умовно-нормальних тканин онкохворих на скНKK з праймерами до CpG-острівця промотора гена *VHL*. К+ – позитивний контроль ПЛР на штучно метильованій ДНК людини. К- – негативний контроль ПЛР без додавання матриці. М – маркер молекулярних мас GeneRuler™ DNA Ladder Mix

3.6.7. Аналіз статусу метилювання CpG-острівців промоторів альтернативних транскриптів гена *CDKN2A*. Метилювання CpG-острівців промоторів двох альтернативних транскриптів гена *CDKN2A* в пухлинах світлоклітинної карциноми нирки серед інформативних результатів склала 48% (24 з 50 зразків) для транскрипту білка p16 та 82% (41 з 50 зразків) – для транскрипту *p14ARF*. На гДНК з прилеглих умовно-нормальних тканин метилювання CpG-острівця *p14ARF* склало 12% (6 з 50) та для ділянки *p16* - 24% (12 з 50) (Таблиця 3.6, Таблиця Ж.1 додатку Ж). Ступінь метилювання CpG-острівців пкДНК на 50 зразках пацієнтів склала 48% (24 з 50) та 36% (18 з 50) та на пкДНК здорових донорів 6,7% (3 з 45) та 0 % для *p14ARF* та *p16* відповідно (Таблиця 3.7).

Метилування *p14ARF* транскрипту було описано в роботі Costa V. L. та співавт. (2007) в різних підтипах пухлин нирки [205]. Ними було визначене підвищене метилування промотору цього транскрипту (27.4%) у здоровій тканині, на відміну від пухлин (7,7-20%). Проте, метилування альтернативного транскрипту локусу цього ж гена (*CDKN2A*) - *CDKN2A/p16* в цьому ж дослідженні виявлено не було [205].

Спираючись на отримані нами результати, проведене обчислення площі під ROC-кривою показало не поганий діагностичний потенціал для використання визначення метилування CpG-острівця транскрипту *p14ARF* на пкДНК плазми крові (AUC=0,7116) (рис. 3.33), але все ж недостатній для використання як єдиного маркеру.

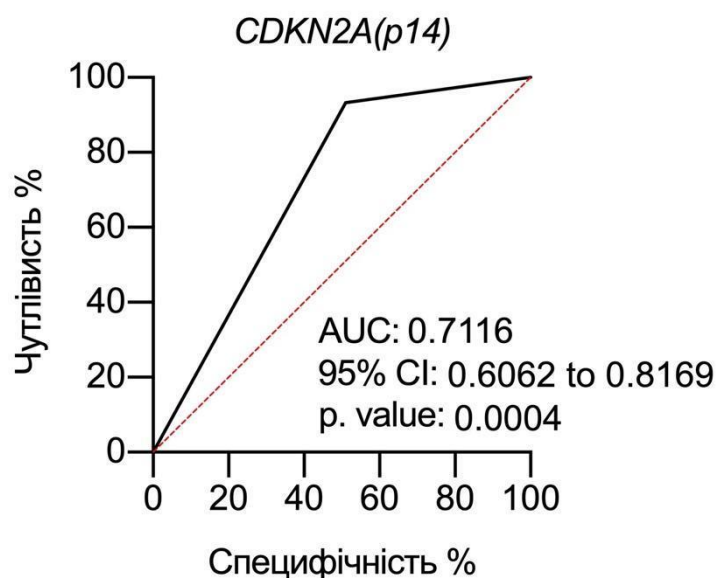


Рис. 3.33. Результати ROC-аналізу метилування CpG-острівця транскрипту *p14ARF* на позаклітинній ДНК, виділеної з плазми крові пацієнтів з скНKK та здорових донорів

В роботі Hauser S. та співроб. (2013) також визначалось метилування промоторних ділянок обох транскриптів гена *CDKN2A* (*CDKN2A/p16* та *p14ARF*) на позаклітинній ДНК крові пацієнтів зі світлоклітинним раком нирки [200]. В

даній роботі, навпаки, метилювання CpG-острівця промотора транскрипту *p14ARF* не було виявлено у здорових донорів, на відміну від хворих, але метилювання *CDKN2A/p16* у зразках здорових індивідуумів було доволі високе (16.7%) у порівнянні зі зразками хворих (25.7%) [200]. Дані результати можуть говорити про особливості трьох виборок хворих, в залежності від їхньої етнічної групи та екологічного оточення (Україна – Португалія – Німеччина).

Аналіз отриманих нами результатів показав недостатній діагностичний потенціал для використання визначення метилювання CpG-острівця промотора транскрипту *CDKN2A/p16* на пкДНК плазми крові (AUC=0,6800) (рис. 3.34), в якості самостійного діагностичного маркеру.

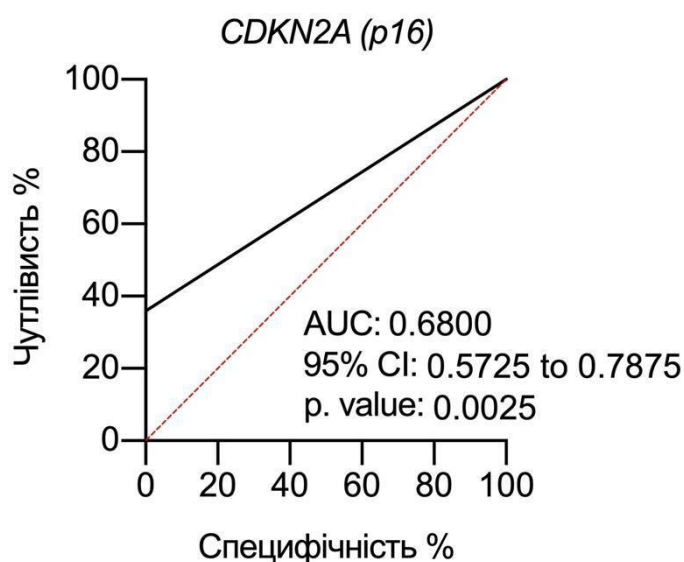


Рис. 3.34. Результати ROC-аналізу метилювання CpG-острівця промотора транскрипту *CDKN2A/p16* на позаклітинній ДНК, виділеної з плазми крові пацієнтів з скНKK та здорових донорів

3.6.8. Аналіз статусу метилювання CpG-острівця промоторної ділянки гена *TIMP3*. Наступний ген – *TIMP3* – обраний як ще один з потенційних маркерів пухлин, що мав у попередніх дослідженнях інших науковців зменшений рівень експресії у 95% зразків пацієнтів зі світлоклітинним раком, у

порівнянні з нормальною тканиною нирки [120]. До 78% зразків пухлини пацієнтів з такими пухлинами мали гіперметилування промотора гена *TIMP3*, на відміну від здорових. Метилування CpG-острівця промотора цього гена визначили на високому рівні у всіх типах біопсій пацієнтів з раком нирки: пухлини, сечі та сироватці крові [120]. В роботі Hauser S. та співроб. метилування CpG-острівця промоторної ділянки гена метилпротеїнази 3 спостерігалось на позаклітинній ДНК крові пацієнтів зі світлоклітинним раком нирки у 57% хворих, а також у здорових донорів на доволі високому рівні (39%) [206]. У перевірених нами зразках метилування цього CpG-острівця було визначено на невисокому рівні (14,0%), метилування зразків умовно нормальної тканини було виявлене у 3 зразках (6,0%) з 50 перевірених пар (рис. 3.35, Таблиця Ж.1 додатку Ж).

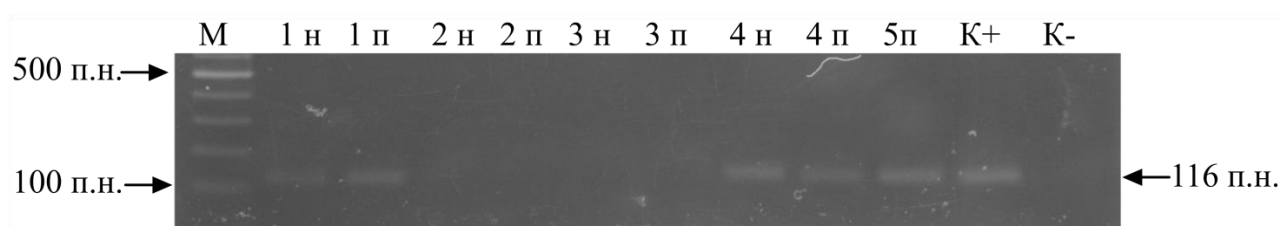


Рис. 3.35. Електрофореграма продуктів МС-ПЛР зразків ДНК, виділених з пухлин та умовно здорових тканин онкохворих на світлоклітинний рак нирки з праймерами до CpG-острівця промотора гена *TIMP3*. K+ – позитивний контроль ПЛР на штучно метильованій ДНК людини. K- – негативний контроль ПЛР без додавання матриці. М – маркер молекулярних мас GeneRuler™ DNA Ladder Mix

Обрахована чутливість при використанні даного гену, склала 14%, а специфічність - 94%. З огляду на низьке метилування даного CpG-острівця у пухлинах нирки, ми не вбачали за потрібне подальшу його перевірку щодо визначення метилування на пкДНК плазми крові, адже цей невисокий показник не доречно використовувати в подальшому в якості діагностичного маркеру.

3.6.9. Аналіз статусу метилювання CpG-острівця промоторної ділянки гена *RUNX3*. В результаті проведеного нами дослідження було визначено метилювання CpG-острівця промотора гена *RUNX3* на гДНК з пухлини у 56,98% (49 з 86), а на гДНК з умовно-нормальних тканин нирки – у 18,6% (16 з 86) пацієнтів з скНKK (Таблиця 3.6, Таблиця Ж.1 додатку Ж).

Ступінь метилювання CpG-острівця промотора гена *RUNX3* на пкДНК 50 зразків пацієнтів з НКК склала 46% (23 з 50) (Таблиця 3.7, Таблиця Ж.1 додатку Ж). На зразках пкДНК контрольної групи здорових донорів метилювання даного CpG-острівця виявлено не було. Отже, визначення метилювання промотора цього гена може бути перспективним для складення неінвазивної тест-системи виявлення раку нирки і, зокрема скНKK. Цей висновок підтверджується і даними ROC-аналізу ($AUC=0,7347$), що вказує на гарний потенціал даного параметру для використання на пкДНК плазми крові (рис. 3.36).

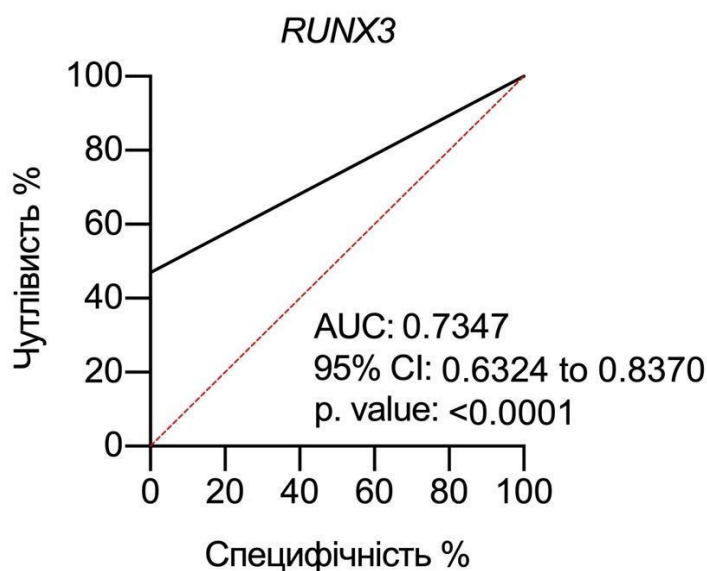


Рис. 3.36. Результати ROC-аналізу метилювання CpG-острівця промотору гена *RUNX3* на позаклітинній ДНК, виділеної з плазми крові пацієнтів з скНKK та здорових донорів

3.6.10. Аналіз статусу метилювання промоторної ділянки гена *PCDH8*.

Отримані результати з визначення статусу метилювання CpG-острівця промотора гена *PCDH8* у хворих на злоякісні новоутворення нирки показали його гіперметилювання на гДНК пухлини у 78,6% пацієнтів (44 з 56) (Таблиця 3.6, Таблиця Ж.1 додатку Ж) і на пкДНК плазми крові до операції у 58,9% пацієнтів з скНKK (33 з 56) (Таблиця 3.7). CpG-острівець промотора гена *GPX3* виявився метильованим на гДНК умовно-нормальної тканини нирки у 12,5% досліджених зразках (7 з 56). Метилювання пкДНК плазми крові здорових донорів виявлено не було (рис. 3.37, Таблиця 3.7).

Обчислення площі під ROC-кривою показало хороший діагностичний потенціал для використання цього показника в якості самостійного маркера на пкДНК плазми крові ($AUC=0,7946$) (Рис. 3.36).

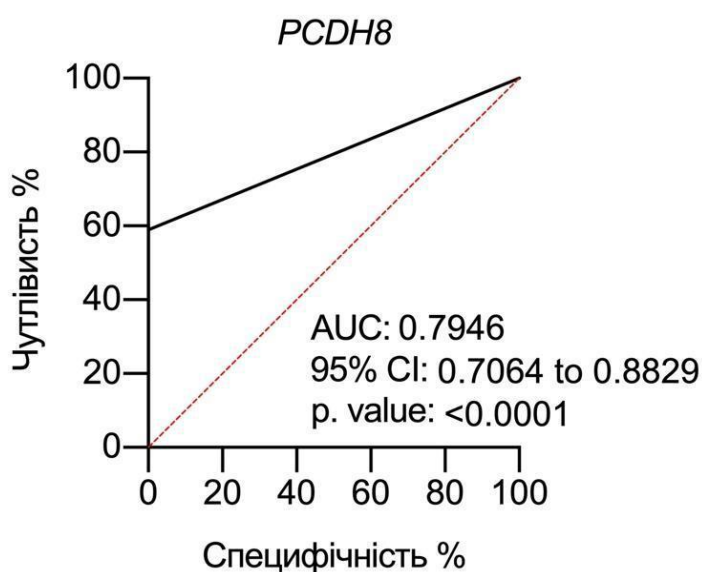


Рис. 3.37. Результати ROC-аналізу метилювання CpG-острівця промотора гена *PCDH8* на позаклітинній ДНК, виділеної з плазми крові пацієнтів з скНKK та здорових донорів

3.6.11. Відбір потенційних ДНК маркерів на основі епігенетичних змін CpG-острівців для діагностики скНKK в плазмі крові. Підсумовуючи отримані дані щодо визначення метилювання CpG-острівців промоторів генів *RASSF1A*, *RASSF1C*, *GPX3*, *RUNX3*, *LLRC3B*, *APC*, *CDKN2A(p14)*, *CDKN2A(p16)* та *PCDH8* у зразках пухлин (рис. 3.38) відносно умовно здорових тканин тих самих хворих, ми обчислили достовірності отриманих даних методом χ^2 (Таблиця 3.6).

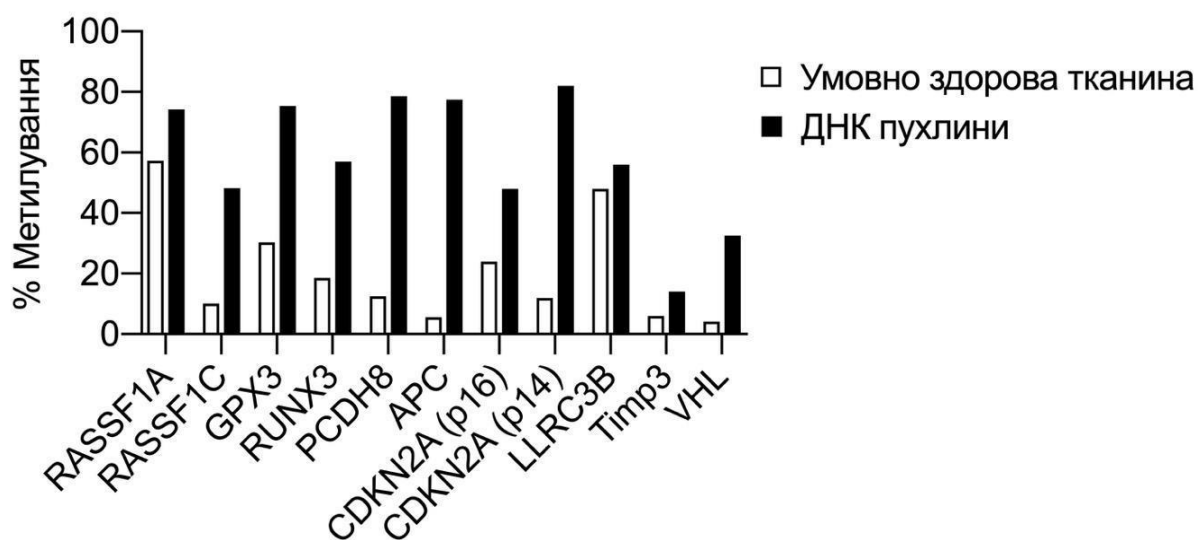


Рис.3.38. Відсоток метилювання CpG-острівців промоторів обраних для дослідження генів у зразках пухлин пацієнтів з скНKK у порівнянні зі зразками умовно здорової тканини

Отримані статистичні результати показали, що більшість з обраних генів (*RASSF1C*, *GPX3*, *RUNX3*, *APC*, *CDKN2A(p14)*, *CDKN2A(p16)* та *PCDH8*) статистично достовірно гіперметильовані при скНKK і можуть бути використані в якості потенційних маркерів на пкДНК для діагностики цих новоутворень нирки (рис. 3.39, Таблиця 3.7).

Таблиця 3.6

Статистичний аналіз результатів з визначення статусу метилювання обраних генів на ДНК пухлин скНKK у порівнянні з умовно-нормальною тканиною

	ДНК пухлини		X ²	P-value
	Норма	Пухлина		
<i>RASSF1A</i>	51 з 89 (57,30%)	66 з 93 (70,97%)	3,698	0,0545
<i>RASSF1C</i>	9 з 89 (10,11%)	43 з 89 (48,31%)	31,41	<0,0001
<i>GPX3</i>	26 з 89 (29,21%)	67 з 89 (75,28%)	37,85	<0,0001
<i>RUNX3</i>	16 з 86 (18,60%)	49 з 86 (56,98%)	26,93	<0,0001
<i>LLRC3B</i>	24 з 50 (48,00%)	28 з 50 (56,00%)	0,641	0,4233
<i>APC</i>	5 з 89 (5,62%)	69 з 89 (77,53%)	94,74	<0,0001
<i>CDKN2A (p14)</i>	6 з 50 (12,00%)	41 з 50 (82,00%)	6,25	0,0124
<i>CDKN2A (p16)</i>	12 з 50 (24,00%)	24 з 50 (48,00%)	49,18	<0,0001
<i>PCDH8</i>	7 з 26 (26,92%)	44 з 63 (69,84%)	13,86	0,0002

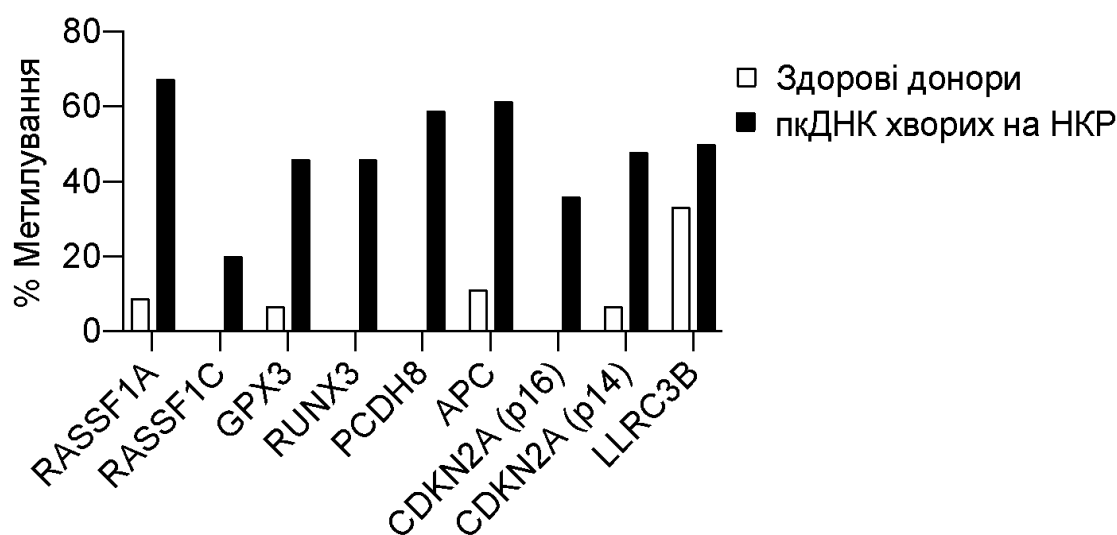


Рис.3.39. Відсоток метилювання CpG-острівців обраних для дослідження генів на пкДНК плазми крові пацієнтів з скНKK у порівнянні зі зразками пкДНК здорових донорів

Таблиця 3.7

Статистичний аналіз результатів з визначення статусу метилювання обраних генів на пкДНК хворих на скННК у порівнянні з здоровими донорами

Ген	пкДНК		X ²	P-value
	Здорові донори	Пацієнти з раком		
<i>RASSF1A</i>	4 з 45 (8,89%)	60 з 89 (67,42%)	41,03	<0,0001
<i>RASSF1C</i>	0 з 45 (0,00%)	13 з 65 (20,00%)	10,21	0,0014
<i>GPX3</i>	3 з 45 (6,67%)	41 з 89 (46,07%)	21,04	<0,0001
<i>RUNX3</i>	0 з 45 (0,00%)	23 з 49 (46,94%)	27,96	<0,0001
<i>LLRC3B</i>	15 з 45 (33,33%)	25 з 50 (50,00%)	2,699	0,1004
<i>APC</i>	5 з 45 (11,11%)	40 з 65 (61,54%)	27,97	<0,0001
<i>CDKN2A (p14)</i>	3 з 45 (6,67%)	24 з 50 (48%)	19,89	<0,0001
<i>CDKN2A (p16)</i>	0 з 45 (0,00%)	18 з 50 (36,00%)	19,99	<0,0001
<i>PCDH8</i>	0 з 45 (0,00%)	33 з 56 (58,93%)	39,39	<0,0001

Використовуючи аналіз кореляції Спірмена було підтверджено, що рівень метилювання CpG-острівців промоторів досліджуваних генів на пкДНК відображає ситуацію в пухлині пацієнтів з скННК (рис. 3.40, Таблиця 3.8).

