

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

МАНЬКОВСЬКА ОКСАНА СЕРГІЇВНА



УДК 577.218+616.65

**ЕПІГЕНЕТИЧНІ ТА ЕКСПРЕСІЙНІ МАРКЕРИ ПУХЛИН
СЕЧОСТАТЕВОЇ СИСТЕМИ**

03.00.03 – молекулярна біологія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2021

Дисертацію є рукопис.

Робота виконана у відділі молекулярної онкогенетики Інституту молекулярної біології і генетики НАН України та на кафедрі біохімії ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка (м. Київ).

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

Офіційні опоненти: доктор біол. наук, професор, член-кор. НАН України **Мінченко Олександр Григорович**, завідувач відділу молекулярної біології, Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України;

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

Захист відбудеться «6» травня 2021 року о 10³⁰ на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.237.01 Інституту молекулярної біології і генетики НАН України за адресою: 03680, м. Київ, вул. Ак.Заболотного, 150.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту молекулярної біології і генетики НАН України за адресою: 03680, м. Київ, вул. Ак.Заболотного, 150.

Автореферат розісланий «6» квітня 2021 року.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради
к.б.н., с.н.с.



Крупська І.В.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

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

Рак передміхурові залози є одним з найчисленніших за поширенням типом злоякісних новоутворень у Європі, США та Канаді. Цей тип раку складає приблизно 14 % усіх випадків злоякісних пухлин серед чоловіків. Рак сечового міхура посідає десяте місце серед найбільш поширених злоякісних захворювань у світі з 573 278 нових випадків та 212 536 смертельних випадків щороку (<https://gco.iarc.fr/today>). Хоч більшість пацієнтів (70-80%) з неінвазивним раком сечового міхура мають хороший прогноз, проте цей тип раку часто може переходити в інвазивну форму, для якої 5-річна виживаність складає всього 10-50% залежно від стадії пухлини та методу лікування (Kandimalla R.. et al., 2013).

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

Відомо, що ракові клітини характеризуються порушеннями у процесах поділу і проліферації. Серин-треонінові кінази родини Aurora відіграють ключову роль у процесах, залучених у клітинному поділі, серед яких подвоєння центросом, формування веретена поділу, прикріплення хромосом до веретена та сегрегація сестринських хроматид (Carmena M. et al. 2003). Порушення у вище зазначених процесах можуть призвести до злоякісної трансформації клітини. Наразі було описано низку типів пухлин, у яких спостерігали порушення експресії генів, продуктом яких є білки родини Aurora (Tang A. et al., 2017). У зв'язку з цим їх гени є потенційними онкогенами, а їх білкові продукти можуть бути мішенями для таргетної терапії, тож дослідження їх ролі у канцерогенезі різних типів пухлин є, безумовно, актуальним.

Епігенетичні зміни, такі як метилювання ДНК, часто спостерігаються в пухлинах різного типу. Дійсно, було показано, що метилювання генів-онкосупресорів сприяє розвитку різних видів раку, включаючи рак сечового міхура і передміхурової залози. Метилювання ДНК відбувається в CpG-острівцях, які часто лежать у промоторному регіоні генів. Метилювання у промоторах генів-онкосупресорів негативно впливає на експресію таких генів і може бути ініціюючою подією або сприяти промоції злоякісної пухлини (Kulis M. et al., 2010).

Такі епігенетичні модифікації ДНК можуть слугувати корисними біомаркерами для діагностичних та прогностичних цілей. Тому протягом двох останніх десятиліть ведеться активний пошук маркерів на основі метилювання генів онкосупресорів, які могли б допомогти у виявленні низки пухлин, зокрема раку передміхурової залози та раку сечового міхура.

Деякі з довгих некодуючих РНК також мають властивості онкогенів. Наприклад, для раку передміхурової залози вже доведеним онкогеном є довга

некодуєча РНК РСА3 (Loeb S. et al., 2010). Роль в онкогенезі багатьох некодуєчих РНК, зокрема довгої некодуєчої РНК PANDAR, яка є кандидатом у біомаркери деяких видів раку, в тому числі й раку сечового міхура (Taheri M. et al., 2018), відома не до кінця. Переважна більшість досліджень експресії гена PANDAR були виконані на клітинних лініях або зразках пухлинних тканин пацієнтів (Han L. et al., 2019), що не дає повного розуміння того, чи можна використовувати отримані дані для ранньої діагностики, моніторингу стану хворого або для прогнозу розвитку захворювання.

В останні роки все більше досліджень присвячені вивченню можливості діагностики різноманітних захворювань, в тому числі онкологічних, на основі біомаркерів, що циркулюють у біологічних рідинах організму. Даний підхід, в першу чергу, є неінвазивним, що робить можливим проводити такі аналізи у осіб без будь-яких симптомів, а значить, придатний до використання для ранньої діагностики і скринінгу населення. Неінвазивність також нівелює ризик пошкодити уже наявну пухлину, що іноді відбувається під час голкової біопсії, провокує потрапляння пухлинних клітин у кров і може бути причиною виникнення віддалених метастазів (De Rubis G. et al., 2019). Також рідинні біопсії є придатними для моніторингу стану хворого, в тому числі після операції і протягом лікування, і можуть нести інформацію як про відповідь на терапію, так і про ризики рецидиву захворювання (Smania M., 2020). Найбільш інформативним для різних захворювань є той тип біологічної рідини, яка контактує з ураженим органом або знаходиться у безпосередній близькості до нього. Зокрема, для пухлин сечостатевої системи такою біологічною рідиною є сеча.

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

Зв'язок з науковими програмами, планами, темами. Робота виконана у відповідності до науково-дослідних тем відділу молекулярної онкогенетики Інституту молекулярної біології і генетики НАН України. У роботу включені наукові результати, які отримані автором під час виконання проекту УНТЦ № 6056 «Набір нуклеїнових маркерів для виявлення та диференціювання злоякісних пухлин сечостатевої системи» (2014-2015 рр.), програми «Молекулярні та клітинні біотехнології для потреб медицини, промисловості та сільського господарства» - «Гени-супресори пухлинного росту та пухлино-асоційовані гени - як потенційні маркери для діагностики та терапії злоякісних новоутворень» (2015-2019 р., державний реєстраційний номер 0115U002950) та в рамках 5-річної бюджетної тематики відділу «Ідентифікація нових біомаркерів для діагностики злоякісних новоутворень та розробка підходів до генотерапії пухлин у модельних системах» (I кв.2016 –IV кв. 2020 рр.).

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

Для досягнення мети нами було сформульовано наступні завдання:

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

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

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

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

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

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

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

Об'єкт дослідження – клітинні лінії та клінічні зразки хворих на рак сечового міхура та рак передміхурової залози.

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

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

Наукова новизна одержаних результатів. У дисертаційній роботі було запропоновано нові набори потенційних маркерів раку сечового міхура та раку передміхурової залози на основі метилювання генів-онкосупресорів, які здатні відрізнити осіб з раком від пацієнтів без онкологічних захворювань.