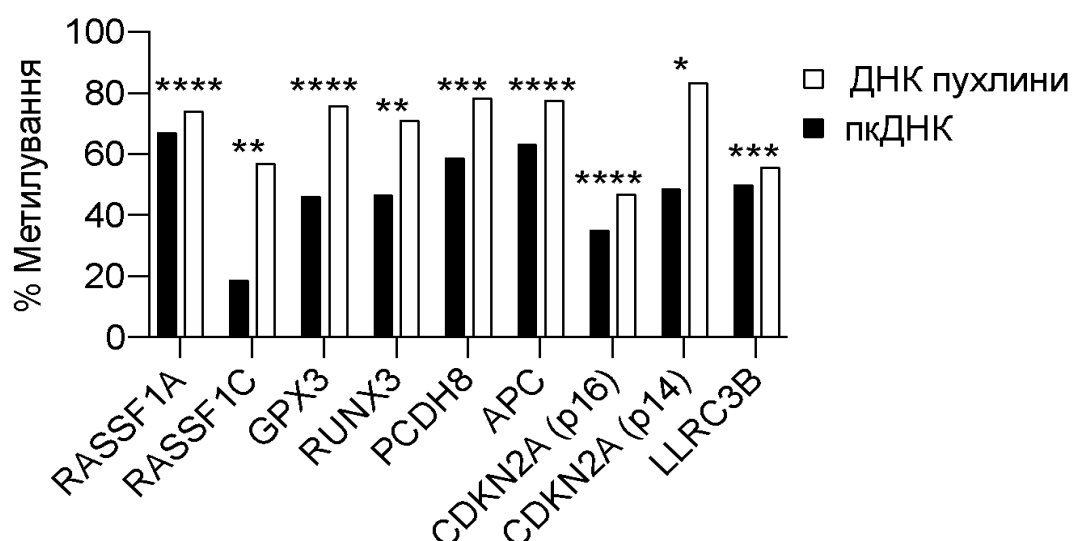


Рис. 3.40. Порівняння відсотка метильованих CpG-острівців промоторів генів на геномній ДНК пухлин і пкДНК плазми крові хворих у зразках, для яких було проаналізовано обидва типи ДНК

Таблиця 3.8

Статистичний аналіз результатів з визначення кореляції між статусом метилювання на пкДНК та гДНК пухлини пацієнтів з скНKK

Ген	r	95% ДІ	P-value
<i>RASSF1A</i>	0,7944	0,6991 - 0,8619	<0,0001
<i>RASSF1C</i>	0,343	0,09876 - 0,5482	0,0055
<i>GPX3</i>	0,5296	0,3557 - 0,6680	<0,0001
<i>RUNX3</i>	0,4138	0,1417 - 0,6278	0,0031
<i>LLRC3B</i>	0,4835	0,2291 - 0,6761	0,0004
<i>APC</i>	0,5249	0,3014 - 0,6938	<0,0001
<i>CDKN2A (p14)</i>	0,3223	0,03672 - 0,5593	0,0239
<i>CDKN2A (p16)</i>	0,7806	0,6367 - 0,8720	<0,0001
<i>PCDH8</i>	0,4486	0,2029 - 0,6412	0,0005

Проведений аналіз результатів метилювання CpG-острівців промоторів генів *RASSF1A*, *RASSF1C*, *GPX3*, *RUNX3*, *LLRC3B*, *APC*, *CDKN2A(p14)*, *CDKN2A(p16)* та *PCDH8* на пкДНК з плазми крові хворих на світлоклітинну нирково-клітинну карциному та здорових донорів (Таблиця 3.8, рис. 3.40, Таблиця Г.2 додатку Г) підтвердив доречність використання визначення статусу метилювання генів *RASSF1A*, *RASSF1C*, *GPX3*, *RUNX3*, *APC*, *CDKN2A(p14)*, *CDKN2A(p16)* та *PCDH8* на пкДНК плазми крові як діагностичних маркерів для визначення злоякісних новоутворень нирки. Показники метилювання гена *LLRC3B* не мали достовірної різниці між хворими і здоровими людьми.

Однофакторний логістичний регресійний аналіз був використаний для аналізу прогностичної цінності окремих генів для діагностики світлоклітинної НКК шляхом детекції метилювання CpG-острівців промоторів генів на пкДНК плазми крові. Найбільш перспективними виявилися гени *RASSF1A*, *GPX3*, *APC*, *CDKN2A(p16)* та *PCDH8*. Тож, з огляду на отримані дані аналізу логістичної регресії ми перевірили композиції генів для визначення одночасного метилювання CpG-острівців, які варто включити до тест-системи неінвазивної діагностики світлоклітинної карциноми нирки. Тільки гени, які були значущими при однофакторному аналізі, були включені до мультифакторного регресійного

аналізу. Метод прямого регресійного аналізу був використаний при мультифакторному регресійному аналізі (SPSS 25), яким було визначено комбінацію з 4-х генів (*RASSF1A*, *GPX3*, *APC*, *CDKN2A(p14)*), зміна метилювання CpG-острівців промоторів яких корелювала з наявністю скНKK.

Для визначення доцільності використання комбінації 4-х генів у порівнянні з кожним окремим геном з 4-х було проведено статистичне порівняння ROC-кривих за допомогою програми MedCalc (рис.3.41). Аналіз показав достовірну різницю для кожного з 4-х генів, а саме: $p = 0.0007$ для *RASSF1*, $p < 0.0001$ для *GPX3*, $p = 0.0001$ для *APC* та $p < 0.0001$ для *CDKN2A(p14)*. Також AUC, специфічність, чутливість, LHR+ та LHR-для комбінації з 4-х генів підвищились у порівнянні з кожним окремим геном (Таблиця Ж.3 додатку Г).

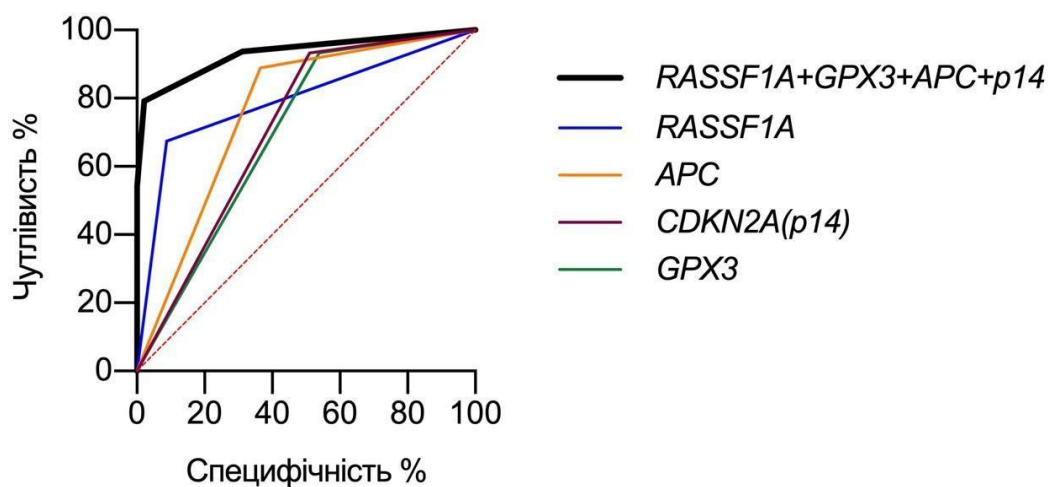


Рис. 3.41. Однофакторні та мультифакторний регресійний аналіз з досліджень комбінацій генів для складення панелі маркерів на основі визначення метилювання CpG-острівців промоторів на пкДНК плазми крові для виявлення пухлин світлоклітинного раку нирки

Метилювання CpG-острівця промоторів хоча б одного з панелі генів (*RASSF1A*, *GPX3*, *APC*, *CDKN2A(p16)*) визначалось у 94% пацієнтів зі

світлоклітинним раком нирки, двох – у 91% пацієнтів, трьох – у 54% пацієнтів з скНKK. Серез здорових донорів не зустрічалось комбінацій метилювання двох або трьох з цих 4-х обраних генів. Проте як мінімум один з генів, *RASSF1A*, *GPX3*, *APC* чи *CDKN2A(p16)* був метильований у 33% зразків пкДНК, отриманих від здорових донорів.

Тож, в результаті проведених досліджень з одночасного визначення метилювання CpG-острівців промоторних ділянок генів *RASSF1A*, *RASSF1C*, *GPX3*, *RUNX3*, *LLRC3B*, *APC*, *CDKN2A(p14)*, *CDKN2A(p16)* та *PCDH8* на ДНК з пухлин нирок, умовно здорових тканин нирки, пкДНК з плазми крові тих самих пацієнтів та пкДНК здорових донорів, була складена панель маркерів, що включають CpG-острівці промоторів 4-х генів: *RASSF1A*, *GPX3*, *APC* та *CDKN2A(p16)*. Використання цієї панелі на позаклітинних ДНК плазми крові допоможе у ранньому виявленні світлоклітинного раку нирки.

Таблиця 3.9

Аналіз композицій генів, метилювання CpG-острівців промоторів яких на пкДНК плазми крові корелює з утворенням скНKK

Гени	пкДНК		X ²	P-value
	Здорові донори	Пацієнти з раком		
<i>RASSF1A+GPX3+APC+p14</i> (метилювання у >1 генах)	15 з 45 (33%)	45 з 48 (94%)	37,03, 1	<0,0001
<i>RASSF1A+GPX3+APC+p14</i> (метилювання у >2 генах)	0 з 45 (0%)	39 з 48 (81%)	62,97, 1	<0,0001
<i>RASSF1A+GPX3+APC+p14</i> (метилювання у >3 генах)	0 з 45 (0%)	26 з 48 (54%)	33,83, 1	<0,0001

Висновки до підрозділу 3.6

Вперше, на великій вибірці зразків пацієнтів (пухлина, умовно здорова тканина нирки, плазма крові пацієнтів до і після хірургічного втручання), було визначено статус метилування CpG-острівців генів-супресорів *RASSF1A*, *RASSF1C*, *LRRC3B*, *GPX3*, *PCDH8*, *RUNX3*, *APC*, *TIMP3*, *VHL*, *p14ARF*, *p16INK4a*.

Визначено, що гіперметилування CpG-острівців промоторів генів *RASSF1A*, *GPX3*, *APC* та *p14ARF* на пкДНК плазми крові може бути використано для ранньої діагностики раку нирки.

Результати досліджень, викладені у підрозділі, опубліковані в працях:

1. **Онищенко К.**, Циба Л., Ніколаєнко О., Мордерер Д., Скрипкіна І. Визначення концентрації позаклітинної ДНК та ген-специфічного метилування у плазмі крові пацієнтів із раком нирок. IX Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів "Молодь і поступ біології", Львів, Україна, 2013, 378-379.
2. **Онищенко К.**, Мордерер Д. Визначення метилування генів-супресорів пухлини *APC* та *FHIT* на позаклітинній ДНК в плазмі крові пацієнтів з раком нирок. VIII Міжнародна наукова конференція молодих учених, 2013, Харків, Україна, с.43-44
3. Кашпарова О. **Онищенко К.**, Банас О., Перета Л. Визначення статусу метилування гена *LRRC3B* та *VHL* на позаклітинній ДНК та ДНК пухлин хворих на рак нирок.. III Міжнародна наукова конференція студентів, аспірантів та молодих учених, Донецьк, 2014, с.279
4. **Онищенко К.**, Мордерер Д. Визначення метилування генів-супресорів пухлини *LRRC3B* та *VHL* на позаклітинній ДНК в плазмі крові пацієнтів з раком

нирок. III Міжнародна наукова конференція студентів, аспірантів та молодих учених, Донецьк, 2014, с.282-283

5. **Онищенко К.** Кашпарова О. Перета Л., Банас О. Григоренко В. Скрипкіна І.Я. Визначення і порівняння статусу метилування генів *LRRC3B* та *APC* на позаклітинній ДНК плазми крові та ДНК пухлин у пацієнтів зі світлоклітинним раком нирок. X Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів "Молодь і поступ біології", Львів, Україна. 2014, с.216-217.

6. **Onyshchenko K.**, Kashparova A., Korniyushin V., Banas O., Pereta L. Comparison of *LRRC3B* and *RASSF1* methylation genes of patients with renal cell carcinoma. XII Міжнародна наукова конференція студентів та молодих науковців «Шевченківська весна 2014: Біологічні науки». Київ, 2014. с.50-51

7. Скрипкіна І.Я., **Онищенко К.В.**, Кашпарова О.М., Григоренко В.М., Перета Л.В., Онищук А.П., Вікарчук М.В., Банас О.О. Визначення статусу метилування генів *LRRC3B*, *RASSF1A*, *APC* на позаклітинній ДНК та ДНК пухлини хворих із нирково-клітинним раком. Здоров'є мужчини, 2015, 53 (2), 166-170.

8. Кашпарова О., **Онищенко К.** Скрипкіна І.Я. Метилування гена *RASSF1* на позаклітинній ДНК плазми крові та геномній ДНК пухлин у пацієнтів зі світлоклітинним раком нирок. XI міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології», 2015, Львів, Україна, с, 405-406

9. **Онищенко К.** Кашпарова О., Перета Л., Банас О., Григоренко В., Скрипкіна І.Я. Гіперметилування гена *RARB2* на позаклітинній ДНК у пацієнтів зі світлоклітинним раком нирок. XI міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології», 2015, Львів, Україна, с, 410-411

10. **Onyshchenko K.V.**, Kashparova O.V., Dubrovskaya H., Skrypkinia I.Ya. Microsatellite alterations of *RASSF1* and *VHL* and DNA integrity in renal cell carcinoma. XIV International Scientific Conference of Students, PhD Students; Young Scientists; Shevchenkivska Vesna: Biology. Ukraine, P.17-18.

11. Kashparova O.V., **Onyshchenko K.V.**, Rynditch A.V., Gryhorenko V.M., Pereta L.V., Skrypkina I. Ya.. Gene-methylation of DNA in patirnts with renal cell carcinoma. X Parnas Conference. Poland, Wrocław, 2016, P.52.
12. **Onyshchenko K.V.**, Kashparova O.V., Rynditch A.V., Gryhorenko V.M., Pereta L.V., Skrypkina I. Ya. DNA methylation of *GPX3* and loss of heterozygosity of *RASSF1* and *VHL* in renal cell carcinoma. X Parnas Conference. Poland, Wrocław, 2016, P.53.
13. Skrypkina I., Tsyba L., **Onyshchenko K.**, Morderer D., Kashparova O., Nikolaienko O., Panasenko G., Vozianov S., Romanenko A., Rynditch A.V. Concentration and Methylation of Cell-Free DNA from Blood Plasma as Diagnostic Markers of Renal Cancer. Disease markers 08/2016; 2016(14). DOI:10.1155/2016/3693096.
14. **Онищенко К. В.**, Кашпарова О. В. Ідентифікація молекулярних маркерів для ранньої діагностики пухлин нирки. 11 th International Young Scientists' Biology Conference "From A Molecule Up To The Biosphere". Ukraine, Kharkiv, 2016. 31-32
15. Щербик К., **Онищенко К.**, Дубровська А., Перета Л., Банас О., Григоренко В., Скрипкіна І. Визначення та порівняння статусу метилування генів *GPX3*, *RUNX3* та *TIMP3* на позаклітинній ДНК плазми крові та днк пухлин у пацієнтів зі світлоклітинним раком нирки. XI міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології», 2017, Львів, Україна, 111-112.
16. Дубровська Г., **Онищенко К.**, Щербик К., Скрипкіна І. Метилування гену *RUNX3* під час розвитку світло-клітинного раку нирки. XV International Scientific Conference of Students, PhD Students; Young Scientists; Shevchenkivska Vesna: Biology. Ukraine, Kyiv, 2017. P.240-241
17. Дубровська Г.В., **Онищенко К.В.**, Перета Л.В., Кашпарова О.В., Григоренко В.М., Скрипкіна І.Я. Мікросателітні зміни та метилування гена *RASSF1* у хворих на нирково-клітинний рак. Фактори експериментальної еволюції організмів», 2018, 23, с.192-196. DOI: <https://doi.org/10.7124/FEEO.v23.1013>.

18. Shcherbyk K., Onyshchenko K., Skrypkins I. Methylation of *GPX3* and *TIMP3* genes of DNA of tumors in patients with renal cell carcinoma. Joint Meeting of the 25th Annual Conference “Modern Aspects of Biochemistry and Biotechnology”& 2nd Conference for Young Scientists CYS-2017, Kyiv, Ukraine, 2017, P.82
19. **Онищенко К.В.**, Дубровська Г.В., Смалъ М.П., Никитченко Н.В., Григоренко В.М., Вікарчук М.В., Ролевич А.И., Гончарова Р.И., Скрипкіна І.Я. Інактивація гена-онкосупресора *CDKN2A* у злоякісних новоутвореннях нирки та сечового міхура. Анотований збірник проектів спільного конкурсу ДФФД-БРФФД - Академперіодика, 2018, с. 79-83.
20. Войціцький Т., Дубровська Г., **Онищенко К.**, Перета Л., Григоренко В., Скрипкіна І. Метилування гена *PCDH8* під час розвику світло-клітинного раку нирки. XVI Міжнародна наукова конференція студентів та молодих вчених «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки/BioScience Advances», Збірка тез, 2018, с.196-198.
21. Dubrovskа H., **Onyshchenko K.**, Kashparova O., Gryhorenko V., Pereta L., Skrypkins I. Microsatellite alterations and DNA methylation of *RASSF1* in renal cell carcinoma. 4th International Conference of Cell Biology, Cracow, Poland, 2018, p. 421.
22. **Onyshchenko K.**, Kashparova O., Dubrovskа H., Pereta L., Gryhorenko V., Skrypkins I. Detection of aberrant methylation and loss of heterozygosity of cancersuppressor genes in cfDNA as markers of renal cell carcinoma. XII annual Conference of Young Scientists Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine, Biopolymers and Cell. 2018. Vol. 34. N 2. P.162.
23. Дубровська Г.В., **Онищенко К.В.**, Перета Л.В., Григоренко В.М., Скрипкіна І.Я. Діагностичне та прогностичне значення гена *rassf1* у хворих на нирково-клітинний рак. Урологія, 2018 (87), 22 (4), с 24-28, DOI: 10.26641/2307-5279.22.4.2018.152471.
24. **Onyshchenko K.**, Kashparova O., Dubrovskа H., Pereta L., Gryhorenko V., Skrypkins I. Genetic and epigenetic changes on plasma cell-free dna as markers of

renal cell carcinoma. XI Parnas Conference – Young Scientists Forum, 2018, Ukr Biochem J, Vol.18, Special Issue, P.85.

25. Григоренко В.М., Скрипкіна І.Я., Перета Л.В., **Онищенко К.В.**, Кашпарова О.В. Патент на корисну модель № 134876 «Спосіб ранньої діагностики раку нирки». Зареєстровано в Державному реєстрі патентів України на корисну модель 10.06.2019 р

РОЗДІЛ 4

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

За останні 100 років за рівнем захворюваності та смертності онкопатологія перемістилася з десятого місця на друге, поступаючись лише хворобам серцево-судинної системи. Однак, на даний час смертність від онкологічних хвороб починає зрівнюватися, а в деяких країнах і переміщатися на перше місце. Відомо, що рак пов'язаний з різноманітними молекулярно-генетичними порушеннями, які призводять до утворення та розвитку пухлини, але за допомогою них також можливо прогнозувати перебіг захворювання [207], [208]. Генетичні аномалії, такі як хромосомні аберації та структурні порушення ДНК, є головною причиною канцерогенезу. Розвиток пухлини також залежить від епігенетичних перетворень, таких як метилювання ДНК, модифікація гістонів, ремоделювання хроматину [209]. Тому необхідно проводити широкомасштабні дослідження для пошуку генів-маркерів, що можуть вказувати на перебіг захворювання та визначення можливих механізмів впливу на їхню експресію при канцерогенезі, та використовуватися в якості мішеней таргетної дії.

В основі створення сучасних діагностичних та терапевтичних засобів для успішного лікування онкологічних захворювань лежить ідентифікація генів та їх продуктів, що приймають участь в злоякісній трансформації клітини. Поряд з традиційними методами лікування раку, а саме хіміотерапією та радіотерапією, в останні роки все більше уваги приділяється використанню індивідуальних підходів. Проте найкращою запорукою будь-якого лікування є рання діагностика захворювання, а для діагностики раку – саме неінвазивна діагностика, що заснована на визначенні біомаркерів у кров'яному руслі.

На сьогодні статус молекулярних маркерів при злоякісних пухлинах оцінюють методами імуногістохімії, імуноферментного аналізу, ЗТ-ПЛР та за

допомогою технології мікрочіпів, але жоден з перерахованих підходів не вирішує проблему ранньої діагностики раку, оскільки вони базуються на визначення зміни експресії та продукції генів у злоякісних пухлинах після їх видалення або використовують маркери, характерні для вже розвиненої пухлини. Розповсюдження в Україні, та й в усьому світі таких високих технологій, як генні сигнатури (Oncotype™ DX, Genomic Health, Inc., Редвуд, США; 70-генна "Амстердамська сигнатура", MammaPrint®, Agendia, BV, Амстердам, Нідерланди; 76-генна "Роттердамська сигнатура", Veridex, LLC, Warren, NJ) не мало успіху через високу вартість устаткування і реактивів та з причини недостатньої чутливості та специфічності таких систем.

Рак нирки, хоча і не виступає головним з показників смертності серед онкопацієнтів, проте є агресивними і, при пізньому виявленні, смертельним захворюванням. Кількість онкохворих зі злоякісними новоутвореннями нирки збільшилася в Україні на 2,1% і у 2019 році та склала біля 3,6% від усіх злоякісних новоутворень [210]. При цьому захворюваність серед жінок в Україні зросла на 3,3% у порівнянні з попереднім роком, а серед чоловіків - на 1,3%. У більш розвинених країнах цей показник є меншим. Наприклад, у США збільшення хворих на злоякісні новоутворення за останніх 10 років відбулося лише на 1,6%. У 2020 в США році було діагностовано 74 000 нових випадків раку нирки і 15 000 смертей від цього онкозахворбвання (20,3%) [211], [212]. Відомо, що у 25–30% пацієнтів з раком нирки діагностуються метастази на момент виявлення захворювання і навіть після радикального оперативного лікування у 20–30% хворих захворювання прогресує. Хірургічне втручання є «золотим стандартом» лікування, однак залишається актуальним питання про подальший перебіг захворювання, прогноз та виживаність пацієнта, а отже, вибір стратегії персоналізованого лікування. Також слід зазначити, що даний тип раку зазвичай є радіо- та хіміорезистентним, що значно ускладнює лікування даного захворювання при метастазуванні. В той же час важливо відмітити, що нирково-клітинний рак не є найбільш агресивним типом онкологічних захворювань і більш ніж 90% випадків, діагностованих на ранніх стадіях, підлягають

лікуванню. Проте, на даний час, існуючі методи діагностики не досить точні та не дозволяють виявляти захворювання на найбільш ранніх стадіях розвитку.

Організм досить довго приховує симптоми захворювання, саме тому дуже часто діагноз ставиться, коли хвороба вже досягає пізніх стадій і з'являються метастази в інших органах. Однак, на момент проявів цих симптомів може бути запізно для успішного лікування хворого. Більше 50% пацієнтів з НКК, виявленою на ранніх стадіях, виліковуються, але прогресування захворювання у IV стадію є загрозливим. Натепер приблизно 50% усіх випадків НКК виявляють випадково, за допомогою неінвазивних методів візуалізації під час діагностичного пошуку з приводу неспецифічних для даної патології симптомів. Часто НКК поєднується з пухлинами іншої локалізації, а в 4-5% випадків вже спостерігається двобічне ураження нирок. Отже, вчасне виявлення раку дозволяє застосовувати малоінвазивні методи хірургії (лапароскопічна резекція), що сприяє швидкому одужанню хворого і зменшенню розвитку супутніх ускладнень. Проте, якщо врятувати орган вже неможливо і виникає необхідність у радикальній нефректомії, це підвищує ризик поганого прогнозу для хворого у порівнянні із застосуванням резекції.

Отже, для запобігання смертності важливим є визначення маркерів, які можна використовувати для ранньої діагностики, прогностики, персоналізованого лікування та контролю перебігу захворювання під час терапії та після хірургічного втручання. Проте для НКК вони все ще не знайдені. Також надзвичайно актуальним є пошук маркерів, які б дозволили відрізнити на ранніх стадіях злоякісні і доброякісні новоутворення, світлоклітинну карциному нирки від менш агресивних типів раку, а також точно визначати вміст клітин різного походження при змішаних типах раку. Не менш важливим є і прогнозування утворення віддалених метастазів, ймовірності виникнення рецидиву, а також переродження морфологічно доброякісних новоутворень у злоякісні.

Останнім часом показана можливість використання вільноциркулюючих позаклітинних нуклеїнових кислот (таких як пкДНК, мікроРНК) у плазмі крові в якості потенційних діагностичних маркерів для різних типів клінічних

захворювань, в тому числі злоякісних новоутворень [22][25]. Епігенетичні порушення спостерігаються вже на початку злоякісної трансформації, тому їх детекція на пкНК дозволяє рано виявляти онкологічний процес [22], [55], [213], [214]. Позаклітинні нуклеїнові кислоти в плазмі або сироватці можуть виступати в якості так званої «рідкої біопсії», використання якої для діагностичних процедур дозволить уникнути необхідності біопсії пухлин органів. Тому на ринку створення діагностичних систем все більше інвестицій вкладається у тест-системи на основі визначення молекулярних маркерів саме у «рідких біопсіях».

Так, за даними досліджень «Analysis of the Global In Vitro Diagnostics Market» компанії Frost & Sullivan, ще на початку 2014 року глобальний ринок *in vitro* діагностики оцінювався у 47,27 мільярдів доларів США, з яких 5,8% від загального об'єму продаж засобів діагностики припадало на діагностування раку нирки.