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

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

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

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

Особистий внесок здобувача. Дисертант безпосередньо брав участь в отриманні всіх результатів, представлених у дисертації. Планування роботи та аналіз і графічне представлення результатів з визначення експресії генів кінази родини Auroga та кількісного визначення метилювання генів у тканинах раку передміхурової залози виконувалось спільно з д.б.н., пров.н.с. Герашенко Г.В. У роботі були використані кДНК з РНК з тканин РПЗ, синтезована Розенберг Е.Е., а також ДНК, виділена з тканин РПЗ Мевс Л.В. Забір та обробка клінічних зразків, виділення нуклеїнових кислот з матеріалу, отриманого з сечі пацієнтів, синтез кДНК, метил-специфічна ПЛР, ПЛР, кількісна ПЛР, біоінформатичний аналіз виконувались дисертантом за участі студентів Національного університету «Києво-Могилянська академія» та ННЦ «Інститут біології та медицини» КНУ ім. Тараса Шевченка Асатрян О.Е., Скрипнікової О.С., Корсакової

А.С., Чернявського К.Р., Савицького А.Л., а також пров.інж. Росохацької І.В. Культивування клітин, біоінформаційний пошук, статистичний аналіз даних, отриманих на матеріалі з рідинних біопсій, виконувались дисертантом особисто. Аналіз та обговорення результатів проводилися спільно з науковим керівником, д.б.н., проф. Кашубою В.І.

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

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

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

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

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали і методи дослідження. *Клітинні лінії.* У дослідженні були використані клітинні лінії раку передміхурової залози LNCaP, PC3 і DU145, а також лінія нормальних клітин передміхурової залози PNT2.

Клінічні зразки. У роботі було використано зразки тканин карцином та парних умовно нормальних тканин (УНТ) передміхурової залози та сечового міхура, зразки тканин доброякісних пухлин (аденоми) передміхурової залози та зразки сечі пацієнтів з раком передміхурової залози, сечового міхура, запальними захворюваннями сечостатевої системи і умовно здорових осіб. Для кількісного визначення метилювання та експресії потенційних онкосупресорів було використано 15 пар тканин аденокарцином передміхурової залози і УНТ і 2 зразки аденом простати. Для визначення експресії генів кінази родини Aurora було проаналізовано 33 пари тканин

аденокарцином передміхурової залози і УНТ і 17 зразків аденом простати. Визначення експресії днРНК PANDAR було виконане на 24 парах тканин карциноми сечового міхура і УНТ.

Якісний аналіз метилювання пкДНК з сечі було проведено на зразках 41 пацієнта з раком передміхурової залози, 32 зразках пацієнтів з раком сечового міхура, 12 зразках пацієнтів із запальними захворюваннями сечостатевої системи, 16 зразках, отриманих в умовно здорових осіб. Для визначення відносної експресії генів кіназа родина Aurora і кіназа BRAF у клітинах, осаджених з сечі, було використано 39 зразків сечі хворих на рак передміхурової залози, 10 зразків умовно здорових осіб та зразки 5-ти осіб, у яких були діагностовані запальні захворювання сечостатевої системи. Визначення рівня позаклітинної днРНК PANDAR у сечі було проведено на 26 зразках пацієнтів з РПЗ, 36 зразках пацієнтів з РСМ і 11 зразках осіб без онкологічних захворювань. Забір зразків здійснювали в Національному інституті раку (Київ, Україна), Інституті урології (Київ, Україна). Усі зразки були зібрані відповідно до Гельсінської декларації та вказівок, виданих Етичним комітетом Інституту урології, Національним інститутом раку та Етичним комітетом Інституту молекулярної біології і генетики. Зразки пухлин характеризувались згідно з Міжнародною системою класифікації пухлин та критеріями Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ).

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

Первинна обробка зразків. Отримання кондиційованого середовища клітинних ліній проводилось шляхом послідовних центрифугувань з метою осадити клітини, їх залишки та апоптичні тільця. Зі зразків сечі клітини осаджували центрифугуванням, після чого супернатант центрифугували ще раз, щоб позбутись залишків клітин. Частину заморожували для виділення РНК, а до іншої додавали СТАВ для осадження ДНК і залишали на +4°C до формування каламутного осаду. Після цього центрифугували і осад використовували для подальшої процедури виділення ДНК.

Молекулярно-біологічні методи. Виділення позаклітинної ДНК (пкДНК) проводили з попередньо сформованих за допомогою СТАВ осадів. Для виділення геномної ДНК тканини попередньо подрібнювали у рідкому азоті до стану порошкоподібної маси. Клітини осаджували центрифугуванням. Зразки підлягали лізису та протеїназній обробці, після чого виділення ДНК було виконано за модифікованою методикою із застосуванням суміші фенол/хлороформ/ізоаміловий спирт (25:24:1). Виділення РНК проводили з використанням TRI-реагента (SIGMA) згідно з протоколом виробника.

кДНК синтезували з 1 мкг загальної РНК після обробки ДНКазою (Thermo Fisher Scientific, США), використовуючи RevertAid H-Minus M-MuLV Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific, США), згідно з протоколом виробника. Для синтезу використовували суміш oligoDT/random hexamer праймерів. Рівні експресії досліджуваних генів були виявлені за допомогою кількісної ПЛР у реальному часі з

використанням HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus (Solis BioDyne, Естонія) на приладі CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, США).

Попередня бісульфітна обробка зразків ДНК була виконана за допомогою реагентів набору EZ DNA Methylation-Lightning™ Kit (Zymo Research) згідно з протоколом виробника. Повністю метильована ДНК для контролю якості праймерів створювалась за допомогою MSS1 метилтрансферази компанії NEB (Великобританія). Праймери до метильованої та неметильованої форм досліджуваних генів розробляли за допомогою програмного забезпечення Methyl Primer Express® Software v1.0. МСП ПЛР бісульфітно обробленої ДНК із сечі проводили за допомогою 5X FIREPol® Master Mix Ready to Load (Solis BioDyne). Продукти МСП аналізували електрофоретично. Для проведення кількісної метил-специфічної ПЛР використовуючи HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus (Solis BioDyne, Естонія) та CFX96 систему виявлення в реальному часі PCR (Bio-Rad, США).

Методи біоінформатичного аналізу. У дослідженні було використано наступні алгоритми і бази даних: LncBook, Oncomir, dbDEMС 2.0, miRCancer, DIANAtools (TarBase v.8), ToppMiR, miRNet.

Методи статистичної обробки. У роботі було використано методи статистичного аналізу: тест Колмогорова – Смірнова, тест Крускала-Волліса та пост-hoc тест Данн-Бонфероні, тест Вілкоксона для попарних порівнянь, точний тест Фішера, тест рангової кореляції Спірмана, тест Манна-Вітні, MDR, аналіз логістичної регресії та ROC-аналіз. Для виконання всіх перелічених тестів та візуалізації даних використовувались програми STATISTICA 10, Microsoft Excel, Sigma Plot, Displayr (<https://app.displayr.com/>) та Prism GraphPad.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Метильовання потенційних генів-онкосупресорів у клінічних зразках пацієнтів та клітинних лініях раку передміхурової залози. Проаналізувавши рівні метильовання промоторів генів *PTEN*, *CDH1*, *NKX3.1*, *KRT18*, *RASSF1A* і *VIM* у клітинних лініях раку передміхурової залози PC3, LNCaP і DU145 за допомогою кількісної МСП, ми виявили, що серед досліджуваних генів найвищий рівень метильовання спостерігався у гена *NKX3.1*. Натомість, рівень метильовання промотора гена *CDH1* був стабільно низький у всіх досліджуваних клітинних лініях, при чому найнижчий рівень його метильовання спостерігався у клітинній лінії DU145. Промотор гена *KRT18* мав найвищий рівень метильовання у DU145 і найнижчий у PC3. Метильовання промотору гена *PTEN* мало контрастні показники у клітинних лініях PC3 і LNCaP. У PC3 рівень метильовання промоторних послідовностей *PTEN* перевищував 0,9, у той час як у LNCaP цей показник складав близько 0,2. Промотор гена *RASSF1A* був практично повністю метильований у клітинній лінії PC3 і демонстрував середні рівні метильовання у двох інших клітинних лініях (0,688 у клітинній лінії LNCaP і 0,692 у DU145). Для гена *VIM* ми виявили тотальне метильовання промоторних послідовностей (рис. 1 (a)).

Ген *VIM* був повністю заметильований у всіх зразках аденокарцином передміхурової залози і парних прилеглих зразках нормальних тканин. Інші гени продемонстрували різні патерни метилювання, які графічно зображені на рис. 1(б).

Ми не виявили статистично достовірних відмінностей між групами, що аналізувались. Також ми не виявили суттєвих відмінностей у рівнях метилювання промоторів досліджуваних генів між ранньою (1-2) та пізньою (3-4) стадіями зразків раку передміхурової залози. При цьому кореляція метилювання промотору *CDH1* між парами TN становила $r_s = 0,771$, кореляція між парами TN у метилюванні промотору *PTEN* становила $r_s = 0,668$, а для *NKX3.1* коефіцієнт кореляції склав $r_s = 0,851$ ($p < 0,01$). Було виявлено деякі кореляційні зв'язки між рівнями метилювання та відносною експресією різних генів, а також КПХ пацієнтів. У тканинах аденокарцином рівні метилювання промоторів *NKX3.1* і *CDH1* негативно корелювали між собою ($r_s = -0,686$, $p < 0,01$), тоді як їх відносні рівні експресії корелювали позитивно ($r_s = 0,696$, $p < 0,01$). Метилювання промотора *RASSF1A* негативно корелювало з експресією гена *PTEN* ($r_s = -0,789$, $p < 0,01$). Крім того, для зразків аденокарцином ми виявили статистично достовірну при $p < 0,05$ негативну кореляцію рівня метилювання промотора *KRT18* у тканинах раку передміхурової з балом за шкалою Глісона ($s = -0,593$).

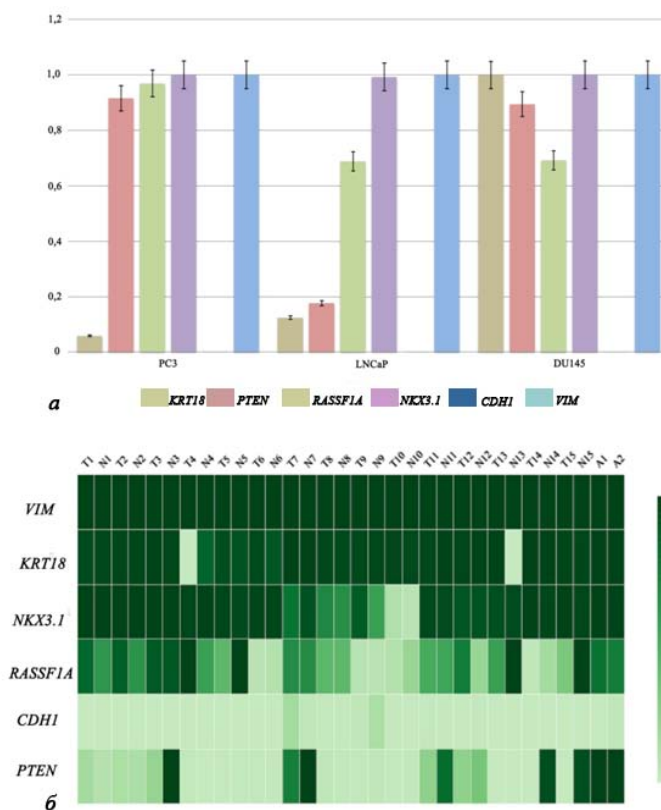


Рис. 1. Відносні рівні метилювання *VIM*, *PTEN*, *RASSF1A*, *NKX3.1*, *KRT18* і *CDH1* у клітинних лініях раку передміхурової залози (а) і тканинах пацієнтів (б): Т-аденокарцинома, N – умовно нормальна тканина, А-аденома

Було виявлено статистично достовірну різницю у рівнях метилювання промотора *RASSF1A* між групою зразків з наявним гібридним транскриптом та групою, де він був відсутній, з вищим рівнем метилювання у TMPRSS2:ERG-позитивних зразках ($t = 4,98$, $p < 0,001$).

Дослідивши наявність метилювання генів *PTEN*, *RASSF1A*, *NKX3.1*, *KRT18*, *CDH1* і *GDF15* у сечі хворих на РПЗ, запальні захворювання сечостатевої системи та здорових донорів, ми виявили метилювання 5 з 6 досліджуваних генів у всіх групах індивідів. Тільки метилювання *NKX3.1* не було виявлено у позаклітинній ДНК із сечі жодного здорового донора. Метилювання промоторів більшості генів часто зустрічалось як у хворих на РПЗ, так і у хворих з запаленням (рис. 2).

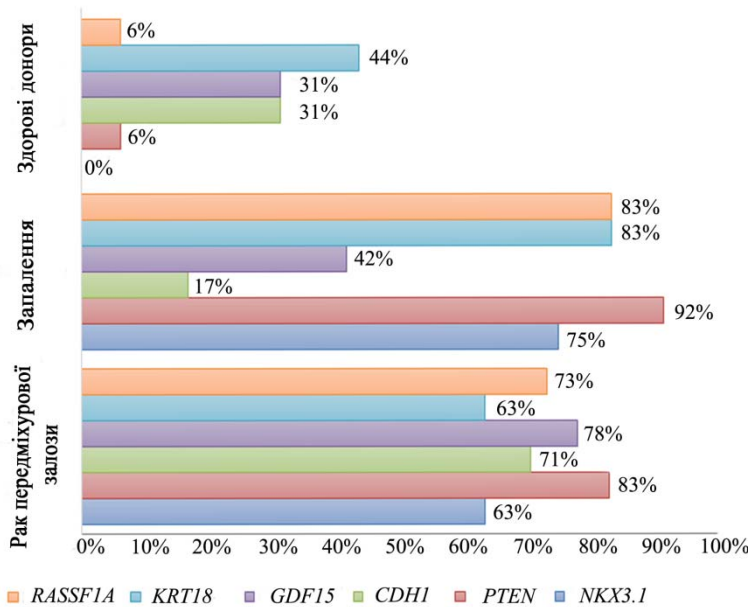


Рис. 2. Частоти метилювання генів *PTEN*, *RASSF1A*, *NKX3.1*, *KRT18*, *CDH1* і *GDF15* у сечі хворих на РПЗ, запальні захворювання сечостатевої системи та здорових донорів