Нині описані набори епігенетичних ДНК-маркерів, що дозволяють з високим ступенем специфічності виявити деякі типи пухлин. Також ці маркери чутливі на початкових стадіях розвитку захворювання, що дозволяє використовувати їх для ранньої онкодіагностики. Численні дослідження в галузі медичної епігеноміки вже дозволили розробити ряд способів епігенетичної ДНК-діагностики для деяких онкологічних захворювань, проте на світовому ринку на даний час представлені лише поодинокі тест-системи.

У більшості систем діагностики (наприклад, тестах Epi proColon (<http://www.epiprocolon.com/int>) і Epi proLung (<http://www.epiprolung.com/en/>) німецької компанії Epigenomics AG, в системі ConfirmMDx for Prostate Cancer американської компанії «MDxHealth» (<http://mdxhealth.com/>) використовуються методи, засновані на бісульфітній конверсії цитозинових основ з подальшим їх визначенням у складі генів-онкосупресорів.

Альтернативні методи, що базуються на використанні метил-зв'язуючих білків для виділення метильованої ДНК і її подальшої ампліфікації (наприклад, технологія MethylMeter (<http://ribomed.com/products/methylmeter/>), розроблена фахівцями американської компанії «RiboMed») дозволяють досягати високих

показників чутливості/специфічності і використовуються виробниками деяких тест-систем (наприклад, G-CIMP DecisionDX від «Castle Biosciences» (<http://castlebiosciences.com/>), США). Проте, вони залишаються досить трудомісткими, і потребують складного дороговартісного обладнання для кількісного аналізу результатів.

Крім методів діагностики раку, заснованих на використанні пкДНК, серед сучасних методів особливе місце займає вивчення ролі мікроРНК у розвитку онкологічних захворювань. мікроРНК є невеликими некодуючими РНК 18-25 нуклеотидів довжиною, які взаємодіють головним чином з 3'-нетрансльованими ділянками (3'-UTR) генів-мішеней і які, як правило, знижують їх експресію. На даний момент для багатьох мікроРНК встановлено зв'язок з деякими типами захворювань [215]. Показано, що багато мікроРНК залучені до дисрегуляції генів і прогресії злоякісних пухлин [216], в тому числі і карцином нирки [168], [217], [218]. На підставі рівнів експресії мікроРНК можливо класифікувати типи та підтипи раку, визначати прогресію захворювання [168]. Завдяки підібраним маркерам лікарі зможуть визначати, з якої тканини розвинулася пухлина і підібрати відповідний курс лікування.

Метастатичний процес складається з послідовних, взаємопов'язаних етапів, за допомогою яких первинні пухлинні клітини набувають здатності проникати в сусідню тканину, потрапляти в системний кровообіг, транслокуватися через судинну мережу, затримуватися у віддалених капілярах, екстрауватися в навколишню тканинну паренхіму і, нарешті, розмножуватися від мікрометастазів до макроскопічних вторинних пухлин [219]. Було визначено, що мікроРНК, регулюючи експресію генів ракових клітин, можуть сприяти чи, навпаки, інгібувати розвиток метастазів, виступаючи в ролі як *oncomiR*, так і супресорів.

В ході нещодавніх досліджень було встановлено, що у зразках плазми крові можна виявляти специфічні для певних типів раку мікроРНК і за їх складом та рівнем експресії виявляти людей з ранньою стадією хвороби, складати прогноз виживаності пацієнтів [168], [220], [221].

У зв'язку з цим, одним з завдань цієї роботи була розробка специфічних і чутливих маркерів для ранньої діагностики пухлин нирки та прогнозу перебігу захворювання на основі визначення рівнів мікроРНК для виявлення маркерів, що можуть далі використовуватися для неінвазивної детекції в плазмі крові в якості компонентів тест-систем ранньої діагностики скНKK. Отримані в результаті виконання цих досліджень дані будуть мати значення не тільки для діагностики пухлин нирки, а й слугуватимуть основою для виявлення інших типів раку та допоможуть у розробці схем персоніфікованого лікування.

Попередні дослідження показали, що мікроРНК miR-30c бере участь у багатьох біологічних подіях, включаючи апоптоз клітин, ріст і диференціацію [222]. Повідомлялося, що miR-30c регулюється в декількох типах раку, таких як рак сечового міхура, інвазивна мікропапілярна карцинома і пухлини піхви периферичних нервів [223]–[225], а також в пухлинах та клітинних лініях карциноми нирки [168], [226]–[228]. Так, мікроРНК miR-30-5p здатна регулювати рівень транскриптів гена *ZEB2* та *GRP78*, гіперекспресія яких викликає ріст пухлин [228], [229]. Також рівень miR-30-5p знижений у клітинах епітеліальних пухлин нирки, порівняно із нормальними тканинами [227].

З пригніченням росту пухлин асоційована також miR-138-1 [155], а її надекспресія корелює зі зменшенням теломерази hTERT і апоптозом пухлинних клітин [230]. До того ж, на клітинній лінії 786-O світлоклітинного раку нирки було показано, що miR-138 може негативно впливати на HIF-1a, надекспресія якого сприяє канцерогенезу, зменшує проліферацію та рухливість клітин даної пухлини [157].

Отримані нами дані [231] узгоджуються з результатами інших дослідників, що досліджували мікроРНК з родин miR-138 та miR-30 у пухлинах різної приналежності, в тому числі і у клітинних лініях пухлин нирки [157], [168], [226]–[229]. Автори вказують, що мікроРНК-30a та мікроРНК-30c негативно впливають на проліферацію клітин, а їх надекспресія пригнічує пухлиноутворення, інвазивність та метастазування. Таким чином, значне зниження експресії мікроРНК-30c-5p є несприятливим фактором, оскільки не

дозволяє пригнічувати експресію онкогенів у пухлинах хворих із НКК. Знижена експресія miR-30a-3p і miR-30c-2-3p була суттєво пов'язана з поганим прогнозом у пацієнтів з ccRCC [226]. Обидві мікроРНК націлені на індукований гіпоксією фактор 2 α (HIF-2 α) [226]. miR-138 також негативно впливає на здатність до клітинної міграції, зв'язуючись з мРНК проонкогенного білка TWIST2, що залучений в епітеліально-мезенхімальну трансформацію клітин [151]. Найцікавішою особливістю даної мікроРНК є те, що її експресія регулюється транскрипційним фактором p53 [150]. Нещодавно опубліковані Ма С. та співавторами (2020) результати з аналізу даних мікрочіпів РНК із пухлин скНKK та контрольних зразків з Gene Expression Omnibus та The Cancer Genome Atlas, щодо ідентифікації мережі дисрегульованих циркRNA-мікроРНК-мРНК, виявили, що miR-138-1-3p входить до групи 10 міРНК цієї мережі, що були значно пов'язані з виживанням пацієнтів з світлоклітинною НКК [232].

мікроРНК родини miR-200, експресія яких в зразках пухлин скНKK також визначалася у даній роботі, націлені на компоненти позаклітинного матриксу, такі як ламініни та колагени, що мають позитивний вплив на ангіогенез та метастазування клітин скНKK. Цього можна досягти шляхом пониження відповідних miRs. Так, експресія miR-200b обернено корелює з виживанням у пацієнтів з скНKK [233]. *In vivo* miR-200b не впливає на проліферацію, але пригнічує метастатичні колонії в легенях після ін'єкції хвостової вени у голих мишей. miR-200c перешкоджає поширенню та міграції клітин ліній скНKK OS-RC2 та Caki-1 [233].

MiR-324-5p відіграє роль в якості oncomiR, яка пригнічує експресію генів-супресорів у пухлинах різних типів раку людини. Попередні дослідження показують, що miR-324-5p бере участь у процесах прогресування раку, проліферації клітин, апоптозу та міграції клітин [234]–[236]. Показано, що miR-324-5p залучена в регуляторний процес деяких транскрипційних факторів, що, свою чергу, викликає подальші ефекти, пов'язані з цими генами, в тому числі сприяє стійкості до хіміотерапії [236]–[238]. Однак механізми, що лежать в

основі функцій miR-324-5p при ракових захворюваннях людини, залишаються значною мірою невідомими.

Як член сімейства miR-181, miR-181a-5p і miR-181a-3p, що кодуються однією пре-мікроРНК, організовані в три кластери як miR-181a/b-1, miR-181a/b-2 і miR-181 c/d [239]. Роль саме miR-181a-5p в пухлинах різного походження є суперечливою. Описано, що вона може виступати в якості як oncomiR, сприяючи прогресії пухлини [240], так і пухлинного супресора [241]. Також описано, що роль miR-181a-5p виявляє суперечливі функції в одних і тих же типах раку, або різних клітинних ліній, що походять з одного й того типу пухлин [242]–[244].

В даному дослідженні вперше визначено зміну експресії miR-324-5p та miR-181a-5p у пухлинах нирки людини.

Аналіз отриманих нами результатів кількісної ПЛР у реальному часі показав статистично достовірне зниження концентрації для мікроРНК hsa-miR-30a/c-5p, hsa-miR-138-1 [231] та hsa-miR-324-5p у пухлинах нирки відносно прилеглої до неї умовно нормальної тканини. Це робить їх хорошими кандидатами для проведення досліджень з визначення їх рівнів в плазмі крові пацієнтів як потенційних маркерів пухлиноутворення.

В той же час для hsa-miR-181a-5p та hsa-miR-200a-3p, не було виявлено статистично значущої різниці між відносною концентрацією мікроРНК в пухлинах та прилеглих умовно здорових тканинах. Проте ми визначили, що зміна експресії miR-200a-3p має потенціал для визначення типу пухлини: доброякісної чи злоякісної (AUC=0,8203). Для мікроРНК hsa-miR-30a-5p, hsa-miR-30c-5p, hsa-miR-138-1, hsa-miR-324-5p та miR-200a-3p показано їх достовірне зниження в пухлинах скНKK чоловіків по відношенню до жінок.

У вікових групах пацієнтів віком від 23 до 54 років визначено достовірне зниження мікроРНК hsa-miR-19b-3p, hsa-miR-30a-5p, hsa-miR-30c-5p та hsa-miR-138-1. Серед пацієнтів, віком від 55 до 64 років, визначено достовірне зниження мікроРНК hsa-miR-30a-5p, hsa-miR-30c-5p, hsa-miR-138-1 та hsa-miR-200a-3p. Серед пацієнтів, старших за 65 років, визначено достовірне зниження мікроРНК

hsa-miR-30c-5p, hsa-miR-138-1, hsa-miR-324-5p. Для мікроРНК hsa-miR-30c-5p та miR-138-1 показано достовірне зниження у пацієнтів всіх вікових груп.

При проведенні кореляційного аналізу визначено достовірне зниження мікроРНК hsa-miR-30a-5p у пацієнтів з II стадією хвороби, на відміну від I стадії (AUC=0,7552). Також показана доцільність використання показників рівнів експресії для мікроРНК hsa-miR-30a-5p (AUC=0,8229), hsa-miR-138-1 (AUC=0,8889) та hsa-miR-200a-3p (AUC=0,8229) для можливості розрізнення доброякісних пухлин нирки від пухлин скНKK I стадії злоякісності.

Для мікроРНК hsa-miR-19b-3p, hsa-miR-30a-5p, hsa-miR-30c-5p та hsa-miR-138-1 визначено достовірне зниження експресії у порівнянні з умовно здоровою тканиною нирки для визначення пухлин нирки перших стадій: розміром до 7 см (T1N0M0) та понад 7 см (T2N0M0).

Показано достовірне зниження кількості мікроРНК hsa-miR-30c-5p та hsa-miR-138-1 в пухлинах скНKK трьох категорій хворих, аналізованих за атипією морфології клітин за Фурман (G1, G2 та G3+4). Для hsa-miR-19b-3p та hsa-miR-30a-5p виявлена достовірна різниця для стадій G1 та G2 по відношенню до здорового контролю за Фурман. Для hsa-miR-324-5p різниця виявлена достовірною різницею для стадій G2 та G3+4 по відношенню до здорового контролю за Фурман. Для мікроРНК hsa-miR-200a-3p визначена висока вірогідність використання показників концентрацій для виявлення градації клітинної атипії за Фурман для розрізнення стадій G1 та G2 від G3+4 (AUC=0,9792 та AUC=1,0 відповідно). Показана можливість використання показників концентрацій мікроРНК hsa-miR-138-1 для розрізнення G2 від G3+4 стадії за Фурман (AUC=0,8333).

Визначено набір найвірогідніших маркерів тест-системи для ранньої діагностики раку нирки у жінок, що має містити hsa-miR-30a-5p, hsa-miR-30c-5p та hsa-miR-138-1.

Визначено набір найвірогідніших маркерів тест-системи для ранньої діагностики раку нирки у чоловіків, що має містити мікроРНК hsa-miR-30a-5p, hsa-miR-30c-5p, hsa-miR-138-1, hsa-miR-324-5p та hsa-miR-200a-3p.

Інактивація генів у пухлинах, що набувають злоякісних ознак, пов'язується також з соматичними реорганізаціями ДНК цих пухлин, які призводять до алельного дисбалансу. Серед таких реорганізацій відома велика кількість втрати гетерозиготності по STR-маркерах, прив'язаних до регуляції експресії деяких генів. Так, широковідомі реорганізації хромосоми 3 людини, що притаманні деяким видам пухлин і, насамперед, раку нирки. Ключовими генами, що впливають на появу раку нирки, розташованими на короткому плечі хромосоми 3 є гени-супресори *RASSF1* та *VHL*. Саме для них визначена найбільше випадків втрати гетерозиготності. Також, не менш важливим геном, алельний дисбаланс по маркерах якого спостерігається в пухлинах скНKK, є генів *CDKN2A*, що міститься на короткому плечі хромосоми 9 і метилування та втрату гетерозиготності якого пов'язують з різними типами раку. На думку El-Mokadem і співавт. (2016) втрата гетерозиготності (LOH) за маркером D9S916 гена *CDKN2A* безпосередньо пов'язана зі стадією і метастазуванням, тобто з більш агресивним раком нирки [42]. Однак, в нашому дослідженні LOH за маркером D9S916 була визначена тільки у 26% зразків, а за маркером D3S966 у більшій кількості досліджених ДНК (38,0%). Більші значення були і для визначення втрати гетерозиготності по маркерах хромосоми 3, асоційованих з генами *RASSF1* (D3S1568, 52%) та *VHL* (D3S1038, 48%) [90], [245], [246]. Цікавим є той факт, що неінформативність за маркером гена *VHL* (D3S1038, *VHL2*, D3S1317) на ДНК 7 зразків скНKK збігалась і з неможливістю визначення статусу метилування CpG-острівця промотора цього гена. Це може бути обумовлене наявністю делецій в ділянці даного гену, що притаманна для хромосоми 3 людини у клітинах цього виду пухлин [196], [247].

Визначення LOH проводили методом ПЛР з подальшими різними методами детекції: визначення втрати гетерозиготності STR-маркерів розділенням фрагментів у ПААГ та шляхом детекції флюоресцентно-мічених фрагментів після розділення капілярним електрофорезом. Детектовані різними методами LOH на зразках хворих зі скНKK підтвердили, що метод визначення втрати гетерозиготності шляхом розділення їх капілярним електрофорезом і

визначення мічених фрагментів є більш чутливим [89], [246], [248]. Використання цього методу дозволило підвищити чутливість визначення зразків пухлин скННК з ЛОН, сумарно по всіх генах, з 76% до 81,7%. При цьому для гена *RASSF1* сумарна чутливість збільшилася з 31,7% до 68,3% по двох досліджуваних маркерах, для *CDKN2A* – з 26,5% до 32,8% по двох маркерах, а для гена *VHL*, для якого ми використовували тільки один флуоресцентномічений маркер – з 31,7 до 48,2%. Оскільки в нашому дослідженні використовували біопсії пухлин переважно перших стадій розвитку ННК (80% пацієнтів), тож ми змогли детектувати ЛОН досліджуваних STR-маркерів вже на перших стадіях пухлиноутворення. Тож можна сказати, що даний метод варто використовувати в подальшому для визначення втрати гетерозиготності, його чутливість допоможе у подальших дослідженнях визначення ЛОН на пкДНК плазми крові, що є перспективним маркером діагностування пухлиноутворення, в першу чергу скННК.

Кількісні зміни складу нуклеїнових кислот (ДНК, мРНК, мікроРНК) також можуть бути використані у якості специфічних маркерів раку вже на ранніх стадіях патології [22], [220], [249], [250]. Тож одним з показників, який ми використали для досліджень, було визначення концентрації позаклітинних ДНК в крові хворих на рак нирки.

Рівень пкДНК у плазмі крові може бути універсальним маркером злоякісності [157]. Багато досліджень показали, що зміни концентрації пкДНК можуть корелювати з розвитком, прогнозом та виживаністю хворих на рак. Збільшення концентрації пкДНК спостерігалось у пацієнтів з раком молочної залози, шлунка, яєчників, легенів, товстої кишки та простати [22], [251], [252]. Підвищення концентрації пкДНК у хворих на рак пов'язане з апоптозом та некрозом ракових клітин у мікросередовищі пухлини [253]. Це підтверджено численними специфічними для раку змінами (такими як алельний дисбаланс, метилювання та мутації), які були виявлені на пкДНК крові [22], [26]. Також було продемонстровано, що моніторинг рівня пкДНК в периферичній крові

може бути використаний як біомаркер відповіді на терапію при різних типах раку [254]–[256].

Попередні дослідження продемонстрували, що оцінка концентрації низькомолекулярної пкДНК (до 100 п.н.) є найбільш репрезентативною для виявлення злоякісних пухлин та прогнозу захворювання, оскільки рівень фрагментів такого розміру зростає із прогресуванням захворювання [257], [258]. Так, Лу та співавт. [259] показали, що фрагменти пкДНК 67 п.н та 180 п.н. не відрізнялися між контролем та зразками пацієнтів зі світлоклітинною карциномою нирки (скННК) без метастазів, тоді як індекс цілісності пкДНК знижувався від контролю до групи з метастазами. Значно вищі концентрації фрагментів з низькою молекулярною масою були виявлені у пацієнтів з скННК [259]. В нашому дослідженні ми показали збільшення концентрації пкДНК у хворих з ННК з використанням детекції пкДНК фрагмента гена бета актину, розміром 99 п.н. [88]. В експериментах інших груп дослідників також продемонструвано підвищення рівня пкДНК у крові пацієнтів з раком нирки порівняно зі здоровими людьми [200], [260], [261].

Абсолютні значення концентрацій пкДНК, отримані нами за допомогою двох різних методів різняться за значеннями (11–2249 нг/мл плазми у флуоресцентному тесті порівняно з 23–1177 нг/мл у кількісному ПЛР у реальному часі), але в обох випадках вони були значно вищими, ніж у здорових людей (4–426 нг/мл у флуоресцентному тесті та 3–146 нг / мл у кПЛР) [88]. Отримані результати узгоджуються з даними інших досліджень, в яких визначення концентрації пкДНК за допомогою флуоресцентних барвників дало вищі значення, ніж qPCR [26], [199]. Високі значення AUC, отримані в наших експериментах для обох методів вимірювання концентрації пкДНК у пацієнтів з ННК (0,7679 для флуоресцентного тесту та 0,80494 для кПЛР) демонструють, що ці методи можуть бути використані для клінічних досліджень [88].

Ще один показник наявності пухлинної ДНК в плазмі крові – це визначення її фрагментованості. Нещодавні дослідження показали, що в кров з некротичних пухлин попадає переважно високомолекулярна ДНК, тоді як у здорових людей

пкДНК, що визначається в крові – апоптична, що має менші розміри. Таким чином, визначаючи рівні пакДНК коротких та довгих фрагментів, що знаходяться в крові людини, можна визначити, чи є в ній ДНК, яка потрапила з клітин внаслідок патологічного процесу. В нашому дослідженні, що базувалося на визначенні відношень коротких та довгих фрагментів гена АСТВ (АСТВ384/АСТВ106), було підтверджено зменшення фрагментації пакДНК, отриманої з плазми крові пацієнтів з скНKK (медіана для АСТВ384/АСТВ106=1,126), у порівнянні з контрольною групою здорових донорів (медіана для АСТВ384/АСТВ106=0,685), що вказує на доцільність використання цього показника для попередньої діагностики раку, а також можливість для моніторингу наявності в організмі пацієнта метастатичних клітин, не видалених під час операції.

На додаток до кількісних змін, пакДНК також має якісні зміни, які відбуваються в ДНК пухлинних клітин, такі як мутації, мікросателітна нестабільність та метилювання [22], [30], [262]. Метилювання промоторів генів є добре відомим механізмом регуляції експресії генів [260]. Найчастіше аберантне метилювання генів у дорослому організмі відбувається у ракових клітинах. Аберантне метилювання промотору, виявлене на пакДНК, може використовуватися для неінвазивного виявлення раку, диференціальної діагностики, прогнозу виживання та відповіді на терапію раку [120], [263], [264].

У цьому дослідженні ми провели дослідження метилювання раніше ідентифікованих генів супресорів пухлини на пакДНК плазми крові та у зразках пухлин і прилеглих до пухлини нормальних тканин нирки [88]–[90], [245], [248]. Дослідження проводилися на зразках одних і тих самих пацієнтів. Ми хотіли не тільки визначити низку генів, що зазнають гіперметилювання у новоутвореннях нирки, але й перевірити, чи відповідають підвищені рівні метилювання CpG-острівців на пакДНК тих самих хворих. Крім того, виявлення генів, CpG-острівців промоторів яких з високою ймовірністю метильовані, завдяки чому можуть бути детектовані у плазмі крові хворих на рак нирки, можливо використовувати і для ранньої діагностики і для моніторингу хвороби.

Дані багатьох досліджень показують, що ген *RASSF1* відіграє важливу роль у канцерогенезі. Гіперметилування CpG-острівців *RASSF1* пов'язане з різними типами раку та ризиком прогресування раку [265]. Дослідження метилування цього гена в сироватці крові показали суперечливі результати. В дослідженні Hauser S. та співавт. [200] метилування *RASSF1A* було виявлено у 22,9% хворих; в роботі Де Мартіно та співавт. [261] рівень метилування *RASSF1A* був у 45,9% пацієнтів, а Ноуе та співавт. [120] виявили метилування промотора цього гена в 11% зразків сироватки крові пацієнтів з скНKK. Такі відмінності в рівнях метилування гена *RASSF1* можна пояснити тим, що для аналізу були вибрані різні CpG-острівці в межах промоторної ділянки гена. Hauser та співавт. [200] та De Martino та співавт. [261] аналізували ділянку, розташовану вище за течією ініціаційного кодону. Раніше повідомлялося, що ці два CpG-островці диференційовано метильовані в клітинних лініях меланоми та пухлинах меланоми [266]. Ellinger та ін. [267] продемонстрували 100% кореляцію між гіперметилуванням ДНК промотору *RASSF1A* та папілярним НКК. Однак проведене дослідження De Martino та ін. [261] 31 зразку папілярних НКК не виявило жодного зв'язку метилування *RASSF1A* з гістологічними підтипами НКК. Саме тому ми вивчали метилування ділянок CpG, розташованих в межах обох промоторів, що регулюють експресію транскриптів *RASSF1A* та *RASSF1C* [88]–[90]. У проведених нами дослідженнях рівнів метилування CpG-острівця промотора *RASSF1A* було виявлено у 74% зразків новоутворень та 67% зразків плазми крові. CpG-острівець промотора для *RASSF1C* був метильований в меншій кількості: 48% зразків геномної ДНК пухлин та 14% – пкДНК. У нашому дослідженні, серед 5 перевірених зразків хворих з папілярним НКК, CpG-острівець промотора *RASSF1A* виявився метильованим в усіх зразках пухлин та плазми крові, а *RASSF1C* – у трьох зразках пацієнтів на ДНК пухлини і двох зразках пкДНК. Тільки один з цих пацієнтів, що мав метилування CpG-острівця промотора *RASSF1A* в усіх перевірених зразках, мав рецидив онкозахворювання. Проте перевірена вибірка пНKK не велика і ми не можемо робити значущі висновки.