Ми розрахували коефіцієнт OR для кожного гена, метилювання якого ми досліджували, який визначає відношення шансів бути хворим на рак передміхурової залози за умови наявності метилювання цього гена (відносно групи для порівняння, метилювання в якій розглядалось як хибно позитивний результат). Найвищий показник OR для груп хворих на РПЗ і здорових осіб був притаманний метильованому *PTEN* (72.86, ДІ 8.224-645.5). Для *NKX3.1* він не визначався, оскільки не було знайдено жодного хибно позитивного результату. Проте тільки для метилювання генів *CDH1* і *GDF15* було виявлено можливість відрізнити групи хворих на РПЗ і усіх осіб без онкозахворювань, включаючи хворих з запаленням (OR=7.25, ДІ 2.442-21.52, OR=6.4 ДІ 2.196-18.65, відповідно).

Ми провели ROC-аналіз здатності різних комбінацій метильованих генів відрізнити РПЗ і осіб з груп для порівняння (пацієнтів з запаленням, здорових донорів і усіх індивідів без онкозахворювань) (рис. 3(a-z)).

Поєднуючи отримані результати, ми створили криву ROC для поєднання метильованих *PTEN*, *RASSF1A*, *NKX3.1* та *CDH1* з *GDF15*, щоб визначити їх потенціал для диференціації між раком передміхурової залози та індивідами без раку. Площа під кривою ROC (AUC) становила 0,8175, $p < 0,0001$ (рис. 3(з)).

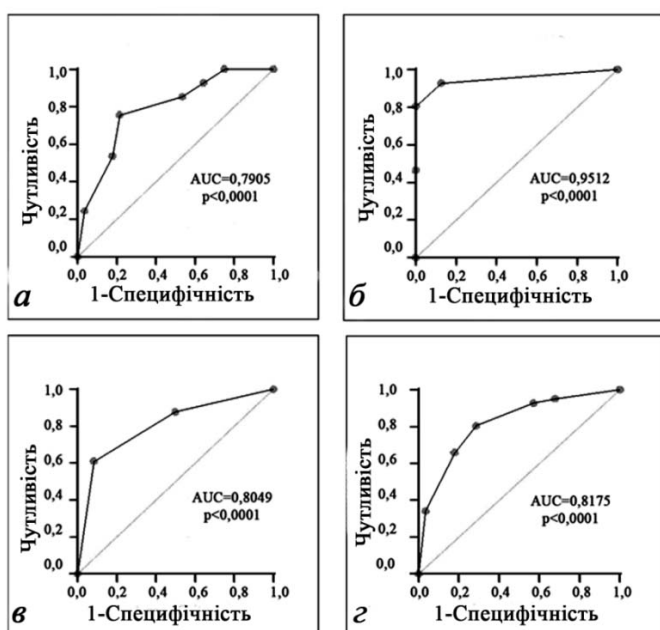


Рис. 3. Криві ROC, що ілюструють розраховані чутливість і специфічність метилювання досліджуваних генів для детекції РПЗ: а) комбінація метилюваних *PTEN*, *CDH1*, *KRT18*, *NKX3.1*, *RASSF1A* та *GDF15* (референсна група* - особи без раку (здорові донори та пацієнти із запаленням)); б) комбінація метилюваних *PTEN*, *RASSF1A* та *NKX3.1* (референсна група - здорові донори); в) комбінація метилюваних *CDH1* та *GDF15* (референсна група - пацієнти із запаленням); г) комбінація метилюваних *PTEN*, *CDH1*, *NKX3.1*, *RASSF1A* та *GDF15* (референсна група - особи без раку). *За хибно позитивні результати приймалось метилювання у референсній групі

Метилювання потенційних генів-онкосупресорів у клінічних зразках пацієнтів з раком сечового міхура. За результатами аналізу метилювання промоторів у хворих на рак сечового міхура було виявлено метилювання усіх досліджуваних генів з різною частотою. Найчастіше заметильованим у групи хворих на РСМ був ген *RASSF1A* (96,88%), у той час як метилювання промотору гена *TMEFF2* було найбільш рідкісним явищем (46,88%) (рис. 4).

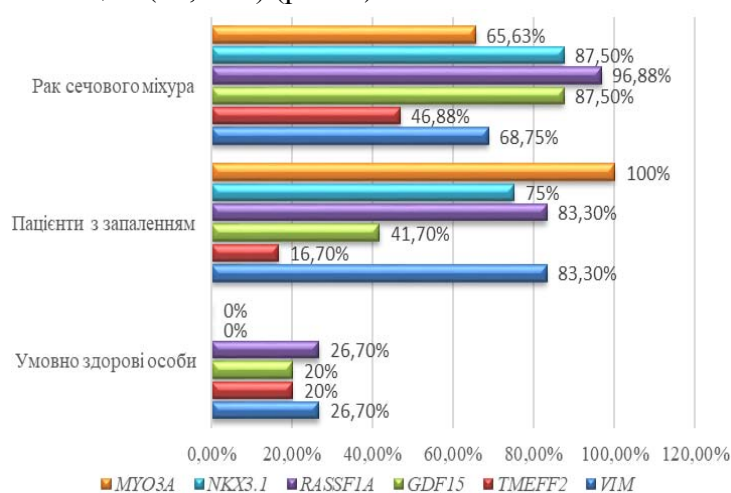


Рис. 4. Частоти метилювання *VIM*, *TMEFF2*, *GDF15*, *RASSF1A*, *NKX3.1*, *MYO3A* у пкДНК з сечі хворих на РСМ, запальні захворювання сечостатевої системи та здорових донорів

На основі отриманих даних для кожного з генів було пораховано OR як показник ймовірності наявності у особи раку сечового міхура за присутності метилювання даного гена. Найвищий показник OR для груп хворих на РСМ і здорових осіб було визначено для наявності метилювання гена *RASSF1A* (OR=85.25, ДІ 8.576-847.4). Для груп рак/особи без онкологічних захворювань достатній OR для їх

диференціації мала наявність метильованих генів *TMEFF2*, *GDF15*, *RASSF1A* і *NKX3.1*, проте тільки оцінка метилювання *GDF15* виявляла різницю між групами хворих на рак сечового міхура і хворих з запаленням (OR=9.8, ДІ 2.072-46.35).

Ми використали метод простої логістичної регресії для оцінки здатності наявності метилювання всіх досліджуваних генів відрізнити хворих на рак сечового міхура від умовно здорових осіб, а також хворих на рак сечового міхура від хворих із запаленням і побудували ROC криві (рис. 5).

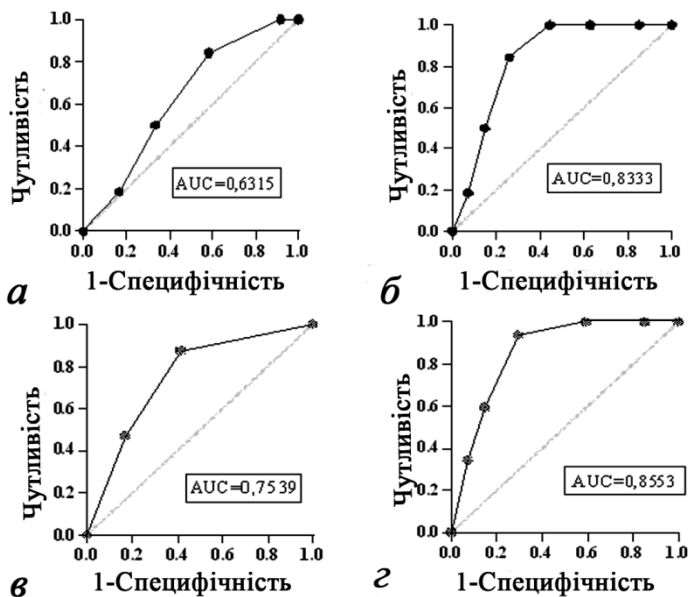


Рис. 5. Криві ROC, що ілюструють розраховані чутливість і специфічність метилювання досліджуваних генів для детекції РСМ: а) комбінація метильованих *VIM*, *TMEFF2*, *GDF15*, *RASSF1A*, *NKX3.1*, *MYO3A* (референсна група* – хворі з запаленням); б) комбінація метильованих *VIM*, *TMEFF2*, *GDF15*, *RASSF1A*, *NKX3.1*, *MYO3A* (референсна група - особи без онкологічних захворювань (здорові та хворі із запаленням)); в) комбінація метильованих *TMEFF2* і *GDF15* (референсна група - пацієнти з запаленням); г) комбінація метильованих *VIM*, *TMEFF2*, *GDF15*, *RASSF1A* і *NKX3.1*

(референсна група - особи без раку). *За хибно позитивні результати приймалось метилювання у референсній групі

Дані логістичної регресії продемонстрували, що метилювання у пкДНК з сечі генів *VIM*, *TMEFF2*, *GDF15*, *RASSF1A* і *NKX3.1* вказує на шанси мати онкологічне захворювання з OR = 3,4, $p < 0,001$. Площа під ROC кривою становила 0,8553 (рис. 5 (г)).

Відносна експресія генів кіназ родини *Aurora* та кінази *BRAF* у клітинних лініях і клінічних зразках раку передміхурової залози. Ми дослідили відносну експресію генів кіназ родини *Aurora* та кінази *BRAF* на клітинних лініях раку передміхурової залози (LNCaP та PC3) та у клітинній лінії нормальних клітин передміхурової залози людини PNT2.

Клітини лінії PC3 характеризувались нижчою експресією генів *AURKA* і *AURKB* у порівнянні з андрогенчутливою лінією LNCaP і нормальними клітинами передміхурової залози. При цьому, рівень експресії *AURKC* у даної клітинної лінії був найвищим з-поміж усіх інших. Рівень експресії *BRAF* у PC3 мав вищі показники, ніж у LNCaP. За даними поточного дослідження *AURKA* і *AURKB* мали найвищу експресію у клітинах PNT2. Крім того, привертає увагу характер взаємного співвідношення рівнів експресії *AURKA* і *AURKB* у PC3 у порівнянні з двома іншими клітинними лініями: у PC3 рівень відносної експресії *AURKA* у 8,8 разів вищий за рівень відносної експресії *AURKB*, а у LNCaP і PNT2 експресія *AURKB* незначно перевищує експресію *AURKA* (у 1,2 і 1,1 рази, відповідно).

Нами було виявлено, що експресія *AURKA*, *AURKB* і *AURKC* детектується як в аденокарциномах передміхурової залози, так і в парних умовно нормальних тканинах передміхурової залози тих самих пацієнтів, а також у доброякісних пухлинах – аденомах передміхурової залози (рис.6). Провівши кореляційний аналіз залежності відносної експресії генів кінази родини Aurora від клінічних характеристик пацієнта (група аденокарцином), ми виявили позитивну кореляцію між стадією пухлини та експресією *AURKC* ($r_s=0.372$, $p<0.01$) і негативну кореляцію між стадією та експресією *AURKB* ($r_s=-0.344$, $p<0.01$).