Раніше науковцями нашого відділу були визначені зміни в промоторі гена *LRRC3B* під час пошуку генетичних та епігенетичних порушень у хромосомі 3 в епітеліальних пухлинах за допомогою NotI-мікрочипів [77], [268], [269]. *LRRC3B* був ідентифікований Kim et al. [78] як передбачуваний супресор генів декількох пухлин, які замовчуються при раку шлунка за допомогою епігенетичних механізмів. Посилене метилювання промотору гена *LRRC3B* було підтверджено у зразках скННК та колоректального раку, раку голови та ший [78], [80], [270]. Проте високий рівень гіперметилювання *LRRC3B* в нашому дослідженні було відзначено не лише у плазмі крові пацієнтів з ННК (48%), але і у здорових донорів (33%), ставлячи під сумнів використання цього гена для діагностики раку нирок на пкДНК [88], [90].

СрG-острівець промотора транскрипта гена *CDKN2A(p14)* виявився метильованим у 82% пухлин та 48% пкДНК хворих на скННК. В той же час метилювання СрG-острівця промотору транскрипта *CDKN2A(p16)* було відмічено у 48% зразків пухлин та 36% пкДНК. Визначення метилювання СрG-острівців впромоторів генів *TIMP3*, *CDKN2A/p16* та *VHL* [246], [248], що за попередніми даними інших дослідників зазнають метилювання при декількох типах раку, а також і у нирковій карциномі [117], [200], [205], [271], не показало перспективності використання цих маркерів на пкДНК плазми крові з огляду на низький відсоток гіперметилюваних зразків пухлин у нашому дослідженні.

СрG-острівець промотора гена *APC* був метильований в досліджуваній нами вибірці пацієнтів з ННК у великій кількості (77% у пухлинах і 61% на пкДНК) [88], [90], що узгоджується з результатами Hauser та його колег [200], які детектували гіперметилювання промотору гена *APC* у 54,3% пацієнтів на пкДНК.

Гіперметилювання СрG-острівців промоторів пкДНК були виявлені і для інших генів у плазмі хворих не оперованих пацієнтів (*PCDH8* – у 59% зразків, *GPX3* - у 47%). Дослідження статусу метилювання цих фрагментів ми проводили одночасно як на гДНК пухлин нирки, так і на пкДНК в плазмі крові тих самих осіб, яку збирали у хворих через 5-7 днів після операції та отимали наступні

результати: *RASSF1A* (41%), *RASSF1C* (12%), *GPX3* (14%), *APC* (10%), *LLRC3B* (48%). Раніше повідомлялося, що концентрації пкДНК після видалення пухлини значно падають, а отже, ми передбачували, що разом з тим буде падати і рівень метилювання досліджуваних CpG-острівців промоторів генів. Дійсно, майже для всіх перевірених фрагментів, рівні метилювання цих ділянок значно знизилися, окрім CpG-острівця *RASSF1A* (що був найбільше метильований у плазмі хворих на скНKK – 67,4%) та *LLRC3B* (гіперметилювання CpG-острівця якого ми спостерігали у всіх перевірених біологічних зразках хворих на рак). Отже, з огляду на ці дані, ми можемо підтвердити, що не зважаючи на неповне загоєння оперованої нирки у хворих з скНKK.

Спираючись на отримані результати метилювання генів *CDKN2A(p16)*, *CDKN2A(p14ARF)* та *VHL* та на отримані результати з втрати алельного дисбалансу по маркерних локусах генів *CDKN2A* (D9S916, D9S974, D9S171) та *VHL* (D3S1038, D3S1317) [90], [246] можна зробити висновок у доцільності використання сумісного визначення втрати алельного дисбалансу за геном *CDKN2A* (маркери D9S916 та D9S974) та метилювання генів *p14ARF* і *VHL* в якості маркерів несприятливого прогнозу, що допоможе в подальшому при створенні тест-систем для визначення прогнозу перебігу захворювання та вибору ефективної схеми лікування онкохворих на світлоклітинний рак нирки.

Впровадження результатів розробки панелей маркерів для діагностики раку нирки в клінічну практику матиме суттєвий соціальний та економічний ефект. Рання діагностика раку нирки і, зокрема, світлоклітинної карциноми, що є найагресивнішим підтипом, забезпечить запобігання прогресії хвороби, вчасне та більш ефективне лікування, швидше одужання та збереження життя працездатного населення. Скорочення терміну перебування пацієнтів у лікарнях допоможе скороченню перебування хворого на ліжку і зменшенню витрат держави на лікування, зменшенню кількості рецидивів, а також сприятиме зменшенню витрат на реабілітацію, покращенню якості і подовженню життя хворих та збереженню їх працездатності.

ВИСНОВКИ

Використовуючи оприлюднені дані у відкритих базах даних (публікації у PubMed, веб-сервер GEPIA (інтерактивний аналіз профілювання експресії генів) та веб-бази мікроРНК), було відібрано епігенетичні та генетичні порушення, які можуть бути в процесі виникнення раку нирки та слугувати молекулярними маркерами класифікації підтипів нирково-клітинної карциноми, ранньої діагностики раку на пкДНК крові, використовуватися для розробки терапії раку, вибору оптимальної схеми лікування та моніторингу перебігу захворювання. Встановлено, що використання таких показників як рівні експресії пкмикроРНК, втрати гетерозиготності, концентрація та індекс цілісності пкДНК, а також детекція гіперметилування генів-супресорів на пкДНК, виділеної з плазми крові пацієнтів, можна запропонувати в якості потенційних маркерів для ранньої діагностики раку нирки.

1. Виявлено зміни експресії мікроРНК hsa-miR-30a-5p, hsa-miR-30c-5p, hsa-miR-138-1, hsa-miR-324-5p, hsa-miR-181a-5p та hsa-miR-200a-3p у новоутвореннях нирки в порівнянні зі здоровою контрольною тканиною.

2. Вперше показано достовірне зниження мікроРНК miR-30a-5p у пацієнтів з II стадією світлоклітинної карциноми нирки, на відміну від I стадії (AUC=0,7552)

3. Вперше показана доцільність використання показників експресії мікроРНК hsa-miR-30a-5p (AUC=0,8229), hsa-miR-138-1 (AUC=0,8889) та hsa-miR-200a-3p (AUC=0,8229) для можливості встановлення I стадії чи доброякісності пухлин нирки.

4. Вперше було з'ясовано, що hsa-miR-30a-5p, hsa-miR-30c-5p та hsa-miR-138-1 мають достовірне зниження експресії у порівнянні зі здоровим контролем для визначення пухлин нирки перших стадій (розміром до 7 см (T1N0M0) та понад 7 см (T2N0M0)).

5. Вперше показана кореляція зниження кількості мікроРНК hsa-miR-30c-5p, hsa-miR-138-1, hsa-miR-200a-3p та hsa-miR-324-5p в пухлинах нирки з градаціями атипії клітин за Фурман.

6. Вперше визначено набори мікроРНК, які можуть бути використані для уточнювальної діагностики новоутворень нирки за клініко-морфологічними показниками: стадія, класифікація TNM, атипія клітин за Фурман.

7. Було детектовано мікросателітні зміни STR-маркерів генів *RASSF1* у 68,3%, *VHL* – у 48,2%, *CDKN2A* – 32,7% інформативних зразків досліджуваної групи хворих на рак нирки навіть на перших стадіях розвитку пухлини, що підтверджує їхню роль у розвитку цієї патології і, найбільше, гена *RASSF1*. Детектовано мікросателітні зміни STR-маркерів гена *RASSF1* у 68,3%, *VHL* – у 48,2%, *CDKN2A* – 32,7% інформативних зразків досліджуваної групи хворих на рак нирки.

8. Встановлено зростання концентрації пкДНК у плазмі крові пацієнтів зі скРН на відміну від контрольної групи донорів та показано, що використання для цього методу кількісної ПЛР у реальному часі, є більш точним для діагностики захворювання, ніж метод інтеркаляції флуоресцентного барвника.

9. Показано збільшення індексу цілісності пкДНК, отриманої з плазми крові пацієнтів з раком нирки, що вказує на можливість використання цього показника для попередньої діагностики раку, а також є важливим для моніторингу наявності в організмі пацієнта метастатичних клітин, не видалених під час операції.

10. Вперше, на великій вибірці зразків пацієнтів (пухлина, умовно здорова тканина нирки, плазма крові пацієнтів до і після хірургічного втручання), було визначено статус метилювання CpG-острівців генів-супресорів *RASSF1A*, *RASSF1C*, *LRRC3B*, *GPX3*, *PCDH8*, *RUNX3*, *APC*, *TIMP3*, *VHL*, *p14ARF*, *p16INK4a*.

11. Визначено, що гіперметилювання CpG-острівців промоторів генів *RASSF1A*, *GPX3*, *APC* та *p14ARF* на пкДНК плазми крові може бути використано для ранньої діагностики раку нирки.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ПЕРІОДЖЕРЕЛ

- [1] S. A. Leon, G. E. Ehrlich, B. Shapiro, and V. A. Labbate, "Free DNA in the serum of rheumatoid arthritis patients.," *J. Rheumatol.*, vol. 4, no. 2, pp. 139–143, 1977.
- [2] A. Volpe and J. J. Patard, "Prognostic factors in renal cell carcinoma," *World J. Urol.*, vol. 28, no. 3, pp. 319–327, Jun. 2010, doi: 10.1007/s00345-010-0540-8.
- [3] B. I. Rini, S. C. Campbell, and B. Escudier, "Renal cell carcinoma," *The Lancet*, vol. 373, no. 9669. Lancet, pp. 1119–1132, 2009. doi: 10.1016/S0140-6736(09)60229-4.
- [4] H. T. Cohen and F. J. McGovern, "Renal-cell carcinoma," *N. Engl. J. Med.*, vol. 353, no. 23, pp. 2477–2490, 2005, doi: 10.1056/NEJMRA043172.
- [5] X. Han, J. Wang, and Y. Sun, "Circulating Tumor DNA as Biomarkers for Cancer Detection," *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*, vol. 15, no. 2. Elsevier, pp. 59–72, 2017. doi: 10.1016/j.gpb.2016.12.004.
- [6] J. J. Hsieh *et al.*, "Renal cell carcinoma," *Nat. Rev. Dis. Prim.*, vol. 3, p. 17009, 2017, doi: 10.1038/NRDP.2017.9.
- [7] I. Virtanen and V. P. Lehto, "Progression of malignancy in clear cell renal cell carcinomas," *Scand. J. Surg.*, vol. 93, no. 2, pp. 112–117, 2004, doi: 10.1177/145749690409300205.
- [8] E. C. Pfaffenroth and W. M. Linehan, "Genetic Basis for Kidney Cancer: Opportunity for Disease-Specific Approaches to Therapy," *Expert Opin. Biol. Ther.*, vol. 8, no. 6, p. 779, 2008, doi: 10.1517/14712598.8.6.779.
- [9] F. Algaba *et al.*, "Current pathology keys of renal cell carcinoma," *Eur. Urol.*, vol. 60, no. 4, pp. 634–643, 2011, doi: 10.1016/J.EURURO.2011.06.047.
- [10] "Global In-Vitro Diagnostics (IVD) Market Analysis 2014-2017 with Forecasts to 2025 - ResearchAndMarkets.com | Business Wire." Accessed: Nov. 11, 2018. [Online]. Available: <https://www.businesswire.com/news/home/20180411006252/en/Global-In-Vitro-Diagnostics-IVD-Market-Analysis-2014->

- 2017-with-Forecasts-to-2025---ResearchAndMarkets.com
- [11] “Epi proColon: Septin9 Publications.” Accessed: Aug. 10, 2015. [Online]. Available: <http://www.epiprocolon.com/en/e-support-library/septin9-publications.html>
 - [12] “Kneip_et_al__J_Thoracic_Oncol_2011_.pdf.” Accessed: Aug. 10, 2015. [Online]. Available: http://www.epiprolung.com/uploads/tx_txpublicationslist/Kneip_et_al__J_Thoracic_Oncol_2011_.pdf
 - [13] “ConfirmMDx for Prostate Cancer Test Featured in ONCOLOGY - mdxhealth.” Accessed: Jun. 23, 2018. [Online]. Available: https://mdxhealth.com/press_release/confirmmdx-for-prostate-cancer-test-featured-in-oncology/
 - [14] D. McCarthy *et al.*, “MethylMeter®: bisulfite-free quantitative and sensitive DNA methylation profiling and mutation detection in FFPE samples,” *Epigenomics*, vol. 8, no. 6, p. 747, 2016, doi: 10.2217/EPI-2016-0004.
 - [15] “Castle Biosciences: Molecular Diagnostics for Cancers.” Accessed: Jun. 23, 2018. [Online]. Available: <https://castlebiosciences.com/>
 - [16] P. Mandel and P. Metais, “Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l’homme /Nuclear acids in human blood plasma,” *C R Seances Soc Biol Fil*, vol. 142, no. 3–4, pp. 241–3, 1948.
 - [17] V. Vasioukhin, P. Anker, P. Maurice, J. Lyautey, C. Lederrey, and M. Stroun, “Point mutations of the N-ras gene in the blood plasma DNA of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia,” *Br. J. Haematol.*, vol. 86, no. 4, pp. 774–779, 1994.
 - [18] J. J. Choi, C. F. Reich, and D. S. Pisetsky, “The role of macrophages in the in vitro generation of extracellular DNA from apoptotic and necrotic cells,” *Immunology*, vol. 115, no. 1, p. 55, 2005, doi: 10.1111/J.1365-2567.2005.02130.X.
 - [19] G. D. Sorenson, D. M. Pribish, F. H. Valone, V. A. Memoli, D. J. Bzik, and S. L. Yao, “Soluble Normal and Mutated DNA Sequences from Single-Copy Genes in Human Blood,” *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, vol. 3, no. 1, pp. 67–71, 1994

- [20] P. B. Gahan and R. Swaminathan, “Circulating nucleic acids in plasma and serum. Recent developments,” *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1137, pp. 1–6, 2008, doi: 10.1196/ANNALS.1448.050.
- [21] M. Stroun, J. Lyautey, C. Lederrey, A. Olson-Sand, and P. Anker, “About the possible origin and mechanism of circulating DNA: Apoptosis and active DNA release,” *Clin. Chim. Acta*, vol. 313, no. 1–2, pp. 139–142, 2001, doi: 10.1016/S0009-8981(01)00665-9.
- [22] H. Schwarzenbach, D. S. B. Hoon, and K. Pantel, “Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients.,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 11, no. 6, pp. 426–437, 2011, doi: 10.1038/nrc3066.
- [23] D. A. Low, N. J. Weyand, and M. J. Mahan, “Roles of DNA adenine methylation in regulating bacterial gene expression and virulence,” *Infect. Immun.*, vol. 69, no. 12, pp. 7197–7204, 2001, doi: 10.1128/IAI.69.12.7197-7204.2001.
- [24] N. P. Blackledge and R. J. Klose, “CpG island chromatin: A platform for gene regulation,” *Epigenetics*, vol. 6, no. 2, p. 147, 2011, doi: 10.4161/EPI.6.2.13640.
- [25] L. S. Kristensen and L. L. Hansen, “PCR-based methods for detecting single-locus DNA methylation biomarkers in cancer diagnostics, prognostics, and response to treatment,” *Clinical Chemistry*, vol. 55, no. 8. Clin Chem, pp. 1471–1483, 01, 2009. doi: 10.1373/clinchem.2008.121962.
- [26] K. Jung, M. Fleischhacker, and A. Rabien, “Cell-free DNA in the blood as a solid tumor biomarker-A critical appraisal of the literature,” *Clin. Chim. Acta*, vol. 411, no. 21–22, pp. 1611–1624, 2010, doi: 10.1016/j.cca.2010.07.032.
- [27] J. Ellinger *et al.*, “Hypermethylation of cell-free serum DNA indicates worse outcome in patients with bladder cancer,” *J. Urol.*, vol. 179, no. 1, pp. 346–352, 2008, doi: 10.1016/J.JURO.2007.08.091.
- [28] S. N. Shah, S. E. Hile, and K. A. Eckert, “Defective mismatch repair, microsatellite mutation bias, and variability in clinical cancer phenotypes,” *Cancer Res.*, vol. 70, no. 2, pp. 431–435, 2010, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-3049.
- [29] S. Jahr *et al.*, “DNA fragments in the blood plasma of cancer patients:

- Quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells,” *Cancer Res.*, vol. 61, no. 4, pp. 1659–1665, 2001.
- [30] M. Fleischhacker and B. Schmidt, “Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer-A survey,” *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer*, vol. 1775, no. 1, pp. 181–232, 2007, doi: 10.1016/j.bbcan.2006.10.001.
- [31] R. Von Knobloch, A. Hegele, H. Brandt, P. Olbert, A. Heidenreich, and R. Hofmann, “Serum DNA and urine DNA alterations of urinary transitional cell bladder carcinoma detected by fluorescent microsatellite analysis,” *Int. J. Cancer*, vol. 94, no. 1, pp. 67–72, 2001, doi: 10.1002/ijc.1434.
- [32] E. Sunami *et al.*, “Multimarker circulating DNA assay for assessing blood of prostate cancer patients,” *Clin. Chem.*, vol. 55, no. 3, pp. 559–67, 2009, doi: 10.1373/clinchem.2008.108498.
- [33] I. Lavon, M. Refael, B. Zelikovitch, E. Shalom, and T. Siegal, “Serum DNA can define tumor-specific genetic and epigenetic markers in gliomas of various grades,” *Neuro. Oncol.*, vol. 12, no. 2, pp. 173–80, 2010, doi: 10.1093/neuonc/nop041.
- [34] Garcia, “Extracellular Tumor DNA in Plasma and Overall Survival in Breast Cancer Patients,” *Genes. Chromosomes Cancer*, vol. 47, 2005, pp. 238–246, 2008, doi: 10.1002/gcc.
- [35] P. G. Schurr *et al.*, “Clinical value of loss of heterozygosity in serum microsatellite DNA of patients with gastrointestinal stromal tumors,” *J. Clin. Gastroenterol.*, vol. 43, no. 1, pp. 27–35, 2009, doi: 10.1097/MCG.0B013E3181581914.
- [36] V. Ludovini *et al.*, “Plasma DNA, microsatellite alterations, and p53 tumor mutations are associated with disease-free survival in radically resected non-small cell lung cancer patients: a study of the perugia multidisciplinary team for thoracic oncology,” *J. Thorac. Oncol.*, vol. 3, no. 4, pp. 365–373, 2008, doi: 10.1097/JTO.0B013E318168C7D0.
- [37] N. Ren, L. X. Qin, H. Tu, Y. K. Liu, B. H. Zhang, and Z. Y. Tang, “The prognostic value of circulating plasma DNA level and its allelic imbalance on

- chromosome 8p in patients with hepatocellular carcinoma,” *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, vol. 132, no. 6, pp. 399–407, 2006, doi: 10.1007/S00432-005-0049-5.
- [38] D. P. O’Malley *et al.*, “Loss of heterozygosity identifies genetic changes in chronic myeloid disorders, including myeloproliferative disorders, myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukemia,” *Mod. Pathol.* 2007 2011, vol. 20, no. 11, pp. 1166–1171, 2007, doi: 10.1038/modpathol.3800951.
- [39] S. V. Buldyrev, N. V. Dokholyan, S. Havlin, H. E. Stanley, and R. H. R. Stanley, “Expansion of tandem repeats and oligomer clustering in coding and noncoding DNA sequences,” *Phys. A Stat. Mech. its Appl.*, vol. 273, no. 1–2, pp. 19–32, 1999, doi: 10.1016/S0378-4371(99)00338-6.
- [40] S. Takeuchi *et al.*, “Long-term study of the clinical significance of loss of heterozygosity in childhood acute lymphoblastic leukemia,” *Leuk.* 2003 171, vol. 17, no. 1, pp. 149–154, 2003, doi: 10.1038/sj.leu.2402727.
- [41] M. L. C. Vieira, L. Santini, A. L. Diniz, and C. de F. Munhoz, “Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful,” *Genet. Mol. Biol.*, vol. 39, no. 3, pp. 312–328, 2016, doi: 10.1590/1678-4685-GMB-2016-0027.
- [42] E.-M. Ismail, K. Thomas, P. Norman, F. Stewart, and N. Ghulam, “Tumour suppressor gene (CDKNA2) status on chromosome 9p in resected renal tissue improves prognosis of localised kidney cancer,” *Oncotarget*, vol. 7, no. 45, pp. 73045–73054, 2016, doi: 10.18632/oncotarget.12196.
- [43] A. F. Correa *et al.*, “Overall tumor genomic instability: an important predictor of recurrence-free survival in patients with localized clear cell renal cell carcinoma,” *Cancer Biol. Ther.*, vol. 21, no. 5, p. 424, 2020, doi: 10.1080/15384047.2020.1721251.
- [44] L. Poluben *et al.*, “Copy number alterations and copy-neutral loss of heterozygosity in Ukrainian patients with primary myelofibrosis,” *Exp. Oncol.*, vol. 41, no. 1, pp. 53–56, 2019, doi: 10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-41-no-1.12540.
- [45] J. Ellinger *et al.*, “Apoptotic DNA fragments in serum of patients with muscle

- invasive bladder cancer: a prognostic entity,” *Cancer Lett.*, vol. 264, no. 2, pp. 274–280, 2008, doi: 10.1016/J.CANLET.2008.01.038.
- [46] N. Umetani *et al.*, “Prediction of breast tumor progression by integrity of free circulating DNA in serum,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 24, no. 26, pp. 4270–4276, 2006, doi: 10.1200/JCO.2006.05.9493.
- [47] A. Di Meo, J. Bartlett, Y. Cheng, M. D. Pasic, and G. M. Yousef, “Liquid biopsy: a step forward towards precision medicine in urologic malignancies,” *Mol. Cancer*, vol. 16, no. 1, 2017, doi: 10.1186/S12943-017-0644-5.
- [48] E. Vizza *et al.*, “Serum DNA integrity index as a potential molecular biomarker in endometrial cancer,” *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, vol. 37, no. 1, 2018, doi: 10.1186/S13046-018-0688-4.
- [49] A. M. Kamel, S. Teama, A. Fawzy, and M. El Deftar, “Plasma DNA integrity index as a potential molecular diagnostic marker for breast cancer,” *Tumor Biol.*, vol. 37, no. 6, pp. 7565–7572, 2016, doi: 10.1007/s13277-015-4624-3.
- [50] B. Schmidt, S. Weickmann, C. Witt, and M. Fleischhacker, “Integrity of cell-free plasma DNA in patients with lung cancer and nonmalignant lung disease,” in *Annals of the New York Academy of Sciences*, Ann N Y Acad Sci, 2008, pp. 207–213. doi: 10.1196/annals.1448.034.
- [51] E. Sunami, A. T. Vu, S. L. Nguyen, A. E. Giuliano, and D. S. B. Hoon, “Quantification of LINE1 in circulating DNA as a molecular biomarker of breast cancer,” *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1137, pp. 171–174, 2008, doi: 10.1196/ANNALS.1448.011.
- [52] U. Deligezer *et al.*, “Size distribution of circulating cell-free DNA in sera of breast cancer patients in the course of adjuvant chemotherapy,” *Clin. Chem. Lab. Med.*, vol. 46, no. 3, pp. 311–317, 2008, doi: 10.1515/CCLM.2008.080.
- [53] F. Gang, L. Guorong, Z. An, G.-P. Anne, G. Christian, and T. Jacques, “Prediction of clear cell renal cell carcinoma by integrity of cell-free DNA in serum,” *Urology*, vol. 75, no. 2, pp. 262–5, 2010, doi: 10.1016/j.urology.2009.06.048.
- [54] S. Holdenrieder, A. Burges, O. Reich, F. W. Spelsberg, and P. Stieber, “DNA

- integrity in plasma and serum of patients with malignant and benign diseases,” in *Annals of the New York Academy of Sciences*, Ann N Y Acad Sci, 2008, pp. 162–170. doi: 10.1196/annals.1448.013.
- [55] J. L. Boddy, S. Gal, P. R. Malone, A. L. Harris, and J. S. Wainscoat, “Prospective Study of Quantitation of Plasma DNA Levels in the Diagnosis of Malignant versus Benign Prostate Disease Prospective Study of Quantitation of Plasma DNA Levels in the Diagnosis of Malignant versus Benign Prostate Disease,” pp. 1394–1399, 2005.
- [56] M. Salimi and S. S. Burkhani, “Integrity and Quantity Evaluation of Plasma Cell-Free DNA in Triple Negative Breast Cancer,” *Avicenna J. Med. Biotechnol.*, vol. 11, no. 4, pp. 334–338, 2019,
- [57] C. Bedin, M. V. Enzo, P. Del Bianco, S. Pucciarelli, D. Nitti, and M. Agostini, “Diagnostic and prognostic role of cell-free DNA testing for colorectal cancer patients,” *Int. J. Cancer*, vol. 140, no. 8, pp. 1888–1898, 2017, doi: 10.1002/IJC.30565.
- [58] B. G. Wang *et al.*, “Increased plasma DNA integrity in cancer patients,” *Cancer Res.*, vol. 63, no. 14, pp. 3966–8, Jul. 2003, Accessed: 23, 2015. [Online]. Available: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/63/14/3966.abstract>
- [59] R. Hanley *et al.*, “DNA integrity assay: a plasma-based screening tool for the detection of prostate cancer,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 12, no. 15, pp. 4569–4574, 2006, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-0130.
- [60] W. W. Jiang *et al.*, “Increased plasma DNA integrity index in head and neck cancer patients,” *Int. J. cancer*, vol. 119, no. 11, pp. 2673–2676, 2006, doi: 10.1002/IJC.22250.
- [61] K. C. A. Chan, S. F. Leung, S. W. Yeung, A. T. C. Chan, and Y. M. D. Lo, “Persistent aberrations in circulating DNA integrity after radiotherapy are associated with poor prognosis in nasopharyngeal carcinoma patients,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 14, no. 13, pp. 4141–4145, 2008, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-0182.
- [62] J. Ellinger *et al.*, “Noncancerous PTGS2 DNA fragments of apoptotic origin in

- sera of prostate cancer patients qualify as diagnostic and prognostic indicators,” *Int. J. cancer*, vol. 122, no. 1, pp. 138–143, 2008, doi: 10.1002/IJC.23057.
- [63] J. L. Boddy, S. Gal, P. R. Malone, N. Shaida, J. S. Wainscoat, and A. L. Harris, “The role of cell-free DNA size distribution in the management of prostate cancer,” *Oncol. Res.*, vol. 16, no. 1, pp. 35–41, 2006, doi: 10.3727/000000006783981297.
- [64] M. Macaluso, M. G. Paggi, and A. Giordano, “Genetic and epigenetic alterations as hallmarks of the intricate road to cancer,” *Oncogene*, vol. 22, no. 42, pp. 6472–6478, 2003, doi: 10.1038/SJ.ONC.1206955.
- [65] T. A. Potapova, J. Zhu, and R. Li, “Aneuploidy and chromosomal instability: a vicious cycle driving cellular evolution and cancer genome chaos,” *Cancer Metastasis Rev.*, vol. 32, no. 3–4, pp. 377–389, 2013, doi: 10.1007/S10555-013-9436-6.
- [66] I. Martincorena and P. J. Campbell, “Somatic mutation in cancer and normal cells,” *Science*, vol. 349, no. 6255, pp. 1483–1489, 2015, doi: 10.1126/SCIENCE.AAB4082.
- [67] J. Zhang *et al.*, “Recurrent BRCA1 and BRCA2 mutations in breast cancer patients of African ancestry,” *Breast Cancer Res. Treat.*, vol. 134, no. 2, pp. 889–894, 2012, doi: 10.1007/s10549-012-2136-z.
- [68] Z. Li *et al.*, “Integrated analysis of gene expression and methylation profiles of 48 candidate genes in breast cancer patients,” *Breast Cancer Res. Treat.*, vol. 160, no. 2, pp. 371–383, 2016, doi: 10.1007/s10549-016-4004-8.
- [69] A. D. Goldberg, C. D. Allis, and E. Bernstein, “Epigenetics: a landscape takes shape,” *Cell*, vol. 128, no. 4, pp. 635–638, 2007, doi: 10.1016/J.CELL.2007.02.006.
- [70] E. Baxter, K. Windloch, F. Gannon, and J. S. Lee, “Epigenetic regulation in cancer progression,” *Cell Biosci.*, vol. 4, no. 1, pp. 1–11, 2014, doi: 10.1186/2045-3701-4-45/FIGURES/2.
- [71] G. Takebe *et al.*, “A comparative study on the hydroperoxide and thiol specificity of the glutathione peroxidase family and selenoprotein P,” *J. Biol.*

- Chem.*, vol. 277, no. 43, pp. 41254–41258, 2002, doi: 10.1074/JBC.M202773200.
- [72] F. F. Chu, R. S. Esworthy, J. H. Doroshov, K. Doan, and X. F. Liu, “Expression of plasma glutathione peroxidase in human liver in addition to kidney, heart, lung, and breast in humans and rodents,” *Blood*, vol. 79, no. 12, pp. 3233–3238, 1992, doi: 10.1182/blood.v79.12.3233.bloodjournal79123233.
- [73] B. Chen, X. Rao, M. G. House, K. P. Nephew, K. J. Cullen, and Z. Guo, “GPx3 promoter hypermethylation is a frequent event in human cancer and is associated with tumorigenesis and chemotherapy response,” *Cancer Lett.*, vol. 309, no. 1, pp. 37–45, 2011, doi: 10.1016/j.canlet.2011.05.013.
- [74] P. J. Morin and A. T. Weeraratna, “The APC tumor suppressor pathway,” *Methods Mol. Biol.*, vol. 222, pp. 21–40, 2003, doi: 10.1385/1-59259-328-3:021.
- [75] M. Bienz and F. Hamada, “Adenomatous polyposis coli proteins and cell adhesion,” *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 16, no. 5, Curr Opin Cell Biol, pp. 528–535, 2004. doi: 10.1016/j.ceb.2004.08.001.
- [76] K. Aoki and M. M. Taketo, “Adenomatous polyposis coli (APC): A multi-functional tumor suppressor gene,” *Journal of Cell Science*, vol. 120, no. 19, J Cell Sci, pp. 3327–3335, Oct. 01, 2007. doi: 10.1242/jcs.03485.
- [77] I. Y. Skrypkina *et al.*, “Identification of change in gene loci potentially associated with renal cancer using novel techniques of NotI microarrays,” *Proc. Acad. Sci. Ukr.*, vol. 11, pp. 188–192, 2006, doi: 10.1007/s13398-014-0173-7.2.
- [78] M. Kim *et al.*, “LRRC3B, Encoding a Leucine-Rich Repeat-Containing Protein, Is a Putative Tumor Suppressor Gene in Gastric Cancer,” *Cancer Res.*, vol. 68, no. 17, pp. 7147–7155, 2008, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0667.
- [79] A. V. Kajava, “Structural diversity of leucine-rich repeat proteins,” *Journal of Molecular Biology*, vol. 277, no. 3, J Mol Biol, pp. 519–527, 1998. doi: 10.1006/jmbi.1998.1643.
- [80] A. G. Kondratov, K. a Nekrasov, L. V Lototska, G. V Panasenko, and L. a Stoliar, “Comparative analysis of epigenetic markers in plasma and tissue of patients with colorectal cancer,” vol. 30, pp. 129–134, 2014.

- [81] I. Y. Skrypkinina *et al.*, “Detection of cell-free DNA and gene-specific methylation in blood plasma of patients with renal and colon cancer,” *Sci. Innov.*, vol. 8, no. 6, pp. 60–66, 2012, [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.15407/scin8.06.060>
- [82] M. E. Katz and F. McCormick, “Signal transduction from multiple Ras effectors,” *Curr. Opin. Genet. Dev.*, vol. 7, no. 1, pp. 75–79, 1997, doi: 10.1016/S0959-437X(97)80112-8.
- [83] L. Liu, S. Tommasi, D. H. Lee, R. Dammann, and G. P. Pfeifer, “Control of microtubule stability by the RASSF1A tumor suppressor,” *Oncogene*, vol. 22, no. 50, pp. 8125–8136, 2003, doi: 10.1038/sj.onc.1206984.
- [84] N. Vlahov *et al.*, “Alternate RASSF1 Transcripts Control SRC Activity, E-Cadherin Contacts, and YAP-Mediated Invasion,” *Curr. Biol.*, vol. 25, no. 23, pp. 3019–34, 2015, doi: 10.1016/j.cub.2015.09.072.
- [85] H. Donniger, M. D. Vos, and G. J. Clark, “The RASSF1A tumor suppressor,” *J. Cell Sci.*, vol. 120, no. Pt 18, pp. 3163–3172, 2007, doi: 10.1242/JCS.010389.
- [86] R. Dammann, C. Li, J. H. Yoon, P. L. Chin, S. Bates, and G. P. Pfeifer, “Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21.3,” *Nat. Genet.*, vol. 25, no. 3, pp. 315–319, 2000, doi: 10.1038/77083.
- [87] G. P. Pfeifer, J. H. Yoon, L. Liu, S. Tommasi, S. P. Wilczynski, and R. Dammann, “Methylation of the RASSF1A gene in human cancers,” *Biological Chemistry*, vol. 383, no. 6. Biol Chem, pp. 907–914, 2002. doi: 10.1515/BC.2002.097.
- [88] I. Skrypkinina *et al.*, “Concentration and Methylation of Cell-Free DNA from Blood Plasma as Diagnostic Markers of Renal Cancer,” *Dis. Markers*, vol. 2016, pp. 1–10, 2016, doi: 10.1155/2016/3693096.
- [89] H. V. Dubrovskaya, K. V. Onyshchenko, L. V. Pereta, O. V. Kashparova, V. M. Grygorenko, and I. Y. Skrypkinina, “Microsatellite alteration and metylation of RASSF1 gene in renal cell carcinoma,” *Factors Exp. Evol. Org.*, vol. 23, pp. 192–196, 2018, doi: DOI: <https://doi.org/10.7124/FEEO.v23.1013>.
- [90] I. Y. Skrypkinina *et al.*, “Detection of the methylation status of genes LRRC3B,

- RASSF1A, APC of the cell-free and tumor DNA patients with renal cell carcinoma,” *Heal. men*, vol. 2, no. 53, pp. 166–170, 2015.
- [91] N. El Hajj, M. Dittrich, and T. Haaf, “Epigenetic dysregulation of protocadherins in human disease,” *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 69, pp. 172–182, 2017, doi: 10.1016/J.SEMCDB.2017.07.007.
- [92] S. Hayashi *et al.*, “Protocadherin-17 mediates collective axon extension by recruiting actin regulator complexes to interaxonal contacts.,” *Dev. Cell*, vol. 30, no. 6, pp. 673–87, 2014, doi: 10.1016/j.devcel.2014.07.015.
- [93] G. Shishodia, S. Koul, and H. K. Koul, “Protocadherin 7 is overexpressed in castration resistant prostate cancer and promotes aberrant MEK and AKT signaling,” *Prostate*, vol. 79, no. 15, pp. 1739–1751, 2019, doi: 10.1002/PROS.23898.
- [94] J.-G. Ma, “Aberrant Methylation of PCDH8 is a Potential Prognostic Biomarker for Patients with Clear Cell Renal Cell Carcinoma,” *Med. Sci. Monit.*, vol. 20, pp. 2380–2385, 2014, doi: 10.12659/MSM.892433.
- [95] Z. Zong, H. Pang, R. Yu, and Y. Jiao, “PCDH8 inhibits glioma cell proliferation by negatively regulating the AKT/GSK3 β / β -catenin signaling pathway,” *Oncol. Lett.*, vol. 14, no. 3, pp. 3357–3362, 2017, doi: 10.3892/OL.2017.6629.
- [96] H. Yu *et al.*, “Protocadherin 8 (PCDH8) Inhibits Proliferation, Migration, Invasion, and Angiogenesis in Esophageal Squamous Cell Carcinoma,” *Med. Sci. Monit.*, vol. 26, 2020, doi: 10.12659/MSM.920665.
- [97] S. Y. Kim, S. Yasuda, H. Tanaka, K. Yamagata, and H. Kim, “Non-clustered protocadherin,” *Cell Adh. Migr.*, vol. 5, no. 2, pp. 97–105, 2011, doi: 10.4161/CAM.5.2.14374.
- [98] Y. Cao *et al.*, “Low Expression of Protocadherin-8 Promotes the Progression of Ovarian Cancer,” *Int. J. Gynecol. Cancer*, vol. 28, no. 2, pp. 346–354, 2018, doi: 10.1097/IGC.0000000000001169.
- [99] C. Zhang, Y. Peng, F. Yang, R. Qin, W. Liu, and C. Zhang, “PCDH8 is Frequently Inactivated by Promoter Hypermethylation in Liver Cancer: Diagnostic and Clinical Significance,” *J. Cancer*, vol. 7, no. 4, pp. 446–52,

- 2016, doi: 10.7150/jca.13065.
- [100] D. He *et al.*, “Protocadherin8 is a functional tumor suppressor frequently inactivated by promoter methylation in nasopharyngeal carcinoma,” *Eur. J. Cancer Prev.*, vol. 21, no. 6, pp. 569–575, 2012, doi: 10.1097/CEJ.0B013E328350B097.
- [101] Y.-L. Lin, Y.-L. Wang, J.-G. Ma, and W.-P. Li, “Clinical significance of protocadherin 8 (PCDH8) promoter methylation in non-muscle invasive bladder cancer,” *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, vol. 33, no. 1, p. 68, 2014, doi: 10.1186/s13046-014-0068-7.
- [102] Y. Li, C. Liu, Z. Wang, and G. Hu, “Expression of protocadherin8: Function as a tumor suppressor in hypopharyngeal carcinoma,” *Cancer Biomark.*, vol. 22, no. 3, pp. 495–502, 2018, doi: 10.3233/CBM-171137.
- [103] J.-G. Ma, “Aberrant Methylation of PCDH8 is a Potential Prognostic Biomarker for Patients with Clear Cell Renal Cell Carcinoma,” *Med. Sci. Monit.*, vol. 20, pp. 2380–2385, 2014, doi: 10.12659/MSM.892433.
- [104] W. Y. Kim and W. G. Kaelin, “Role of VHL gene mutation in human cancer,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 22, no. 24, pp. 4991–5004, 2004, doi: 10.1200/JCO.2004.05.061.
- [105] M. Nordstrom-O’Brien *et al.*, “Genetic analysis of von Hippel-Lindau disease,” *Hum. Mutat.*, vol. 31, no. 5, pp. 521–537, 2010, doi: 10.1002/HUMU.21219.
- [106] R. E. Banks *et al.*, “Genetic and epigenetic analysis of von Hippel-Lindau (VHL) gene alterations and relationship with clinical variables in sporadic renal cancer,” *Cancer Res.*, vol. 66, no. 4, pp. 2000–2011, 2006, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-3074.
- [107] N. Shenoy and L. Pagliaro, “Sequential pathogenesis of metastatic VHL mutant clear cell renal cell carcinoma: putting it together with a translational perspective,” *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.*, vol. 27, no. 9, pp. 1685–1695, 2016, doi: 10.1093/ANNONC/MDW241.
- [108] L. Cheng, S. Zhang, G. T. MacLennan, A. Lopez-Beltran, and R. Montironi, “Molecular and cytogenetic insights into the pathogenesis, classification,

- differential diagnosis, and prognosis of renal epithelial neoplasms,” *Hum. Pathol.*, vol. 40, no. 1, pp. 10–29, 2009, doi: 10.1016/J.HUMPATH.2008.09.009.
- [109] J. I. López, “Renal tumors with clear cells. A review,” *Pathol. Res. Pract.*, vol. 209, no. 3, pp. 137–146, 2013, doi: 10.1016/J.PRP.2013.01.007.
- [110] J. R. Forman, C. L. Worth, G. R. J. Bickerton, T. G. Eisen, and T. L. Blundell, “Structural bioinformatics mutation analysis reveals genotype-phenotype correlations in von Hippel-Lindau disease and suggests molecular mechanisms of tumorigenesis,” *Proteins*, vol. 77, no. 1, pp. 84–96, 2009, doi: 10.1002/PROT.22419.
- [111] L. G. Aoude, K. A. W. Wadt, A. L. Pritchard, and N. K. Hayward, “Genetics of familial melanoma: 20 years after CDKN2A,” *Pigment Cell Melanoma Res.*, vol. 28, no. 2, pp. 148–160, 2015, doi: 10.1111/PCMR.12333.
- [112] Á. VinuÉ *et al.*, “Changes in CDKN2A/2B expression associate with T-cell phenotype modulation in atherosclerosis and type 2 diabetes mellitus,” *Transl. Res.*, vol. 203, pp. 31–48, 2019, doi: 10.1016/J.TRSL.2018.08.003.
- [113] S. Maddika *et al.*, “Cell survival, cell death and cell cycle pathways are interconnected: Implications for cancer therapy,” *Drug Resist. Updat.*, vol. 10, no. 1–2, pp. 13–29, 2007, doi: 10.1016/J.DRUP.2007.01.003.
- [114] A. Al-Kaabi, L. W. van Bockel, A. J. Pothen, and S. M. Willems, “p16INK4A and p14ARF gene promoter hypermethylation as prognostic biomarker in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma: a review,” *Dis. Markers*, vol. 2014, p. 260549, 2014, doi: 10.1155/2014/260549.
- [115] W. Y. Kim and N. E. Sharpless, “The Regulation of INK4/ARF in Cancer and Aging,” *Cell*, vol. 127, no. 2, pp. 265–275, 2006, doi: 10.1016/j.cell.2006.10.003.
- [116] I. El-Mokadem *et al.*, “Microsatellite alteration and immunohistochemical expression profile of chromosome 9p21 in patients with sporadic renal cell carcinoma following surgical resection,” *BMC Cancer*, vol. 16, p. 546, 2016, doi: 10.1186/s12885-016-2514-8.
- [117] J. H. Qi and B. Anand-Apte, “Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (TIMP3)

- promotes endothelial apoptosis via a caspase-independent mechanism,” *Apoptosis*, vol. 20, no. 4, pp. 523–534, 2015, doi: 10.1007/s10495-014-1076-y.
- [118] A. T. Lorincz, “Cancer diagnostic classifiers based on quantitative DNA methylation,” *Expert Rev. Mol. Diagn.*, vol. 14, no. 3, pp. 293–305, 2014, doi: 10.1586/14737159.2014.897610.
- [119] U. Saraiva-Esperón, A. Ruibal, and M. Herranz, “The contrasting epigenetic role of RUNX3 when compared with that of MGMT and TIMP3 in glioblastoma multiforme clinical outcomes,” *J. Neurol. Sci.*, vol. 347, no. 1–2, pp. 325–331, 2014, doi: 10.1016/J.JNS.2014.10.043.
- [120] M. O. Hoque, “Quantitative Detection of Promoter Hypermethylation of Multiple Genes in the Tumor, Urine, and Serum DNA of Patients with Renal Cancer,” *Cancer Res.*, vol. 64, no. 15, pp. 5511–5517, 2004, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0799.
- [121] M. O. Hoque, “DNA methylation changes in prostate cancer: current developments and future clinical implementation,” *Expert Rev. Mol. Diagn.*, vol. 9, no. 3, pp. 243–57, 2009, doi: 10.1586/erm.09.10.
- [122] H. Onay, S. Pehlivan, M. Koyuncuoglu, Z. Kirkali, and F. Ozkinay, “Multigene methylation analysis of conventional renal cell carcinoma,” *Urol. Int.*, vol. 83, no. 1, pp. 107–112, 2009, doi: 10.1159/000224878.
- [123] R. García-Baquero, P. Puerta, M. Beltran, M. Alvarez-Mújica, J. L. Alvarez-Ossorio, and M. Sánchez-Carbayo, “Methylation of tumor suppressor genes in a novel panel predicts clinical outcome in paraffin-embedded bladder tumors,” *Tumour Biol.*, vol. 35, no. 6, pp. 5777–5786, 2014, doi: 10.1007/S13277-014-1767-6.
- [124] M. M. Cohen, “Perspectives on RUNX genes: an update,” *Am. J. Med. Genet. A*, vol. 149A, no. 12, pp. 2629–2646, 2009, doi: 10.1002/AJMG.A.33021.
- [125] Q. L. Li *et al.*, “Causal Relationship between the Loss of RUNX3 Expression and Gastric Cancer,” *Cell*, vol. 109, no. 1, pp. 113–124, 2002, doi: 10.1016/S0092-8674(02)00690-6.
- [126] D. Wei *et al.*, “Loss of RUNX3 expression significantly affects the clinical

- outcome of gastric cancer patients and its restoration causes drastic suppression of tumor growth and metastasis,” *Cancer Res.*, vol. 65, no. 11, pp. 4809–4816, 2005, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-3741.
- [127] F. Chen *et al.*, “RUNX3 suppresses migration, invasion and angiogenesis of human renal cell carcinoma,” *PLoS One*, vol. 8, no. 2, p. e56241, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0056241.
- [128] F. Chen, X. Liu, J. Bai, D. Pei, and J. Zheng, “The emerging role of RUNX3 in cancer metastasis (Review),” *Oncol. Rep.*, vol. 35, no. 3, pp. 1227–1236, 2016, doi: 10.3892/OR.2015.4515.
- [129] S.-H. Tan *et al.*, “Detection of promoter hypermethylation in serum samples of cancer patients by methylation-specific polymerase chain reaction for tumour suppressor genes including RUNX3,” *Oncol. Rep.*, vol. 18, no. 5, pp. 1225–30, 2007,
- [130] H. J. Song, K.-N. Shim, Y.-H. Joo, S.-E. Kim, S.-A. Jung, and K. Yoo, “Methylation of the Tumor Suppressor Gene RUNX3 in Human Gastric Carcinoma,” *Gut Liver*, vol. 2, no. 2, pp. 119–125, 2008, doi: 10.5009/gnl.2008.2.2.119.
- [131] S. Y. Park *et al.*, “Distinct patterns of promoter CpG island methylation of breast cancer subtypes are associated with stem cell phenotypes,” *Mod. Pathol.*, vol. 25, no. 2, pp. 185–196, 2012, doi: 10.1038/modpathol.2011.160.
- [132] A. Majchrzak-Celińska *et al.*, “The methylation of a panel of genes differentiates low-grade from high-grade gliomas,” *Tumour Biol.*, vol. 36, no. 5, pp. 3831–41, 2015, doi: 10.1007/s13277-014-3025-3.
- [133] G. Steponaitis, A. Kazlauskas, P. Vaitkienė, V. P. Deltuva, M. Mikuciunas, and D. Skiriutė, “Oncosuppressive Role of RUNX3 in Human Astrocytomas,” *J. Oncol.*, vol. 2019, 2019, doi: 10.1155/2019/1232434.
- [134] B. C. Bernardo, J. Y. Y. Ooi, R. C. Y. Lin, and J. R. McMullen, “miRNA therapeutics: a new class of drugs with potential therapeutic applications in the heart,” *Future Med. Chem.*, vol. 7, no. 13, pp. 1771–1792, 2015, doi: 10.4155/FMC.15.107.