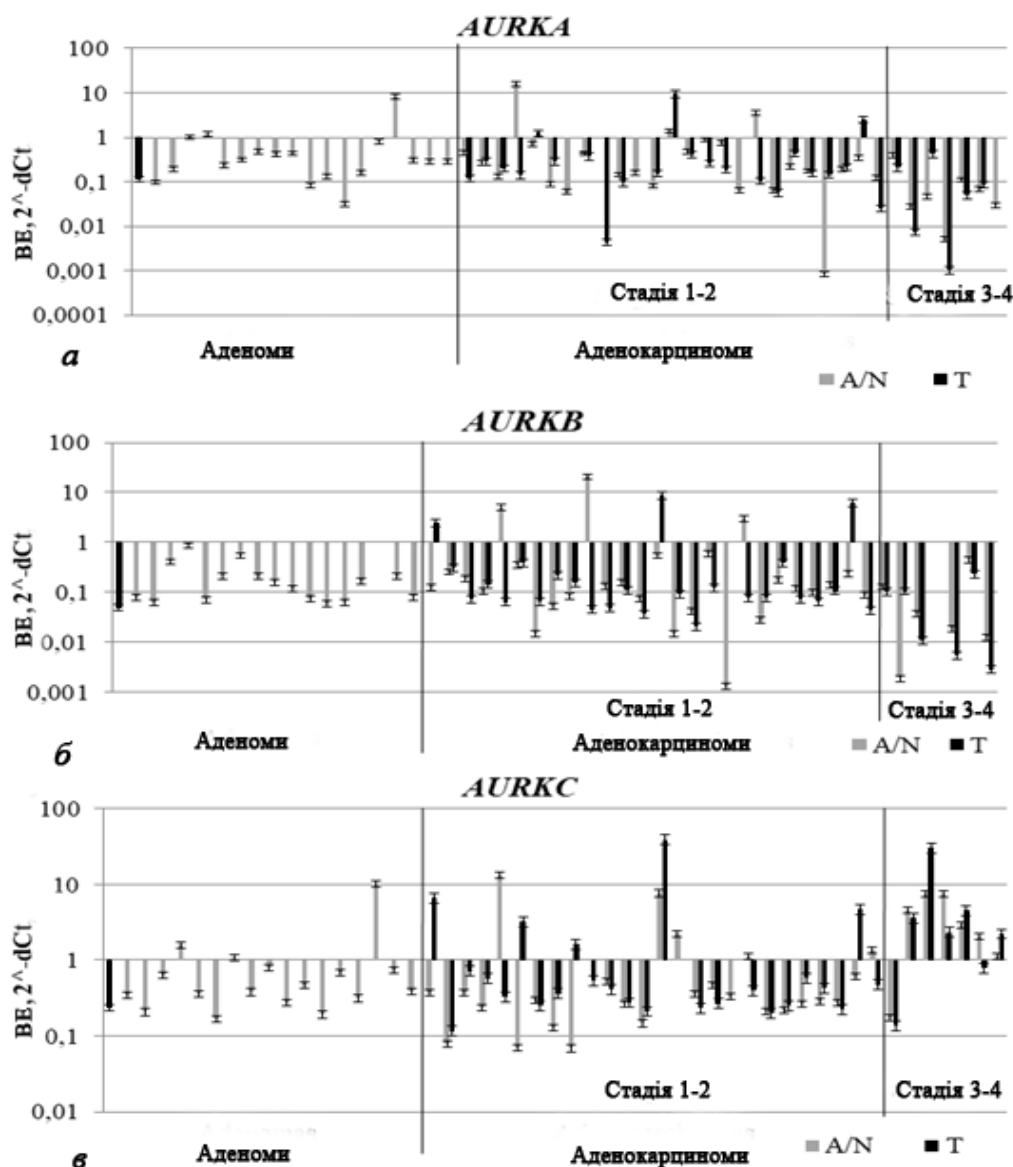


Рис. 6. Рівні відносної експресії (BE) генів кінази родини Aurora у тканинах аденом, аденокарцином і парних умовно нормальних тканинах передміхурової залози: а) BE *AURKA*; б) BE *AURKB*; в) BE *AURKC*. Позначення: T – аденокарцинома, N – парна умовно нормальна тканина, A – аденома.

На наступному етапі ми дослідили кореляцію експресії генів *AURK* між собою та з генами, які пов'язані з розвитком раку передміхурової залози (PCAG, раніше досліджені у відділі) і з'ясували, що показники відносної експресії *AURKB* і *AURKA* у

групі аденокарцином позитивно корелюють між собою ($r_s=0.365$, $p<0.05$). Експресія гена *AURKC* позитивно корелювала з експресією *CYP17A1* ($r_s =0.370$, $p<0.05$) і негативно з експресією гена *INSRA* ($r_s =-0.397$, $p<0.05$). Інші результати представлені у таблиці 1.

Таблиця 1.

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

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

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

Ми дослідили відносну експресію генів кіназ родини Auroga та кінази BRAF у клітинах, осаджених з сечі трьох груп індивідів, а саме: хворих на рак передміхурової залози ($n=39$), умовно здорових осіб ($n=10$) та осіб, у яких були діагностовані запальні захворювання сечостатевої системи ($n=5$)

На основі проведених розрахунків було виявлено, що відносні рівні експресії гена *AURKA* у циркулюючих клітинах з сечі досліджуваних осіб були статистично достовірно вищими у групі з РПЗ, ніж у групі осіб без онкозахворювань ($t = 285$, $p = 0,014$).

Проаналізувавши кореляційні зв'язки між експресією досліджуваних генів на основі даних усієї вибірки, включно зі здоровими донорами та хворими з запаленням, ми виявили, що експресія генів *AURKA* і *AURKB*, а також *AURKC* і *BRAF* позитивно корелювали між собою.

Для того, щоб з'ясувати, чи відрізняється кореляція між цими генами у групі хворих на рак пацієнтів та осіб, які не мають онкологічних захворювань, ми проаналізували окремо ці групи індивідів. Ми виявили, що для хворих на РПЗ зазначені вище кореляційні зв'язки зберігаються з більш високими коефіцієнтами кореляції (експресія генів *AURKA* і *AURKB*, а також *AURKC* і *BRAF* позитивно корелювали між собою, $r_s = 0,774$ і $0,844$, $p<0,01$, відповідно). При цьому у осіб, що не мали діагностованих онкологічних захворювань, статистично достовірною виявилась

кореляція експресії *BRAF* з відносною експресією генів киназ Aurora A і Aurora B ($r_s = 0,73$ і $0,738$ відповідно), але не з експресією гена *AURKC*.

Дослідження можливої участі довгої некодуючої РНК PANDAR у канцерогенезі передміхурової залози та сечового міхура. Провівши біоінформатичний аналіз з використанням різних баз даних ми з'ясували, що з днРНК PANDAR можуть зв'язувались мікроРНК, які виконують онкосупресорні функції для пухлин передміхурової залози та сечового міхура і найбільш ймовірними серед них є наступні: *hsa-miR-28-5p* для передміхурової залози, *hsa-miR-708-5p* і *hsa-miR-3619-5p* для сечового міхура і *hsa-miR-7-5p* як для раку передміхурової залози, так і для раку сечового міхура.

Ми виявили, що клітинні лінії раку передміхурової залози помітно відрізняються за рівнями внутрішньоклітинної та позаклітинної днРНК PANDAR. У клітинній лінії LNCaP BE PANDAR у клітинах була найвищою серед інших клітинних ліній, у той час як найнижча BE PANDAR була у клітинах PC3. При цьому рівень позаклітинної днРНК PANDAR у PC3 і LNCaP були майже ідентичні. Співвідношення позаклітинних рівнів до внутрішньоклітинної експресії днРНК PANDAR для клітинних ліній LNCaP і DU145 мало близькі значення і становило $0,28$ і $0,32$ відповідно, у клітинах лінії PC3 це значення сягало $1704,6$.

Нами було визначено відносні рівні довгої некодуючої РНК PANDAR у безклітинній сечі пацієнтів з раком передміхурової залози ($n=26$), а також у групі осіб без онкологічних захворювань ($n=11$). Ми виявили, що дана некодуюча РНК присутня у сечі як хворих на РПЗ, так і осіб без раку (рис. 7).

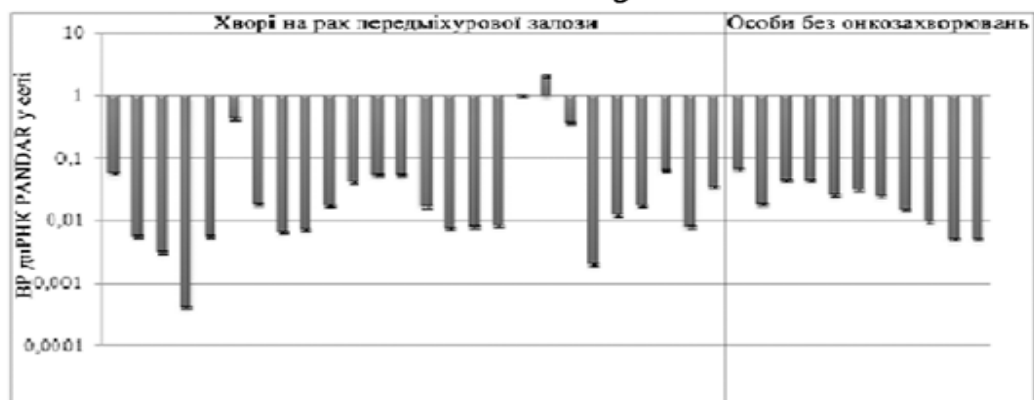


Рис. 7. Відносні рівні (BP) днРНК PANDAR у безклітинній сечі хворих на РПЗ та осіб без раку

Провівши тест Манна-Вітні для виявлення можливої різниці між цими двома групами за критерієм рівнів у сечі позаклітинної днРНК PANDAR ми з'ясували, що статистично достовірної різниці між цими групами відсутня.