- [135] S. J. Matkovich *et al.*, “MicroRNA-133a protects against myocardial fibrosis and modulates electrical repolarization without affecting hypertrophy in pressure-overloaded adult hearts,” *Circ. Res.*, vol. 106, no. 1, pp. 166–175, 2010, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.202176.
- [136] M. Ha and V. N. Kim, “Regulation of microRNA biogenesis,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 15, no. 8, pp. 509–524, 2014, doi: 10.1038/NRM3838.
- [137] T. Kawamata and Y. Tomari, “Making RISC,” *Trends Biochem. Sci.*, vol. 35, no. 7, pp. 368–376, 2010, doi: 10.1016/J.TIBS.2010.03.009.
- [138] Y. Wang *et al.*, “Nucleation, propagation and cleavage of target RNAs in Ago silencing complexes,” *Nature*, vol. 461, no. 7265, pp. 754–761, 2009, doi: 10.1038/NATURE08434.
- [139] H. Kobayashi and Y. Tomari, “RISC assembly: Coordination between small RNAs and Argonaute proteins,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1859, no. 1, pp. 71–81, 2016, doi: 10.1016/J.BBAGRM.2015.08.007.
- [140] T. Kawamata, M. Yoda, and Y. Tomari, “Multilayer checkpoints for microRNA authenticity during RISC assembly,” *EMBO Rep.*, vol. 12, no. 9, pp. 944–949, 2011, doi: 10.1038/EMBOR.2011.128.
- [141] A. Turchinovich and B. Burwinkel, “Distinct AGO1 and AGO2 associated miRNA profiles in human cells and blood plasma,” *RNA Biol.*, vol. 9, no. 8, pp. 1066–1075, 2012, doi: 10.4161/RNA.21083.
- [142] J. M. Pare, P. LaPointe, and T. C. Hobman, “Hsp90 cochaperones p23 and FKBP4 physically interact with hAgo2 and activate RNA interference-mediated silencing in mammalian cells,” *Mol. Biol. Cell*, vol. 24, no. 15, pp. 2303–2310, 2013, doi: 10.1091/MBC.E12-12-0892.
- [143] N. J. Martinez, H. M. Chang, J. De Riba Borrajo, and R. I. Gregory, “The co-chaperones Fkbp4/5 control Argonaute2 expression and facilitate RISC assembly,” *RNA*, vol. 19, no. 11, pp. 1583–1593, 2013, doi: 10.1261/RNA.040790.113.
- [144] D. Gibbings *et al.*, “Human prion protein binds Argonaute and promotes accumulation of microRNA effector complexes,” *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 19,

- no. 5, pp. 517–524, 2012, doi: 10.1038/NSMB.2273.
- [145] D. J. Gibbings, C. Ciaudo, M. Erhardt, and O. Voinnet, “Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity,” *Nat. Cell Biol.*, vol. 11, no. 9, pp. 1143–1149, 2009, doi: 10.1038/NCB1929.
- [146] K. Felekis, E. Touvana, C. Stefanou, and C. Deltas, “MicroRNAs: A newly described class of encoded molecules that play a role in health and disease,” *Hippokratia*, vol. 14, no. 4, pp. 236–240, 2010. Accessed: 14, 2023. [Online]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21311629/>
- [147] G. Di Leva, M. Garofalo, and C. M. Croce, “MicroRNAs in cancer,” *Annu. Rev. Pathol.*, vol. 9, pp. 287–314, 2014, doi: 10.1146/ANNUREV-PATHOL-012513-104715.
- [148] S. Shantikumar, A. Caporali, and C. Emanuelli, “Role of microRNAs in diabetes and its cardiovascular complications,” *Cardiovasc. Res.*, vol. 93, no. 4, pp. 583–593, 2012, doi: 10.1093/CVR/CVR300.
- [149] A. Hata, “Functions of microRNAs in cardiovascular biology and disease,” *Annu. Rev. Physiol.*, vol. 75, pp. 69–93, 2013, doi: 10.1146/ANNUREV-PHYSIOL-030212-183737.
- [150] J. Li *et al.*, “Species-specific mutual regulation of p53 and miR-138 between human, rat and mouse,” *Sci. Rep.*, vol. 6, p. 26187, 2016, doi: 10.1038/srep26187.
- [151] H. H. Sha *et al.*, “MiR-138: A promising therapeutic target for cancer,” *Tumor Biol.*, vol. 39, no. 4, 2017, doi: 10.1177/1010428317697575.
- [152] D. Yu, F. An, X. He, and X. Cao, “Curcumin inhibits the proliferation and invasion of human osteosarcoma cell line MG-63 by regulating miR-138,” *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, vol. 8, no. 11, pp. 14946–14952, 2015, Accessed: Nov. 15, 2023. [Online]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26823826/>
- [153] A. Zottel *et al.*, “Analysis of miR-9-5p, miR-124-3p, miR-21-5p, miR-138-5p, and miR-1-3p in glioblastoma cell lines and extracellular vesicles,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, no. 22, pp. 1–22, Nov. 2020, doi: 10.3390/ijms21228491.

- [154] H. Zhang *et al.*, “MiR-138 inhibits tumor growth through repression of EZH2 in non-small cell lung cancer,” *Cell. Physiol. Biochem.*, vol. 31, no. 1, pp. 56–65, 2013, doi: 10.1159/000343349.
- [155] F. Ma, M. Zhang, W. Gong, M. Weng, and Z. Quan, “MiR-138 suppresses cell proliferation by targeting Bag-1 in gallbladder carcinoma,” *PLoS One*, vol. 10, no. 5, 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0126499.
- [156] Y. Xiong, J. Zhang, and C. Song, “CircRNA ZNF609 functions as a competitive endogenous RNA to regulate FOXP4 expression by sponging miR-138-5p in renal carcinoma,” *J. Cell. Physiol.*, vol. 234, no. 7, pp. 10646–10654, 2019, doi: 10.1002/jcp.27744.
- [157] T. Song *et al.*, “MiR-138 suppresses expression of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) in clear cell renal cell carcinoma 786-O cells,” *Asian Pac J Cancer Prev*, vol. 12, no. 5, pp. 1307–1311, 2011.
- [158] Z. Zhang *et al.*, “Selective expression of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand mediated by microRNA suppresses renal carcinoma growth,” *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 392, no. 1–2, pp. 125–134, 2014, doi: 10.1007/s11010-014-2025-3.
- [159] L. Long, G. Huang, H. Zhu, Y. Guo, Y. Liu, and J. Huo, “Down-regulation of miR-138 promotes colorectal cancer metastasis via directly targeting TWIST2,” *J. Transl. Med.*, vol. 11, no. 1, 2013, doi: 10.1186/1479-5876-11-275.
- [160] Z. Zhu, J. Tang, J. Wang, G. Duan, L. Zhou, and X. Zhou, “MiR-138 Acts as a Tumor Suppressor by Targeting EZH2 and Enhances Cisplatin-Induced Apoptosis in Osteosarcoma Cells,” *PLoS One*, vol. 11, no. 3, 2016, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0150026.
- [161] L. Zhang *et al.*, “The miR-181 family promotes cell cycle by targeting CTDSPL, a phosphatase-like tumor suppressor in uveal melanoma,” *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, vol. 37, no. 1, 2018, doi: 10.1186/S13046-018-0679-5.
- [162] J. Liu, Y. Xing, and L. Rong, “miR-181 regulates cisplatin-resistant non-small cell lung cancer via downregulation of autophagy through the PTEN/PI3K/AKT pathway,” *Oncol. Rep.*, vol. 39, no. 4, pp. 1631–1639, 2018, doi:

10.3892/OR.2018.6268.

- [163] S. Huang *et al.*, “MicroRNA-181a modulates gene expression of zinc finger family members by directly targeting their coding regions,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 38, no. 20, pp. 7211–7218, Nov. 2010, doi: 10.1093/NAR/GKQ564.
- [164] T. C. Chang *et al.*, “Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis,” *Nat. Genet.*, vol. 40, no. 1, pp. 43–50, 2008, doi: 10.1038/NG.2007.30.
- [165] J. Brennecke, A. Stark, R. B. Russell, and S. M. Cohen, “Principles of microRNA-target recognition,” *PLoS Biol.*, vol. 3, no. 3, pp. 0404–0418, Mar. 2005, doi: 10.1371/JOURNAL.PBIO.0030085.
- [166] S. Volinia *et al.*, “Reprogramming of miRNA networks in cancer and leukemia,” *Genome Res.*, vol. 20, no. 5, pp. 589–599, 2010, doi: 10.1101/GR.098046.109.
- [167] O. Ichii and T. Horino, “MicroRNAs associated with the development of kidney diseases in humans and animals,” *J. Toxicol. Pathol.*, vol. 31, no. 1, pp. 23–34, 2018, doi: 10.1293/TOX.2017-0051.
- [168] J. Heinzelmann *et al.*, “MicroRNAs with prognostic potential for metastasis in clear cell renal cell carcinoma: A comparison of primary tumors and distant metastases,” *Ann. Surg. Oncol.*, vol. 21, no. 3, pp. 1046–1054, 2014, doi: 10.1245/s10434-013-3361-3.
- [169] R. Kumarswamy *et al.*, “MicroRNA-30a inhibits epithelial-to-mesenchymal transition by targeting Snail and is downregulated in non-small cell lung cancer,” *Int. J. cancer*, vol. 130, no. 9, pp. 2044–2053, 2012, doi: 10.1002/IJC.26218.
- [170] S. M. Park, A. B. Gaur, E. Lengyel, and M. E. Peter, “The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2,” *Genes Dev.*, vol. 22, no. 7, pp. 894–907, 2008, doi: 10.1101/GAD.1640608.
- [171] L. V. Rhodes *et al.*, “Dual regulation by microRNA-200b-3p and microRNA-200b-5p in the inhibition of epithelial-to-mesenchymal transition in triple-negative breast cancer,” *Oncotarget*, vol. 6, no. 18, pp. 16638–16652, 2015, doi:

10.18632/ONCOTARGET.3184.

- [172]C. J. Kao *et al.*, “miR-30 as a tumor suppressor connects EGF/Src signal to ERG and EMT,” *Oncogene*, vol. 33, no. 19, pp. 2495–2503, 2014, doi: 10.1038/ONC.2013.200.
- [173]M. I, C. D, A. LL, S. JA, and D. D, “miR-29 and miR-30 regulate B-Myb expression during cellular senescence,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 108, no. 2, pp. 522–527, 2011, doi: 10.1073/PNAS.1017346108.
- [174]Z. Zhong, Y. Xia, P. Wang, B. Liu, and Y. Chen, “Low expression of microRNA-30c promotes invasion by inducing epithelial mesenchymal transition in non-small cell lung cancer,” *Mol. Med. Rep.*, vol. 10, no. 5, pp. 2575–2579, 2014, doi: 10.3892/mmr.2014.2494.
- [175]C. Wu *et al.*, “MiR-30d induces apoptosis and is regulated by the Akt/FOXO pathway in renal cell carcinoma,” *Cell. Signal.*, vol. 25, no. 5, pp. 1212–1221, 2013, doi: 10.1016/j.cellsig.2013.01.028.
- [176]S. J. Yang *et al.*, “The miR-30 family: Versatile players in breast cancer,” *Tumor Biology*, vol. 39, no. 3. 2017. doi: 10.1177/1010428317692204.
- [177]P. A. Gregory *et al.*, “The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1,” *Nat. Cell Biol.*, vol. 10, no. 5, pp. 593–601, 2008, doi: 10.1038/NCB1722.
- [178]M. Korpai, E. S. Lee, G. Hu, and Y. Kang, “The miR-200 family inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer cell migration by direct targeting of E-cadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2,” *J. Biol. Chem.*, vol. 283, no. 22, pp. 14910–14914, 2008, doi: 10.1074/JBC.C800074200.
- [179]Y. Katoh and M. Katoh, “Hedgehog Target Genes: Mechanisms of Carcinogenesis Induced by Aberrant Hedgehog Signaling Activation,” *Curr. Mol. Med.*, vol. 9, no. 7, pp. 873–886, 2009, doi: 10.2174/156652409789105570.
- [180]M. Katoh, “Cardio-miRNAs and onco-miRNAs: circulating miRNA-based diagnostics for non-cancerous and cancerous diseases,” *Front. cell Dev. Biol.*, vol. 2, 2014, doi: 10.3389/FCELL.2014.00061.
- [181]J. Kim *et al.*, “Identification of many microRNAs that copurify with

- polyribosomes in mammalian neurons,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 101, no. 1, pp. 360–365, 2004, doi: 10.1073/PNAS.2333854100.
- [182] Y. Chen *et al.*, “Dysregulation of the miR-324-5p-CUEDC2 axis leads to macrophage dysfunction and is associated with colon cancer,” *Cell Rep.*, vol. 7, no. 6, pp. 1982–1993, 2014, doi: 10.1016/J.CELREP.2014.05.007.
- [183] H. S. Xu *et al.*, “MiR-324-5p inhibits proliferation of glioma by target regulation of GLI1,” *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, vol. 18, no. 6, pp. 828–832, 2014,
- [184] L. Cao *et al.*, “MiR-324-5p Suppresses Hepatocellular Carcinoma Cell Invasion by Counteracting ECM Degradation through Post-Transcriptionally Downregulating ETS1 and SP1,” *PLoS One*, vol. 10, no. 7, 2015, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0133074.
- [185] K. W. Tsai, W. T. Kuo, and S. Y. Jeng, “MicroRNA-324 plays an oncogenic role in bladder cancer cell growth and motility,” *Transl. Cancer Res.*, vol. 9, no. 2, pp. 707–716, 2020, doi: 10.21037/tcr.2019.12.01.
- [186] B. Tang *et al.*, “MicroRNA-324-5p regulates stemness, pathogenesis and sensitivity to bortezomib in multiple myeloma cells by targeting hedgehog signaling,” *Int. J. cancer*, vol. 142, no. 1, pp. 109–120, 2018, doi: 10.1002/IJC.31041.
- [187] H. Christina Fan, W. Gu, J. Wang, Y. J. Blumenfeld, Y. Y. El-Sayed, and S. R. Quake, “Non-invasive prenatal measurement of the fetal genome,” *Nature*, vol. 487, no. 7407, pp. 320–324, 2012, doi: 10.1038/NATURE11251.
- [188] N. Kosaka, H. Iguchi, and T. Ochiya, “Circulating microRNA in body fluid: A new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis,” *Cancer Sci.*, vol. 101, no. 10, pp. 2087–2092, 2010, doi: 10.1111/j.1349-7006.2010.01650.x.
- [189] J. C. Brase *et al.*, “Circulating miRNAs are correlated with tumor progression in prostate cancer,” *Int. J. cancer*, vol. 128, no. 3, pp. 608–616, 2011, doi: 10.1002/IJC.25376.
- [190] J. D. Arroyo *et al.*, “Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 108, no. 12, pp. 5003–5008, 2011, doi: 10.1073/PNAS.1019055108.

- [191] N. Yamamoto, T. Kuroiwa, A. Katakura, T. Shibahara, and C. Choudhury, "Loss of heterozygosity (LOH) on chromosomes 2q, 3p and 21q in Indian oral squamous cell carcinoma.," *Bull. Tokyo Dent. Coll.*, vol. 48, no. 3, pp. 109–117, 2007, doi: 10.2209/tdcpublish.48.109.
- [192] M. Trimeche, H. Braham, S. Ziadi, K. Amara, M. Hachana, and S. Korbi, "Investigation of allelic imbalances on chromosome 3p in nasopharyngeal carcinoma in Tunisia: High frequency of microsatellite instability in patients with early-onset of the disease," *Oral Oncol.*, vol. 44, no. 8, pp. 775–783, 2008, doi: 10.1016/j.oraloncology.2007.10.001.
- [193] P. Kadam and S. Bhalerao, "Sample size calculation.," *Int. J. Ayurveda Res.*, vol. 1, no. 1, pp. 55–57, Jan. 2010, doi: 10.4103/0974-7788.59946.
- [194] L. Wang *et al.*, "Molecular subtyping of metastatic renal cell carcinoma: implications for targeted therapy," *Mol. Cancer*, vol. 13, no. 1, p. 39, 2014, doi: 10.1186/1476-4598-13-39.
- [195] J. R. Gnarra *et al.*, "Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma," *Nat. Genet.*, vol. 7, no. 1, pp. 85–90, 1994, doi: 10.1038/ng0594-85.
- [196] T. Shuin *et al.*, "Frequent Somatic Mutations and Loss of Heterozygosity of the von Hippel-Lindau Tumor Suppressor Gene in Primary Human Renal Cell Carcinomas," *Cancer Res.*, vol. 54, no. 11, pp. 2852–2855, 1994, Accessed: Nov. 15, 2023. [Online]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8187067/>
- [197] K. Kondo *et al.*, "Comprehensive mutational analysis of the VHL gene in sporadic renal cell carcinoma: Relationship to clinicopathological parameters," *Genes Chromosom. Cancer*, vol. 34, no. 1, pp. 58–68, 2002, doi: 10.1002/gcc.10054.
- [198] M. Yao *et al.*, "VHL tumor suppressor gene alterations associated with good prognosis in sporadic clear-cell renal carcinoma.," *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 94, no. 20, pp. 1569–75, 2002, doi: 10.1093/jnci/94.20.1569.
- [199] D. Czeiger *et al.*, "Measurement of circulating cell-free DNA levels by a new simple fluorescent test in patients with primary colorectal cancer," *Am. J. Clin. Pathol.*, vol. 135, no. 2, pp. 264–270, 2011, doi: 10.1309/4RK2IHVKTTZV.

- [200] S. Hauser *et al.*, “Cell-free circulating DNA: Diagnostic value in patients with renal cell cancer,” *Anticancer Res.*, vol. 30, no. 7, pp. 2785–2789, J 2010,
- [201] M. De Martino, T. Klatte, A. Haitel, and M. Marberger, “Serum cell-free DNA in renal cell carcinoma: A diagnostic and prognostic marker,” *Cancer*, vol. 118, no. 1, pp. 82–90, 2012, doi: 10.1002/cncr.26254.
- [202] J. Ellinger *et al.*, “Cell-Free Circulating DNA: Diagnostic Value in Patients With Testicular Germ Cell Cancer,” *Anticancer Res.*, vol. 30, no. 7, pp. 2785–2789, 2009, doi: 10.1016/j.juro.2008.08.118.
- [203] P. Hadaczek *et al.*, “Absence or reduction of Fhit expression in most clear cell renal carcinomas,” *Cancer Res.*, vol. 58, no. 14, pp. 2946–51, Jul. 1998,
- [204] N. J. Farber, C. J. Kim, P. K. Modi, J. D. Hon, E. T. Sadimin, and E. A. Singer, “Renal cell carcinoma: the search for a reliable biomarker,” *Transl. Cancer Res.*, vol. 6, no. 3, p. 620, 2017, doi: 10.21037/TCR.2017.05.19.
- [205] V. L. Costa *et al.*, “Quantitative promoter methylation analysis of multiple cancer-related genes in renal cell tumors,” *BMC Cancer*, vol. 7, p. 133, 2007, doi: 10.1186/1471-2407-7-133.
- [206] S. Hauser, T. Zahalka, and G. Fechner, “Serum DNA Hypermethylation in Patients with Kidney Cancer: Results of a Prospective Study,” *Anticancer Res.*, vol. 33, pp. 4651–4656, 2013, [Online]. Available: <http://ar.iijournals.org/content/33/10/4651.short>
- [207] D. Hanahan and R. A. Weinberg, “Hallmarks of cancer: The next generation,” *Cell*, vol. 144, no. 5, pp. 646–674, 2011, doi: 10.1016/J.CELL.2011.02.013/ATTACHMENT/68024D79-3A9C-46C4-930B-640934F11E2E/MMC1.PDF.
- [208] B. Vogelstein, N. Papadopoulos, V. E. Velculescu, S. Zhou, L. A. Diaz, and K. W. Kinzler, “Cancer genome landscapes,” *Science*, vol. 339, no. 6127, pp. 1546–58, 2013, doi: 10.1126/science.1235122.
- [209] R. Kanwal and S. Gupta, “Epigenetic modifications in cancer,” *Clin. Genet.*, vol. 81, no. 4, p. 303, 2012, doi: 10.1111/J.1399-0004.2011.01809.X.
- [210] “Рак в Україні, 2019-2020. Захворюваність, смертність, показники

- діяльності онкологічної служби [Електронний ресурс] / Федоренко З.П., Гулак Л.О., Михайлович Ю.Й. та ін. // Бюлетень Національного канцер-реєстру № 22. - 2021. - Режим доступу до ресурсу,” р. http://www.ncru.inf.ua/publications/BULL_22/index.
- [211] A. C. Society, “American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2020,” *American Cancer Society*. pp. 1–52, 2020. [Online]. Available: <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@nho/documents/document/caff2007pwsecuredpdf.pdf>
- [212] R. L. Siegel, K. D. Miller, and A. Jemal, “Cancer statistics, 2020,” *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 70, no. 1, pp. 7–30, 2020, doi: 10.3322/CAAC.21590.
- [213] M. Utting, W. Werner, R. Dahse, J. Schubert, and K. Junker, “Microsatellite analysis of free tumor DNA in urine, serum, and plasma of patients: a minimally invasive method for the detection of bladder cancer,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 8, no. 1, pp. 35–40, 2002.
- [214] S. Holdenrieder *et al.*, “Clinical relevance of circulating nucleosomes in cancer,” *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1137, pp. 180–189, 2008, doi: 10.1196/annals.1448.012.
- [215] C. E. Condrat *et al.*, “miRNAs as Biomarkers in Disease: Latest Findings Regarding Their Role in Diagnosis and Prognosis,” *Cells*, vol. 9, no. 2, 2020, doi: 10.3390/CELLS9020276.
- [216] S. Filipów and Ł. Łaczmański, “Blood Circulating miRNAs as Cancer Biomarkers for Diagnosis and Surgical Treatment Response,” *Front. Genet.*, vol. 10, 2019, doi: 10.3389/FGENE.2019.00169.
- [217] Y. Mytsyk *et al.*, “Potential clinical applications of microRNAs as biomarkers for renal cell Carcinoma,” *Central European Journal of Urology*, vol. 71, no. 3. Polish Urological Association, pp. 295–303, 2018. doi: 10.5173/cej.2018.1618.
- [218] S. Ghafouri-Fard, Z. Shirvani-Farsani, W. Branicki, and M. Taheri, “MicroRNA Signature in Renal Cell Carcinoma,” *Front. Oncol.*, vol. 10, p. 596359, 2020, doi: 10.3389/FONC.2020.596359/BIBTEX.
- [219] E. Pachmayr, C. Treese, and U. Stein, “Underlying Mechanisms for Distant

- Metastasis – Molecular Biology,” *Visc. Med.*, vol. 33, no. 1, p. 11, 2017, doi: 10.1159/000454696.
- [220] J. Wang, J. Chen, and S. Sen, “microRNA as Biomarkers and Diagnostics,” *J. Cell. Physiol.*, vol. 231, no. 1, p. 25, 2016, doi: 10.1002/JCP.25056.
- [221] B. Gowrishankar *et al.*, “MicroRNA expression signatures of stage, grade, and progression in clear cell RCC,” *Cancer Biol. Ther.*, vol. 15, no. 3, pp. 329–341, 2014, doi: 10.4161/cbt.27314.
- [222] M. Karbiener, C. Neuhold, P. Opriessnig, A. Prokesch, J. G. Bogner-Strauss, and M. Scheideler, “MicroRNA-30c promotes human adipocyte differentiation and co-represses *PAI-1* and *ALK2*,” *RNA Biol.*, vol. 8, no. 5, pp. 850–860, 2011, doi: 10.4161/rna.8.5.16153.
- [223] S. Li *et al.*, “Deep sequencing reveals small RNA characterization of invasive micropapillary carcinomas of the breast,” *Breast Cancer Res. Treat.*, vol. 136, no. 1, pp. 77–87, 2012, doi: 10.1007/s10549-012-2166-6.
- [224] N. Presneau *et al.*, “MicroRNA profiling of peripheral nerve sheath tumours identifies miR-29c as a tumour suppressor gene involved in tumour progression,” *Br. J. Cancer*, vol. 108, no. 4, pp. 964–972, 2013, doi: 10.1038/bjc.2012.518.
- [225] F. G. Rodríguez-González *et al.*, “MicroRNA-30c expression level is an independent predictor of clinical benefit of endocrine therapy in advanced estrogen receptor positive breast cancer,” *Breast Cancer Res. Treat.*, vol. 127, no. 1, pp. 43–51, 2011, doi: 10.1007/s10549-010-0940-x.
- [226] L. K. Mathew *et al.*, “Restricted Expression of miR-30c-2-3p and miR-30a-3p in Clear Cell Renal Cell Carcinomas Enhances HIF2 Activity,” *Cancer Discov.*, vol. 4, no. 1, pp. 53–60, Jan. 2014, doi: 10.1158/2159-8290.CD-13-0291.
- [227] J. Huang *et al.*, “Hypoxia-induced downregulation of miR-30c promotes epithelial-mesenchymal transition in human renal cell carcinoma,” *Cancer Sci.*, vol. 104, no. 12, pp. 1609–1617, 2013, doi: 10.1111/cas.12291.
- [228] Z. Chen *et al.*, “The putative tumor suppressor microRNA-30a-5p modulates clear cell renal cell carcinoma aggressiveness through repression of ZEB2,” *Cell Death Dis.*, vol. 8, no. 6, p. e2859, 2017, doi: 10.1038/cddis.2017.252.

- [229]C. Wang *et al.*, “MicroRNA-30a-5p Inhibits the Growth of Renal Cell Carcinoma by Modulating GRP78 Expression,” *Cell. Physiol. Biochem.*, vol. 43, no. 6, pp. 2405–2419, 2017, doi: 10.1159/000484394.
- [230]M. Chakrabarti, N. L. Banik, and S. K. Ray, “miR-138 overexpression is more powerful than hTERT knockdown to potentiate apigenin for apoptosis in neuroblastoma in vitro and in vivo,” *Exp. Cell Res.*, vol. 319, no. 10, p. 1575, 2013, doi: 10.1016/J.YEXCR.2013.02.025.
- [231]K. V. Onyshchenko *et al.*, “Expression of micro-RNA hsa-mir-30c-5p and hsa-mir-138-1 in renal cell carcinoma,” *Exp. Oncol.*, vol. 42, no. 2, pp. 115–119, 2020, doi: 10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-42-no-2.14632.
- [232]C. Ma, J. Qin, J. Zhang, X. Wang, D. Wu, and X. Li, “Construction and analysis of circular RNA molecular regulatory networks in clear cell renal cell carcinoma,” *Mol. Med. Rep.*, vol. 21, no. 1, p. 141, 2020, doi: 10.3892/MMR.2019.10811.
- [233]Y. Li *et al.*, “MicroRNA-200b is downregulated and suppresses metastasis by targeting LAMA4 in renal cell carcinoma,” *EBioMedicine*, vol. 44, pp. 439–451, 2019, doi: 10.1016/j.ebiom.2019.05.041.
- [234]M. H. Lin *et al.*, “Comprehensive identification of microRNA arm selection preference in lung cancer: miR-324-5p and -3p serve oncogenic functions in lung cancer,” *Oncol. Lett.*, vol. 15, no. 6, pp. 9818–9826, 2018, doi: 10.3892/OL.2018.8557.
- [235]C. Gu, M. Zhang, W. Sun, and C. Dong, “Upregulation of miR-324-5p Inhibits Proliferation and Invasion of Colorectal Cancer Cells by Targeting ELAVL1,” *Oncol. Res.*, vol. 27, no. 5, pp. 515–524, 2019, doi: 10.3727/096504018X15166183598572.
- [236]Y. Wan *et al.*, “miR-324-5p Contributes to Cell Proliferation and Apoptosis in Pancreatic Cancer by Targeting KLF3,” *Mol. Ther. oncolytics*, vol. 18, pp. 432–442, Sep. 2020, doi: 10.1016/j.omto.2020.07.011.
- [237]T. Zhi *et al.*, “EZH2 alteration driven by microRNA-524-5p and microRNA-324-5p promotes cell proliferation and temozolomide resistance in glioma,”

- Oncotarget*, vol. 8, no. 56, pp. 96239–96248, 2017, doi: 10.18632/ONCOTARGET.21996.
- [238] L. N. Sun *et al.*, “Dicer suppresses cytoskeleton remodeling and tumorigenesis of colorectal epithelium by miR-324-5p mediated suppression of HMGXB3 and WASF-2,” *Oncotarget*, vol. 8, no. 34, pp. 55776–55789, 2017, doi: 10.18632/ONCOTARGET.18218.
- [239] Y. Su *et al.*, “MicroRNA-181a-5p and microRNA-181a-3p cooperatively restrict vascular inflammation and atherosclerosis,” *Cell Death Dis.*, vol. 10, no. 5, 2019, doi: 10.1038/S41419-019-1599-9.
- [240] M. Yang, X. Zhai, T. Ge, C. Yang, and G. Lou, “miR-181a-5p Promotes Proliferation and Invasion and Inhibits Apoptosis of Cervical Cancer Cells via Regulating Inositol Polyphosphate-5-Phosphatase A (INPP5A),” *Oncol. Res.*, vol. 26, no. 5, pp. 703–712, 2018, doi: 10.3727/096504017X14982569377511.
- [241] H. Shen *et al.*, “miR-181a-5p is downregulated and inhibits proliferation and the cell cycle in prostate cancer,” *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, vol. 11, no. 8, pp. 3969–3976, 2018,
- [242] M. Ouyang *et al.*, “MicroRNA profiling implies new markers of chemoresistance of triple-negative breast cancer,” *PLoS One*, vol. 9, no. 5, 2014, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0096228.
- [243] Y. Liu, T. Cheng, Y. Du, X. Hu, and W. Xia, “LncRNA LUCAT1/miR-181a-5p axis promotes proliferation and invasion of breast cancer via targeting KLF6 and KLF15,” *BMC Mol. cell Biol.*, vol. 21, no. 1, 2020, doi: 10.1186/S12860-020-00310-0.
- [244] E. Alexandrova *et al.*, “Small Non-Coding RNA Profiling Identifies miR-181a-5p as a Mediator of Estrogen Receptor Beta-Induced Inhibition of Cholesterol Biosynthesis in Triple-Negative Breast Cancer,” *Cells*, vol. 9, no. 4, 2020, doi: 10.3390/CELLS9040874.
- [245] G. V. Dubrovskaya, K. V. Onyshchenko, L. V. Pereta, V. M. Grigorenko, and I. Y. Skrypkinskaya, “Diagnostic and prognostic significance of the rassf1 gene in patients with renal cell carcinoma,” *Urology*, vol. 87, no. 22, pp. 24–28, 2018.

- [246] K. Onyshchenko *et al.*, “Inactivation of the CDKN2A oncosuppressor gene in renal and bladder malignancies,” *In Annotated collection of projects of the joint contest SFFR-BRFFD - Academiperiodica*, pp. 79–83, 2017.
- [247] K. Kondo *et al.*, “Comprehensive mutational analysis of the VHL gene in sporadic renal cell carcinoma: Relationship to clinicopathological parameters,” *Genes Chromosom. Cancer*, vol. 34, no. 1, pp. 58–68, 2002, doi: 10.1002/gcc.10054.
- [248] K. V. Onyshchenko, V. M. Grygorenko, L. V. Pereta, Y. R. Serbai, T. V. Voitsitskyi, and I. Y. Skrypkinska, “Genetic and epigenetic alterations of VHL gene in clear cell renal cell carcinoma,” *Factors Exp. Evol. Org.*, vol. 24, pp. 221–226, 2019.
- [249] B. Rahat, T. Ali, D. Sapehia, A. Mahajan, and J. Kaur, “Circulating Cell-Free Nucleic Acids as Epigenetic Biomarkers in Precision Medicine,” *Front. Genet.*, vol. 11, p. 538326, 2020, doi: 10.3389/FGENE.2020.00844/BIBTEX.
- [250] E. Heitzer, P. Ulz, and J. B. Geigl, “Circulating Tumor DNA as a Liquid Biopsy for Cancer,” *Clin. Chem.*, vol. 61, no. 1, pp. 112–23, 2014, doi: 10.1373/clinchem.2014.222679.
- [251] C. Roth *et al.*, “Apoptosis-related deregulation of proteolytic activities and high serum levels of circulating nucleosomes and DNA in blood correlate with breast cancer progression,” *BMC Cancer*, vol. 11, no. 1, p. 4, 2011, doi: 10.1186/1471-2407-11-4.
- [252] A. Kienel, D. Porres, A. Heidenreich, and D. Pfister, “cfDNA as a Prognostic Marker of Response to Taxane Based Chemotherapy in Patients with Prostate Cancer,” *J. Urol.*, vol. 194, no. 4, pp. 966–71, 2015, doi: 10.1016/j.juro.2015.04.055.
- [253] Z. Chen, A. Fadiel, F. Naftolin, K. D. Eichenbaum, and Y. Xia, “Circulation DNA: Biological implications for cancer metastasis and immunology,” *Med. Hypotheses*, vol. 65, no. 5, pp. 956–961, 2005, doi: 10.1016/j.mehy.2005.04.042.
- [254] G. Feng, X. Ye, F. Fang, C. Pu, H. Huang, and G. Li, “Quantification of Plasma Cell-Free DNA1 in Predicting Therapeutic Efficacy of Sorafenib on Metastatic

- Clear Cell Renal Cell Carcinoma,” *Dis. Markers*, vol. 34, no. 2, pp. 105–111, doi: 10.3233/DMA-120950.
- [255] A. A. Kamat *et al.*, “Circulating cell-free DNA: a novel biomarker for response to therapy in ovarian carcinoma,” *Cancer Biol. Ther.*, vol. 5, no. 10, pp. 1369–74, 2006.
- [256] C. Cheng, M. Omura-Minamisawa, Y. Kang, T. Hara, I. Koike, and T. Inoue, “Quantification of circulating cell-free DNA in the plasma of cancer patients during radiation therapy,” *Cancer Sci.*, vol. 100, no. 2, pp. 303–9, Feb. 2009, doi: 10.1111/j.1349-7006.2008.01021.x.
- [257] A. R. Thierry *et al.*, “Origin and quantification of circulating DNA in mice with human colorectal cancer xenografts,” *Nucleic Acids Res*, vol. 38, no. 18, pp. 6159–6175, Oct. 2010, doi: 10.1093/nar/gkq421.
- [258] K. Wang *et al.*, “Analysis of hsa-miR-30a-5p Expression in Human Gliomas,” *Pathol. Oncol. Res.*, vol. 19, no. 3, pp. 405–411, 2013, doi: 10.1007/s12253-012-9593-x.
- [259] H. Lu *et al.*, “Diagnostic and prognostic potential of circulating cell-free genomic and mitochondrial DNA fragments in clear cell renal cell carcinoma patients,” *Clin. Chim. Acta*, vol. 452, pp. 109–119, 2016, doi: 10.1016/j.cca.2015.11.009.
- [260] V. V Levenson, “DNA methylation as a universal biomarker,” *Expert Rev. Mol. Diagn.*, vol. 10, no. 4, pp. 481–8, 2010, doi: 10.1586/erm.10.17.
- [261] M. De Martino, T. Klatte, A. Haitel, and M. Marberger, “Serum cell-free DNA in renal cell carcinoma: A diagnostic and prognostic marker,” *Cancer*, 2012, doi: 10.1002/cncr.26254.
- [262] B. Ralla, C. Stephan, S. Meller, D. Dietrich, G. Kristiansen, and K. Jung, “Nucleic acid-based biomarkers in body fluids of patients with urologic malignancies,” *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, vol. 51, no. 4. Crit Rev Clin Lab Sci, pp. 200–231, 2014. doi: 10.3109/10408363.2014.914888.
- [263] A. M. Dworkin, T. H.-M. Huang, and A. E. Toland, “Epigenetic alterations in the breast: Implications for breast cancer detection, prognosis and treatment,”

- Semin. Cancer Biol.*, vol. 19, no. 3, pp. 165–71, 2009, doi: 10.1016/j.semcancer.2009.02.007.
- [264] K. Warton and G. Samimi, “Methylation of cell-free circulating DNA in the diagnosis of cancer,” *Front. Mol. Biosci.*, vol. 2, p. 13, 2015, doi: 10.3389/fmolb.2015.00013.
- [265] D. Raos, M. Ulamec, A. Katusic Bojanac, F. Bulic-Jakus, D. Jezek, and N. Sincic, “Epigenetically inactivated RASSF1A as a tumor biomarker,” *Bosn. J. Basic Med. Sci.*, 2020, doi: 10.17305/bjbms.2020.5219.
- [266] M. Spugnardi, S. Tommasi, R. Dammann, G. P. Pfeifer, and D. S. B. Hoon, “Epigenetic Inactivation of RAS Association Domain Family Protein 1 (RASSF1A) in Malignant Cutaneous Melanoma Epigenetic Inactivation of RAS Association Domain Family Protein 1 (RASSF1A) in Malignant Cutaneous Melanoma 1,” *CANCER Res.*, vol. 1, pp. 1639–1643, 2003,
- [267] J. Ellinger *et al.*, “DNA hypermethylation in papillary renal cell carcinoma,” *BJU Int.*, vol. 107, no. 4, pp. 664–9, Feb. 2011, doi: 10.1111/j.1464-410X.2010.09468.x.
- [268] V. V. Gordiyuk *et al.*, “Identification of chromosome 3 epigenetic and genetic abnormalities and gene expression changes in ovarian cancer,” *Biopolym. Cell*, vol. 24, no. 4, pp. 323–332, 2008, doi: 10.7124/bc.0007B0.
- [269] G. V. Gerashchenko *et al.*, “Screening of epigenetic and genetic disturbances of human chromosome 3 genes in colorectal cancer,” *Ukr Biokhim Zh*, vol. 81, no. 4, pp. 81–87, 2009,
- [270] S. Demokan, A. Y. Chuang, K. M. Pattani, D. Sidransky, W. Koch, and J. A. Califano, “Validation of nucleolar protein 4 as a novel methylated tumor suppressor gene in head and neck cancer,” *Oncol. Rep.*, vol. 31, no. 2, pp. 1014–20, 2014, doi: 10.3892/or.2013.2927.
- [271] N. Dizman, E. J. Philip, and S. K. Pal, “Genomic profiling in renal cell carcinoma,” *Nat. Rev. Nephrol.*, vol. 16, no. 8, pp. 435–451, 2020, doi: 10.1038/S41581-020-0301-X.

ДОДАТОК А

ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ
ДИСЕРТАЦІЇ

1. **Онищенко К.**, Циба Л., Ніколаєнко О., Мордерер Д., Скрипкіна І. Визначення концентрації позаклітинної ДНК та ген-специфічного метилування у плазмі крові пацієнтів із раком нирок. IX Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів "Молодь і поступ біології", Львів, Україна, 2013, 378-379.
2. **Онищенко К.**, Мордерер Д. Визначення метилування генів-супресорів пухлини *APC* та *FHIT* на позаклітинній ДНК в плазмі крові пацієнтів з раком нирок. VIII Международная конференция молодых ученых, 2013, Харків, Україна, с.43-44
3. Кашпарова О. **Онищенко К.**, Банас О., Перета Л. Визначення статусу метилування гена *LRRC3B* та *VHL* на позаклітинній ДНК та ДНК пухлин хворих на рак нирок.. III Міжнародна наукова конференція студентів, аспірантів та молодих учених, Донецьк, 2014, с.279
4. **Онищенко К.**, Мордерер Д. Визначення метилування генів-супресорів пухлини *LRRC3B* та *VHL* на позаклітинній ДНК в плазмі крові пацієнтів з раком нирок. III Міжнародна наукова конференція студентів, аспірантів та молодих учених, Донецьк, 2014, с.282-283
5. **Онищенко К.** Кашпарова О. Перета Л., Банас О. Григоренко В. Скрипкіна І.Я. Визначення і порівняння статусу метилування генів *LRRC3B* та *APC* на позаклітинній ДНК плазми крові та ДНК пухлин у пацієнтів зі світлоклітинним раком нирок. X Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів "Молодь і поступ біології", Львів, Україна., 2014, с.216-217.
6. **Onyshchenko K.**, Kashparova A., Korniyushin V., Banas O., Pereta L. Comparison of *LRRC3B* and *RASFI* methylation genes of patients with renal cell

carcinoma. XII Міжнародна наукова конференція студентів та молодих науковців «Шевченківська весна 2014: Біологічні науки. Київ, 2014. с.50-51

7. Скрипкіна І.Я., **Онищенко К.В.**, Кашпарова О.М., Григоренко В.М., Перета Л.В., Онищук А.П., Вікарчук М.В., Банас О.О. Визначення статусу метилування генів *LRRC3B*, *RASSF1A*, *APC* на позаклітинній ДНК та ДНК пухлини хворих із нирково-клітинним раком. Здоровье мужчины, 2015, 53 (2), 166-170.

8. Кашпарова О., **Онищенко К.** Скрипкіна І.Я. Метилування гена *RASSF1* на позаклітинній ДНК плазми крові та геномній ДНК пухлин у пацієнтів зі світлоклітинним раком нирок. XI міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології», 2015, Львів, Україна, с, 405-406

9. **Онищенко К.** Кашпарова О., Перета Л., Банас О., Григоренко В., Скрипкіна І.Я. Гіперметилування гена *RARB2* на позаклітинній ДНК у пацієнтів зі світлоклітинним раком нирок. XI міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології», 2015, Львів, Україна, с, 410-411

10. **Onyshchenko K.V.**, Kashparova O.V., Dubrovskaya H., Skrypkinia I.Ya. Microsatellite alterations of *RASSF1* and *VHL* and DNA integrity in renal cell carcinoma. XIV International Scientific Conference of Students, PhD Students; Young Scientists; Shevchenkovskaya Vesna: Biology. Ukraine, P.17-18.

11. Kashparova O.V., **Onyshchenko K.V.**, Rynditch A.V., Gryhorenko V.M., Pereta L.V., Skrypkinia I. Ya.. Gene-methylation of DNA in patients with renal cell carcinoma. X Parnas Conference. Poland, Wrocław, 2016, P.52.

12. **Onyshchenko K.V.**, Kashparova O.V., Rynditch A.V., Gryhorenko V.M., Pereta L.V., Skrypkinia I. Ya. DNA methylation of *GPX3* and loss of heterozygosity of *RASSF1* and *VHL* in renal cell carcinoma. X Parnas Conference. Poland, Wrocław, 2016, P.53.

13. Skrypkinia I., Tsyba L., **Onyshchenko K.**, Morderer D., Kashparova O., Nikolaienko O., Panasenko G., Vozianov S., Romanenko A., Rynditch A.V. Concentration and Methylation of Cell-Free DNA from Blood Plasma as Diagnostic

Markers of Renal Cancer. Disease markers 08/2016; 2016(14). DOI:10.1155/2016/3693096.

14. **Онищенко К. В.**, Кашпарова О. В. Ідентифікація молекулярних маркерів для ранньої діагностики пухлин нирки. 11 th International Young Scientists' Biology Conference "From A Molecule Up To The Biosphere". Ukraine, Kharkiv, 2016. 31-32

15. Дубровська Г. В., **Онищенко К. В.** Втрата гетерозиготності локусу гена *VHL* у карциномах нирки. 11 th International Young Scientists' Biology Conference "From A Molecule Up To The Biosphere". Ukraine, Kharkiv, 2016. 39-40

16. Щербик К., **Онищенко К.**, Дубровська А., Перета Л., Банас О., Григоренко В., Скрипкіна І. Визначення та порівняння статусу метилування генів *GPX3*, *RUNX3* та *TIMP3* на позаклітинній ДНК плазми крові та днк пухлин у пацієнтів зі світлоклітинним раком нирки. XI міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології», 2017, Львів, Україна, 111-112.

17. Дубровська Г., **Онищенко К.**, Щербик К., Скрипкіна І. Метилування гену *RUNX3* під час розвитку світло-клітинного раку нирки. XV International Scientific Conference of Students, PhD Students; Young Scientists; Shevchenkivska Vesna: Biology. Ukraine, Kyiv, 2017. P.240-241

18. Дубровська Г.В., **Онищенко К.В.**, Перета Л.В., Кашпарова О.В., Григоренко В.М., Скрипкіна І.Я. Мікросателітні зміни та метилування гена *RASSF1* у хворих на нирково-клітинний рак. Фактори експериментальної еволюції організмів», 2018, 23, с.192-196. DOI: <https://doi.org/10.7124/FEEO.v23.1013>.

19. К. Shcherbyk, К. Onyshchenko, Skrypkins I.L Methylation of *GPX3* and *TIMP3* genes of DNA of tumors in patients with renal cell carcinoma. Joint Meeting of the 25th Annual Conference "Modern Aspects of Biochemistry and Biotechnology"& 2nd Conference for Young Scientists CYS-2017, Kyiv, Ukraine, 2017, P.82

20. **Онищенко К.В.**, Дубровська Г.В., Смаль М.П., Никитченко Н.В., Григоренко В.М., Вікарчук М.В., Ролевич А.И., Гончарова Р.И., Скрипкіна І.Я. Інактивація гена-онкосупресора *CDKN2A* у злоякісних новоутвореннях нирки та

сечового міхура. Анотований збірник проектів спільного конкурсу ДФФД-БРФФД - Академперіодика, 2018, с. 79-83.

21. Войціцький Т., Дубровська Г., **Онищенко К.**, Перета Л., Григоренко В., Скрипкіна І. Метилування гена *PCDH8* під час розвитку світло-клітинного раку нирки. XVI Міжнародна наукова конференція студентів та молодих вчених «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки/BioScience Advances», Збірник тез, 2018, с.196-198.

22. Dubrovskа H., **Onyshchenko K.**, Kashparova O., Gryhorenko V., Pereta L., Skrypkins І. Microsatellite alterations and DNA methylation of *RASSF1* in renal cell carcinoma. 4th International Conference of Cell Biology, Cracow, Poland, 2018, p. 421.

23. **Onyshchenko K.**, Kashparova O., Dubrovskа H., Pereta L., Gryhorenko V., Skrypkins І. Detection of aberrant methylation and loss of heterozygosity of cancersuppressor genes in cfDNA as markers of renal cell carcinoma. XII annual Conference of Young Scientists Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine, Biopolymers and Cell. 2018. Vol. 34. N 2. P.162.

24. Дубровська Г.В., **Онищенко К.В.**, Перета Л.В., Григоренко В.М., Скрипкіна І.Я. Діагностичне та прогностичне значення гена *rassf1* у хворих на нирково-клітинний рак. Урологія, 2018 (87), 22 (4), с 24-28, DOI: 10.26641/2307-5279.22.4.2018.152471.

25. **Onyshchenko K.**, Kashparova O., Dubrovskа H., Pereta L., Gryhorenko V., Skrypkins І. Genetic and epigenetic changes on plasma cell-free dna as markers of renal cell carcinoma. XI Parnas Conference – Young Scientists Forum, 2018, Ukr Biochem J, Vol.18, Special Issue, P.85.

26. Войціцький Т. В., Дашенко М. С., **Онищенко К. В.** , Григоренко В.М., Перета Л.В., Скрипкіна І. Я. Визначення рівня експресії мікро РНК *miR-30c-5p* у плазмі крові як діагностичного біомаркеру світлоклітинного раку нирки. науково-практична конференція молодих вчених «Фундаментальна медицина: інтегральні підходи до терапії хворих з онкопатологією», м.Київ Онкологія, 2019, Т.21, №1, с.60

27. T.V. Voitsitskyi, M. S. Dashchenko, **K. V. Onyshchenko**, V. M. Grygorenko, L. V. Pereta, A.P. Onyshchuk, I. Ya. Skrypkina. miR-138-1 expression in tumor and patient blood plasma as diagnostic biomarker of clear cell renal cell carcinoma. XVI Міжнародна наукова конференцій студентів, молодих вчених та фахівців "Актуальні питання сучасної медицини", Збірка тез, Харків, 2019, с.377
28. **K. Onyshchenko**, T. V. Voitsitskyi, Grygorenko V. M., L. V. Pereta, I. Ya. Skrypkina. HSA-MIR-30A-5P and HSA-MIR-200C-3P expression in tumor and patient blood plasma as diagnostic biomarker of clear cell renal cell carcinoma. XIII IMBG All-Ukrainian Conference of Young Scientists. Biopolymers and Cell. 2019. Vol. 35. N 5, P.402
29. **Онищенко К.В.**, Григоренко В.М., Перета Л.В., Сербай Ю.Р., Войціцький Т. В., Скрипкіна І.Я. Генетичні та епігенетичні зміни гена *VHL* у пухлинах світлоклітинного раку нирки. Фактори експериментальної еволюції організмів, 2019, 24, С. 221-226. DOI: <https://doi.org/10.7124/FEEEO.v24.1105>.
30. Скрипкіна І.Я., **Онищенко К.В.**, Герасимчук Д.О., Анопрієнко О.В., Арешков П.О. Аналіз експресії міРНК hsa-miR-30a-5p та hsa-miR-200c-3p у пухлинах головного мозку. Фактори експериментальної еволюції організмів: 2019. – Т.24. – С. 227-232. DOI: <https://doi.org/10.7124/FEEEO.v24.1106>
31. Григоренко В.М., Скрипкіна І.Я., Перета Л.В., **Онищенко К.В.**, Кашпарова О.В. Патент на корисну модель № 134876 «Спосіб ранньої діагностики раку нирки». Зареєстровано в Державному реєстрі патентів України на корисну модель 10.06.2019 р
32. **Onyshchenko K.V.**, Voitsitskyi T.V., Grygorenko V.M., Saidakova N.O., Pereta L.V., Onyschuk A.P., Skrypkina I.Ya. Expression of micro-RNA hsa-miR-30c-5p and hsa-miR-138-1 in renal cell carcinoma. Exp Oncol. 2020;42(2):115-119. DOI: 10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-42-no-2.14632.