Ми провели аналіз експресії днРНК PANDAR на зразках пухлин раку сечового міхура та прилеглих гістологічно нормальних тканинах ($n=24$). Результат тесту для попарних порівнянь Вілкоксона показав, що статистично достовірної різниці між порівнюваними групами не спостерігалось. Після проведеного нами аналізу кореляцій

ми виявили, що відносна експресія днРНК PANDAR достовірно позитивно корелювала ($r_s=0,548$, $p=0,006$) у зразках пухлин і у прилеглих до них нормальних тканинах.

Ми перевірили відносні рівні довгої некодуючої РНК PANDAR у сечі хворих на рак сечового міхура ($n=36$) і порівняли їх з такими у осіб без онкозахворювань ($n=11$) (рис. 8(a)). днРНК PANDAR визначалась у 35 з 36 зразків РНК, виділеної з безклітинної сечі пацієнтів, хворих на рак сечового міхура.

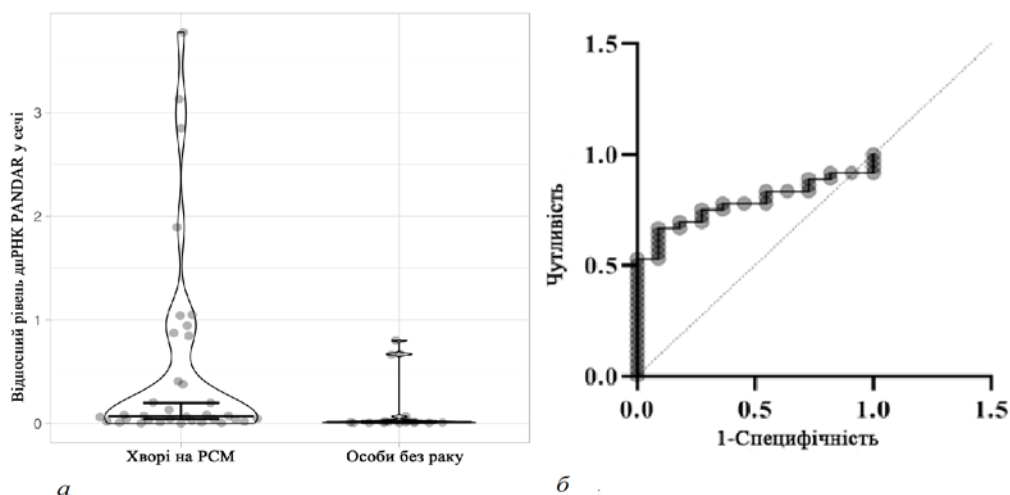


Рис. 8. Відносні рівні днРНК PANDAR у сечі хворих на РСМ і осіб без раку. а) - Відносні рівні днРНК PANDAR у сечі хворих на рак сечового міхура і осіб без онкозахворювань. б) - ROC крива, що показує можливість за відносними рівнями днРНК PANDAR відрізнити хворих на рак сечового міхура від осіб без раку ($AUC = 0,7803$)

Результати тесту Манна-Вітні показали наявність статистично значущої різниці у рівнях днРНК PANDAR у безклітинній сечі пацієнтів з раком сечового міхура і осіб без раку ($t=87$, $p=0,0043$).

Для оцінки потенційної можливості рівня днРНК PANDAR у сечі відрізнити пацієнтів з раком від осіб без онкологічних захворювань ми використали ROC-аналіз (рис. 8 (б)). Результати виявили, що за відносними рівнями довгої некодуючої РНК PANDAR у безклітинній сечі можна відрізнити між собою досліджувані групи. Площа під ROC кривою становила 0,7803, $p = 0,0053$.

Поєднання кількісних та якісних характеристик нуклеїнових кислот, отриманих з сечі пацієнтів з раком предміхурової залози та сечового міхура для неінвазивної діагностики цих захворювань. Аналіз кореляцій між експресією генів *AURKA*, *AURKB*, *AURKC* та *BRAF* у зразках клітин, осаджених з сечі пацієнтів, хворих на РПЗ і відносними рівнями днРНК PANDAR у сечі цих пацієнтів показав наявність статистично достовірних позитивних кореляцій між рівнями днРНК PANDAR та експресією у клітинах із цих зразків генів *AURKC* і *BRAF* ($r_s= 0,51$ і $0,57$, відповідно, $p<0,05$).

Ми припустили, що додавши до визначення наявності метилювання генів *VIM*, *TMEFF2*, *GDF15*, *RASSF1A* і *NKX3.1* показники рівнів PANDAR, яка окремо також виявляла здатність відрізнити хворих на рак сечового міхура від осіб без раку, ми зможемо більш ефективно відрізнити ці дві групи. Для того, щоб перевірити це

припущення, ми провели аналіз зразків, для яких було визначено як метилювання, так і рівень днРНК PANDAR (n=24), методом простої логістичної регресії і побудували ROC криву (результати графічно представлені на рис. 9). Площа під ROC кривою становила 0,909, $p=0,0007$, що попередньо підтвердило наше припущення.

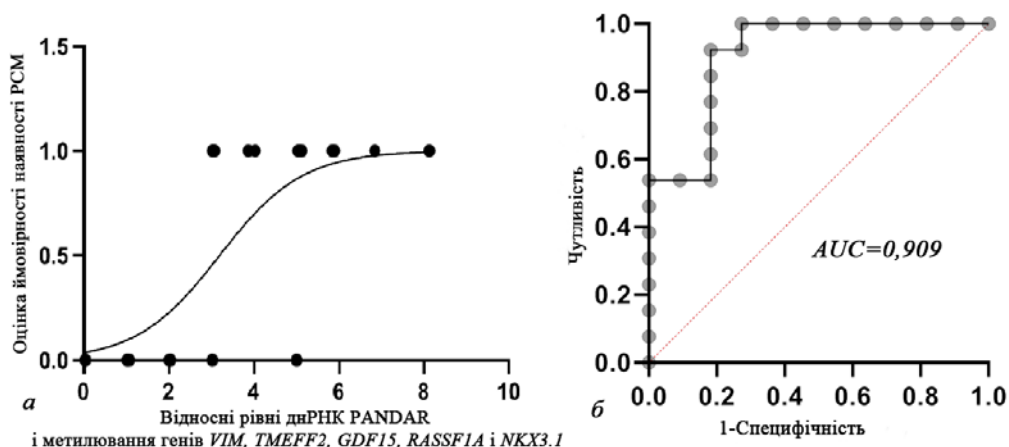


Рис. 9. Результати розрахунків простої логістичної регресії (а) і ROC-аналізу (б) комбінації відносних рівнів днРНК PANDAR і метилювання генів *VIM*, *TMEFF2*, *GDF15*, *RASSF1A* і *NKX3.1* у безклітинній сечі для виявлення раку сечового міхура

Таким чином, комбінація метилюваних *VIM*, *TMEFF2*, *GDF15*, *RASSF1A* і *NKX3.1* та показників відносних рівнів днРНК PANDAR у безклітинній сечі може бути запропонована для подальших досліджень як потенційна панель для неінвазивної діагностики раку сечового міхура.