ДОДАТОК Б

Таблиця Б.1

Порівняльний аналіз новітніх систем лабораторної діагностики онкологічних захворювань

Тест-система	Виробник	Метод	Тип раку що детектується	Матеріал для аналізу	Час аналізу	Сайт компанії
1	2	3	4	5	6	7
Confirm MDx for Prostate Cancer	MDxHealth (США)	епігенетичні дослідження	простата (легені - в розробці)	матеріал біопсії (перевірка помилково негативних біопсій)	7-10 днів	http://mdxhealth.com/confirmmdx-prostate-cancer
CytoChip Cancer	BlueGnome Limited Illumina (Великобританія)	порівняльна геномна гібридизація	детекція 670 різних генів (her- 2/neu, мус, egfr, rb1, pten, brca1, bcr-abl, tmprss2, mll) використовується переважно для визначення лейкозів і затримок розвитку у дітей	кров	12 год.	http://www.illumina.com/products/cytochip-cancer.html
CytoChip Cancer SNP		порівняльна геномна гібридизація з детекцією втрати гетерозиготності				

Продовження таблиці Б.1

1	2	3	4	5	6	7
DecisionDx - Thymoma	Castle Biosciences (США)	використання метил-зв'язуючих білків для детекції метилірованої ДНК (тести використовуються як для первинної діагностики, так і для контролю ремісії захворювання)	вилочкова залоза	зразок тканини	2-3 тижні	http://thymiccancer.com/
DecisionDx - EC			стравохід			http://www.myesophagealcancer.com/
DecisionDx - Melanoma			меланома шкіри			http://skinmelanoma.com/
DecisionDx - UM			меланома сітківки ока			http://www.myuvealmelanoma.com/
Epi proColon	Epigenomics AG (Німеччина)	визначення статусу метилювання гена супресорів	товстий кишечник	кров	5 днів	http://www.epipr colon.com/en/patients.html
Epi proLung			легені	бронхіальна рідина	5-7 годин	http://www.epiprolung.com/en/
MethylMeter	RiboMed (США)	використання метил-зв'язуючих білків для детекції метилірованої ДНК	молочна залоза, меланома, товстий кишечник (легені - в розробці)	свіжозаморожена тканина, кров, сеча, слина	від 2-х годин	http://ribomed.com/products/methylmeter/
Onko-Sure	Radiant Pharmaceuticals Corporation (США)	виявлення слідів фібрину і продуктів його розпаду	печінка, шлунок, легені, молочна залоза	кров	3-5 днів	http://www.radiantpharmabd.com/index.php

ДОДАТОК В

Таблиця В.1

Розподіл пацієнтів з раком нирки за віком та стадією розвитку хвороби

№	Морфологія	вік	стать	TNM	Стадія	ступінь диференціювання за Фурман	Примітка
1	2	3	4	5	6	7	8
1	Ангіоміоліптома	35	1				
2	Онкоцитوما нирки	53	ч	-	-		
3	RCC	51	ч	pT2N0M0	II	3	
4	RCC	56	ч	pT1aN0M0	I	1	
5	RCC	29	ж	pT1bN0M0	I	2	
6	RCC	51	ч	pT1bN0M0	I	2	
7	RCC	50	ч	pT1aN0M0	I	2	
8	RCC	57	ч	pT3aN1M0	IV	3	
9	RCC	56	ж	pT1aN0M0	I	1	
10	RCC	63	ч	pT1bN0M0	I	2	
11	RCC	63	ч	pT1bN0M1	IV	2	
12	RCC	62	ч	pT3aN1M0	I	3	
3	RCC	54	ч	pT1N0M0	I	3	
14	RCC	58	ж	pT1bN0M0	I	3	РЕЦИДИВ, помер (прогресув-я онкозахворювання)
15	RCC	57	ж	pT1bN0M0	I	4	помер (прогресув-я онкозахворювання)
16	RCC	64	ч	pT2bN0M0	II	1	

Продовження таблиці В.1

1	2	3	4	5	6	7	8
17	RCC	67	ч	pT2bN0M0	II	2	
18	RCC	60	ж	pT1bN0M0	I	1	
19	RCC	45	ч	pT2bN0M0	II	1	помер від інших причин
20	RCC	27	ч	pT1aN0M0	I	1	
21	Папілярний	43	ч	pT1aN0M0	I	1	
22	НKK конвенційний рак	62	ж	pT2N0M0	II	3	
23	Кістозна гамартрома нирки	67	ч				помер (прогресув-я онкозахворювання)
24	Онкоцитома	73	ж				
25	RCC	61	ж	pT1aN0M0	I	1	
26	Змішана (папілярна і хромофільна) пухлина нирки з ділянками світлоклітинного НPK	65	ч	pT3aN0M0 (тромб в порожнисті й вені)	III	3	РЕЦИДИВ, мтс в легені
27	RCC	53	ж	pT1aN0M0	I	1	
28	RCC	40	ч	pT1aN0M0	I	1	
29	RCC	51	ч	pT1bN0M0	I	1	
30	RCC	61	ч	pT1b N ₀ M ₀	I	1	
31	Папілярний	51	ч	pT2N ₀ M ₀	II	2	
32	Низькодиф.фібросаркома із явищами міксоматозу	62	ж	Саркома			
33	RCC	60	ч	pT2N ₀ M ₀	II	2	помер (прогресув-я онкозахворювання)
34	RCC	63	ч	pT _{1a} N ₀ M ₀	I	1	

Продовження таблиці В.1

1	2	3	4	5	6	7	8
35	RCC	57	ч	pT1a N0 M0	I	2	
36	RCC	56	ж	pT3aN1 M0	IV	3	помер (прогресув-я онкозахворювання)
37	RCC	34	ч	pT1в N0M0	I	2	
38	Онкоцитома	51	ч	Онкоцитома	-		
39	RCC	64	ч	pT2N0M0	II	3	помер від інших причин
40	RCC	57	ж	pT1aN0M0	I	1	
41	Пухлина тубулярної будови	77	ч	pT2N0M0	II	3	
42	Онкоцитома	58	ч	Онкоцитома	-		
43	RCC	71	ч	pT1вNxM1	IV	3	помер (прогресув-я онкозахворювання)
44	RCC	56	ж	pT1в N0 M0	I	2	
45	RCC	66	ч	pT1вN0 M0	I	1	
46	RCC	59	ж	pT1aN0M1	IV	1	РЕЦИДИВ, помер (прогресув-я онкозахворювання)
47	Папілярний хромофільний НКК	60	ч	pT3a N0M0	III	2	РЕЦИДИВ, помер від інших причин
48	RCC	38	ж	pT1aN0M0	I	1	РЕЦИДИВ
49	RCC	43	ч	pT2N0M0	II	2	
50	RCC	57	ч	pT1aN0M0	I	1	
51	RCC	54	ч	pT2N0M0	II	1	
52	RCC	59	ч	pT1вN0M0	I	2	

Продовження таблиці В.1

	2	3	4	5	6	7	8
53	RCC	57	ч	pT1bN0M0	I	2	
54	RCC	63	ч	pT2N0M0	II	2	
55	RCC	60	ч	pT2N ₀ M ₀	II	2	
56	RCC	29	ч	pT1N0M0	I	1	
57	RCC	41	ч	pT2N0 M0	II	3	помер (прогресув-я онкозахворювання)
58	RCC	55	ж	pT1N0M0	I	2	
59	RCC	62	ч	pT2N1M0	III	2	
60	RCC	57	ж	pT3a N0 M0	III	2	
61	RCC	50	ж	pT3bN0M1	IV	2	
62	RCC	30	ж	pT1aN0M0	I	1	
63	Онкоцитوما	43	ж	Онкоцитوما			
64	RCC	59	ж	pT1aN0M0	I	1	
65	RCC	78	ж	pT2 N ₀ M ₀	II	3	
66	Онкоцитوما	58	ч	Онкоцитوما			
67	Онкоцитوما	48	ч	Онкоцитوما			
68	RCC	59	ч	pT1b N ₀ M ₀	I	2	
69	RCC	58	ч	pT1aN0M0	I	1	
70	RCC	43	ч	pT1aN0M0	I	1	
71	Папілярний	44	ч	pT1bN0M0	I	1	помер (прогресув-я онкозахворювання)
72	RCC	55	ж	pT2aN0M0	II	2	
73	RCC	54	ж	pT1aN0M0	I	1	
74	RCC	63	ч	pT1bN0M0		2	
75	RCC	54	ж	pT2aN0M0	II	1	

Продовження таблиці В.1

1	2	3	4	5	6	7	8
76	Ангіоміоліпома	61	ж	-	-		
77	RCC	66	ж	pT1aN0M0	I	1	
78	RCC	39	ж	pT1aN0M0	I	2	
79	RCC	57	ч	pT1aN0M0	I	2	
80	Стінка кісти після RCC	60	ж	pT1aN0M0	I		
81	RCC	51	ч	pT1aN0M0	I	1	
82	RCC	60	ч	pT1aN0M0	I	1	
83	Хромофобний НКК	57	ч	pT1aN0M0	I		
84	RCC	38	ч	pT1bN0M0	I	1	
85	RCC	46	ч	pT1bN0M0	I	1	
86	Онкоцитома	63	ч	-	-		
87	RCC	68	ч	pT1aN0M0	I	1	
88	Анігіоміоліпома	37	ж	-	-		
89	RCC	52	ж	pT1aN0M0	I	1	
90	RCC	69	ч	pT1aN0M0	I	2	
91	RCC	60	ч	pT1aN0M0	I	1	
92	RCC	69	ж	pT2aN0M0	II	3	
93	RCC	64	ж	pT1aN0M0	I	1	
94	RCC	69	ч	pT1aN0M0	I	1	
95	RCC	66	ч	pT2aN0M0	II	2	
96	Папілярний	47	ч	pT1aN0M0	I	1	
97	RCC	77	ч	pT3aN0M0	III	2	
98	RCC	55	ж	pT1bN0M0	I	3	
99	Папілярний	60	ж	pT2bN0M0	II	не вказано	

Продовження таблиці В.1

1	2	3	4	5	6	7	8
100	RCC	43	ч	pT1aN0M0	I	2	
101	RCC	78	ч	pT1aN0M0	I	1	
103	RCC	61	ж	pT1bN0M0	I	4	
104	RCC	62	ч	pT1aN0M0	I	3	
105	RCC	25	ч	pT1aN0M0	I	1	
106	RCC	62	ж	pT2aN0M0	II	2	
107	Лейоміофіброма	44	ч	-	-		
108	RCC	66	ч	pT1bN0M0	I	2	
109	RCC	62	ж	pT1aN0M0	I	2	
110	Ангіолейоміофіброма	50	ч	-	-		
111	Папілярний	53	ч	pT1bN0M0	I		
112	RCC	66	ч	pT1bN0M0	I	1	
113	RCC	33	ч	pT1aN0M0	I	1	
114	RCC	58	ч	pT1aN0M0	I	1	
115	RCC	71	ч	pT1aN0M0	I	1	
116	RCC	66	ч	pT1aN0M0	I	1	
117	Онкоцитوما	76	ч	-	-		
118	RCC	65	ж	-	-		
119	RCC	34	ж	pT1aN0M0	I	2	
120	RCC	48	ж	pT1aN0M0	I	2	
121	RCC	59	ж	pT1aN0M0	I	1	
122	RCC	39	ж	pT2aN0M0	II	1	

Таблица Г.1

Продовження таблиці Г.1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
30	0	0	1	0	NA	0	0	0	0	0	0	1	1,254
31	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	NA	0	1,240
32	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1,301
33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,097
34	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0,916
35	1	NA	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1,058
36	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0,727
37	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1,132
38	1	NA	0	0	0	1	NA	1	1	0	0	0	0,734
39	0	0	0	NA	1	0	0	0	0	0	NA	0	1,282
40	NA	1	1	0	0	0	NA	0	0	1	NA	0	2,167
41	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1,071
42	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1,549
43	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2,992
44	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1,287
45	0	1	0	1	NA	0	1	0	0	0	0	NA	1,282
46	1	1	1	0	1	1	0	NA	1	1	0	0	1,876
47	0	0	0	0	NA	0	0	NA	0	0	NA	NA	1,130
48	0	1	0	0	1	0	0	NA	0	0	NA	0	1,294
49	1	1	1	NA	1	1	0	NA	1	1	NA	0	1,360
50	1	1	1	0	0	0	1	NA	0	1	1	0	1,275
51	0	1	NA	NA	1	0	1	0	0	1	NA	0	1,086
52	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,650
53	0	1	0	1	NA	0	1	0	0	0	0	NA	0,681
54	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,074
55	0	1	1	0	0	0	1	1	NA	1	NA	0	1,084
56	0	0	0	1	0	0	0	0	NA	0	1	0	0,928
57	0	1	1	0	0	0	0	0	NA	1	0	0	1,089
58	1	1	0	0	0	0	1	NA	NA	1	0	0	1,337
59	1	1	0	0	1	0	0	0	NA	0	NA	0	1,326
60	0	1	1	0	0	0	1	0	NA	1	NA	0	1,405
61	0	1	1	1	0	NA	NA	0	0	1	0	1	1,281
62	1	1	1	0	0	NA	NA	0	NA	0	NA	1	1,085
63	0	NA				0	NA		NA	NA			1,146
64	1	0				0	0		0	NA			
65	NA	1				0	0		0	NA			
66	0	0		0	NA	0	0		NA	0			

Продовження таблиці Г.1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
67	0	0		0	0	0	0		1	1			
68	0	NA		0	0	0	NA		NA	NA			
69	NA	1		NA	NA	NA	1		NA	NA			
70	1	NA		1	NA	0	NA		0	0			
71	0	0		NA	0	0	0		NA	NA			
72	0	1		1	1	0	1		0	NA			
73	0	1		0	NA	NA	0		0	0			

ДОДАТОК Д

Таблиця Д.1

Концентрації виділеної позаклітинної ДНК (пкДНК) з плазми крові пацієнтів з світлоклітинним раком нирки та здорових донорів, визначені методом кількісної ПЛР у реальному та за рівнем флуоресценції інтеркаляційного барвника Sybr Green I

№	Концентрація пкДНК пацієнтів з раком нирки		Концентрація пкДНК здорових донорів	
	Визначена методом кількісної ПЛР в реальному часі	Визначена методом інтеркаляції флюорисцентного барвника	Визначена методом кількісної ПЛР в реальному часі	Визначена методом інтеркаляції флюорисцентного барвника
1	2	3	4	5
1	112,3	656,5	44,6	68,6
2	427,6	2249,2	35,1	53,7
3	38,6	949,9	24,9	65,6
4	76,7	235,5	9,04	3,29
5	78,9	64,8	9,9	181,2
6	52,1	325	3	64,9
7	23,3	46,6	29,6	51,2
8	59,9	957,4	67,4	68,9
9	80,9	277,8	146,8	11,1
10	72,6	44,4	88	23,6
11	122,4	465,9	30,3	12,6
12	41,2	11,3	144,6	426,7
13	60,2	28,5	43,1	115,5
14	427,6	45,7	55,6	15
15	215,6	62,9	12,5	3,4

Продовження таблиці Д.1

1	2	3	4	5
16	78,5	207,6	-	-
17	42,6	97,3	-	-
18	57,6	114,5	-	-
19	133,9	131,7	-	-
20	86,5	32,6	-	-
21	106,9	32,7	-	-
22	56,5	1602,4	-	-
23	228,1	348,7	-	-
24	1176,6	576,6	-	-
25	226,3	456,1	-	-
26	323,9	392,8	-	-
27	353,3	458,7	-	-

ДОДАТОК Е

Таблиця Е.1

**Результати визначення метилювання пкДНК та індексу цілісності зі
зразків плазми крові, отриманих від здорових донорів**

№	Статус метилювання на пкДНК									Індекс цільності
	<i>RASSF1A</i>	<i>RASSF1C</i>	<i>GPX3</i>	<i>RUNX3</i>	<i>PCDH8</i>	<i>LRRC3B</i>	<i>APC</i>	<i>p16</i>	<i>p14</i>	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0,629
2	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0,691
3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,621
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,839
5	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0,723
6	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0,672
7	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0,661
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,551
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,860
10	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0,674
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,108
12	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0,642
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,685
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,860
15	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0,792
16	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
16	0	0	0	0	0	1	0	0	0	
18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
19	0	0	1	0	0	1	0	0	0	
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
21	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
23	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
24	0	0	0	0	0	1	0	0	0	

Продовження таблиці Е.1

[illegible]

ДОДАТОК Ж

Таблиця Ж.1

Результати визначення метилювання CpG-острівців промоторів генів на зразках ДНК, отриманих від хворих з новоутвореннями нирки

№	RASSF1A				RASSF1C				GPX3				RUNX3			Timp3		PCDH8			LLRC3B				VHL		APC				p16			p14		
	d	p	T	N	d	p	T	N	d	p	T	N	d	T	N	T	N	d	T	N	d	p	T	N	T	N	d	p	T	N	d	T	N	d	T	N
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
1	0	0	1	1	0		0	0	0		0	0																								
2	1	1	1	0	0		1	0	1		1	0																								
3	0	0	0	0	1		0	0	0		0	0																								
4	0	0	0	0	0		0	0	0		1	1																								
5	1	1	1	1	0		0	0	1		1	0																								
6	0	0	0	0	0		0	0	1		1	1																								
7	1	1	1	1	0		1	0	0		1	0																						0	0	
8	1	0	1	0	1		1	0	1		1	0															1	1	1	0						
9	1	0	1	0	0		0	0	1		1	0															0	0	1	0						
10	1	0	1	1	0		1	0	0		1	1	1	1	1			0	1	0							0	0	0	0						
11	1	1	1	1	0		0	0	0		1	1	0	1	0	0	0	1	1	0							1	0	1	0						
12	1	0	1	1	0		1	0	1		1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1			1	0	1	0						
3	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0						
14	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1			
15	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0			
16	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0					0	0	1	0	1	0	0	0	1			
17	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	NA	0	1	0	1	0	1	1	1			
18	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0				1	1	0
19	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0
20	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0			0	0	0	0	0	0	0	NA		0	0	0	0	1	1	0	1	1	0
21	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1					1	1	1

Продовження таблиці Ж.1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37		
22	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	NA	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	
23	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	NA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
24	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	NA	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	
25	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0					
26	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	
27	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0			0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0				1	1	0		
28	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1					1	1	0	
29	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	
30	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	
31	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1		0	0	0	0	1	0	
32	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1					
33	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0		
34	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0		
35	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	
36	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0				1	1	1	
37	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	
38	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	
39	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0				1	1	0		
40	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	
41	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0		0	0	
42	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	
43	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0		
44	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
45	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
46	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	NA	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	
47	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	
48	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	
49	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	

Продовження таблиці Ж.1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37		
50	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	
51	0		0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0
52	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1		0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
53	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0		0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
54	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0		0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
55	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0		0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	
56	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	
57	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0
58	0		1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	
59	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	
60	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	
61	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	NA	NA	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0		
62	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	NA	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	
63	0	0	0	0	1		1	0	0		1	0		1	1			0	1	0							1	0	1	0	1	1	0	0	1	0		
64	1	0	1	0	0		0	0	0		0	0		1	1			1	1	0							1	0	1	1	0	0	0	1	0	0		
65	1	1	1	1			0	0	0		0	0		1	0			0	1	0							1	0	1	1								
66	1		1	0			0	0	0		0	0		1	0																							
67	0		0	0			0	0	1		1	1																										
68	0		0	0			0	0	1		1	0																										
69	0		0	0			1	1	0		0	0																										
70	1	0	1	0			0	0	1		1	0																1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	
71	1	1	1	0	1		1	0	1		1	0		1	0													0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
72	1		1	0			0	0	0		0	0																1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	
73	1		1	0			1	0	1		1	0		1	0													0	0	0	0							
74	1		1	1			0	0	0		0	0		0	0													0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	
75	0		0	0			0	0	0		1	0		0	0															1	0	0	0	0	0	1	0	
76	0		0	0			0	0	0		1	0		0	0															0	0							
77	1		1	0			0	0	0		0	0		1	0																1	0						

Продовження таблиці Ж.1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
78	1		1	0			0	0	0		1	0		0	0														1	0						
79	0		0	0			0	0	0		1	0		1	1														1	0						
80	1		1	0			1	0	0		1	0		0	0														1	0						
81	1		1	1			1	0	0		0	0		1	1														1	0						
82	0		0	0			0	0	0		1	1		0	0														1	1						
83	0		0	0			1	0	1		1	0		0	0														1	0						
84	0		0	0			0	0	0		1	0		0	0														1	0						
85	0		0	0			0	0	0		0	0		0	0														0	0						
86	1		1	0			0	0	0		1	0		1	0														0	0						
87	1		1	0			0	0	1		1	0		0	0														1	0						
88	0		0	0			0	0	0		0	0		0	0														0	0						
89	0		0	0			1	0	0		0	0		0	0														1	0						
90														0	0														0	0						
91														1	0														1	0						
92														0	0														1	0						
93														1	0														1	0						
94														0	0														0	0						
95														0	0														1	0						
96														0	0														1	0						
97														1	1														1	0						
98														0	0														1	0						
99														1	0														1	0						
100														0	0														1	0						

d – зразки пкДНК, виділені з плазми крові пацієнтів, взятої до оперативного втручання; p – зразки пкДНК, виділені з плазми крові пацієнтів, взятої після оперативного втручання (5-7 днів); T – зразки ДНК, виділені з новоутворень нирки; N – зразки ДНК, виділені з умовно здорових тканин нирки хворих з новоутвореннями нирки

Таблиця Ж.2

Статистичний аналіз результатів з визначення статусу метилювання обраних генів на пкДНК плазми крові хворих з новоутвореннями нирки у порівнянні зі зразками плазми здорових донорів

Ген	AUC		p-value	Чутливість		Специфічність		LHR +	LHR -
	Показник	95% ДІ		%	95% ДІ	%	95% ДІ		
<i>RASSF1A</i>	0,7926	0,7144 - 0,8709	<0,0001	67,42%	57,13% - 76,26%	91,11%	79,27% - 96,49%	7,58	0,13
<i>RASSF1C</i>	0,6	0,4953 - 0,7047	0,0754	20,00%	12,08% - 31,27%	100,00 %	92,13% - 100,0%		
<i>GPX3</i>	0,697	0,6087 - 0,7854	0,0002	93,30%	82,14% - 97,71%	46,07%	36,09% - 56,37%	1,73	0,58
<i>RUNX3</i>	0,7347	0,6324 - 0,8370	<0,0001	46,94%	33,70% - 60,62%	100,00 %	92,13% - 100,0%		
<i>LLRC3B</i>	0,5833	0,4683 - 0,6984	0,1623	50,00%	36,64% - 63,36%	66,67%	52,07% - 78,64%	1,50	0,67
<i>APC</i>	0,7619	0,6703 - 0,8535	<0,0001	88,89%	76,50% - 95,16%	63,49%	51,15% - 74,28%	2,43	0,41
<i>CDKN2A (p14)</i>	0,7116	0,6062 - 0,8169	0,0004	93,33%	82,14% - 97,71%	48,98%	35,58% - 62,53%	1,83	0,55
<i>CDKN2A (p16)</i>	0,68	0,5725 - 0,7875	0,0025	36,00%	24,14% - 49,86%	100,00 %	92,13% - 100,0%		
<i>PCDH8</i>	0,7946	0,7064 - 0,8829	<0,0001	58,93%	45,88% - 70,83%	100,00 %	92,13% - 100,0%		

Таблиця Ж.3

Статистичний аналіз результатів з визначення статусу метилювання панелі маркерних генів для визначення утворення нирково клітинної карциноми на пкДНК плазми крові

Ген	AUC		p-value	Чутливість		Специфічність		LHR+	LHR-
	Показник	95% ДІ		%	95% ДІ	%	95% ДІ		
<i>RASSF1A+GPX3</i> + <i>APC+p14</i>	0,9368	0,8850 to 0,9886	<0,0001	79,17 %	65,74% to 88,27%	97,78%	88,43% to 99,89%	35,66	0,03