ВИСНОВКИ

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

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

TMEFF2, *GDF15*, *RASSF1A*, *NKX3.1* і *MYO3A* як такі, що можуть бути гіперметильованими при раку сечового міхура; довга некодуюча РНК PANDAR як потенційний маркер для пухлин епітелійного походження.

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

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

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

5. Вищий рівень експресії *AURKC* у андрогенрезистентній клітинній лінії РС3 ніж у інших клітинних лініях і позитивна кореляція експресії гена *AURKC* з експресією гена стероїдогенного ферменту *CYP17A1* у тканинах аденокарцином ($r^s = 0,370$, $p < 0,05$) може свідчити про можливий зв'язок кінази Аугоа С з формуванням андрогенрезистентного раку передміхурової залози.

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

7. Сильна позитивна кореляція ($r_s=0,844$, $p < 0,01$) рівнів відносної експресії *AURKC* і *BRAF* у клітинах з сечі хворих на рак передміхурової залози за відсутності такої кореляції у контрольній групі може вказувати на зміну регуляції сигнальних шляхів з залученням білкових продуктів цих генів при РПЗ.

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

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

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

СПИСОК НАУКОВИХ ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Mankovska O.S., Korsakova A.S., Cherniavskiy K.R., Kononenko O.A., Stakhovsky E.O., Bondarenko Yu.M., Kashuba V.I., Gerashchenko G.V. Methylation pattern of tumor-suppressor gene promoters as putative noninvasive diagnostic markers for prostate cancer. *Biopolymers and Cell* – 2021. – 37(1). – pp. 23-32. *(Особистий внесок здобувача: створення колекції зразків сечі для аналізу, бісульфітна обробка ДНК, метил-специфічна ПЛР у реальному часі, виділення пкДНК, метил-специфічна ПЛР, електрофорез, аналіз результатів, написання тексту статті).*

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

3. Gerashchenko GV, Mankovska OS, Dmitriev AA, Mevs LV, Rosenberg EE, Pikul MV, Marynychenko MV, Gryzodub OP, Stakhovsky EO, Kashuba VI. Expression of epithelial-mesenchymal transition-related genes in prostate tumours. *Biopolymers and Cell* – 2017. – 33(5). – pp. 335-355. *(Особистий внесок здобувача: участь у створенні колекції зразків, аналіз результатів).*

4. Маньковська О.С., Асатрян О. Е., Вікарчук М. В., Кононенко О. А., Стаховський Е. О., Кашуба В. І. Визначення експресії генів кіназ AURORA A, AURORA B, AURORA C, BRAF і EGFR у сечі пацієнтів, хворих на рак передміхурової залози. *Наукові записки НаУКМА* . – 2016. – т.184. – с.16 -23. *(Особистий внесок здобувача: забір зразків для аналізу, синтез першого ланцюга кДНК, кількісна ПЛР у реальному часі, аналіз результатів).*

5. Маньковська О. С., Скрипнікова О. С., Панасенко Г. В., Вікарчук М. В., Кононенко О. А., Стаховський Е. О., Кашуба В. І. Виявлення метилування генів *VIM*, *TMEFF2* і *GDF15* у сечі пацієнтів, хворих на рак сечового міхура в українській популяції. *Наукові записки НаУКМА* . – 2016. – т.184. – с. 23-29. *(Особистий внесок здобувача: забір клінічних зразків, виділення ДНК, бісульфітна обробка ДНК, метил-специфічна ПЛР, аналіз результатів).*

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

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

8. Asatryan O. E., Mankovska O.S., Kashuba V. I. Changes in expression of oncogenes and methylation of tumor suppressor genes in urine from patients with prostate

cancer. // Biopolymers and Cell. Materials of XII annual Conference of Young Scientists Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine. - 2018. - Vol. 34. (2). - P 143.

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

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

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

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

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

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

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

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

17. Маньковская О.С., Панасенко Г.В., Кашуба В.И., Стаховский Э.О., Некрасов К.А., Кононенко А.А. Кондратов А.Г. Панель нуклеиновых маркеров для выявления и дифференцировки карциномы почки, простаты и мочевого пузыря по моче пациентов. Abstract book “Science, Technology and Innovative Technologies in the

prosperous epoch of the Powerful State” Abstracts of papers of the International Scientific Conference. June.11-13, 2015., Ashgabat. - 2015 – p. 265.

АНОТАЦІЯ

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

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

Дослідження, викладені у дисертаційній роботі, присвячені визначенню епігенетичних та експресійних змін за раку передміхурової залози та раку сечового міхура, які можуть бути маркерними для цих онкологічних захворювань і потенційно використовуватись для діагностики та/або прогнозування їх розвитку. Було виявлено зміни у метилюванні низки генів у клітинних лініях, тканинах аденокарцином, парних умовно нормальних тканинах та аденомах передміхурової залози, безклітинній сечі пацієнтів з раком передміхурової залози та раком сечового міхура і референсних груп і виявлено, що набір метильованих *PTEN*, *CDH1*, *NKX3.1*, *RASSF1A* та *GDF15* може бути придатним для дискримінації хворих на РПЗ від осіб без раку, а наявність метилювання більшості генів з набору *VIM*, *TMEFF2*, *GDF15*, *RASSF1A* і *NKX3.1* є більш характерним для хворих на рак сечового міхура, ніж для осіб без онкозахворювань. Було виявлено експресію генів кінази родини *Aurora* і кінази *BRAF* у клінічних зразках хворих на рак передміхурової залози і визначено різницю у експресії цих генів між різними групами осіб, зокрема, виявлено вищий рівень експресії гена кінази *Aurora A* у хворих на РПЗ, ніж у осіб без раку. Клітинні лінії РПЗ, їх кондиційоване середовище та клінічний матеріал хворих на рак передміхурової залози, рак сечового міхура та контрольної групи було досліджено на рівні експресії або відносні рівні позаклітинної днРНК PANDAR. На усіх етапах дослідження було проведено кореляційний аналіз між показниками епігенетичних та експресійних змін, а також з клініко-патологічними характеристиками пацієнтів і встановлено низку статистично достовірних кореляцій.

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

SUMMARY

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

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

The thesis is devoted to investigation of potential markers for prostate and bladder cancer based on epigenetic and expression parameters in tissues and biological fluids of patients and to develop a non-invasive methods for the diagnosis of these diseases.

We performed a quantitative analysis of the methylation levels of the *VIM*, *KRT18*, *RASSF1A*, *NKX3.1*, *CDH1*, and *PTEN* genes in prostate cancer cell lines, prostate cancer tumor tissues and adjacent normal tissues. As a result, we found that the cell lines differed in the level of methylation of the studied genes, in particular, the methylation of the tumor suppressor *RASSF1A* in LNCaP cells was lower than in the other two cell lines. Very low levels of methylation were detected for *CDH1* in all cell lines, and the *VIM* gene, on the other hand, was completely methylated, with a similar phenomenon observed in patients' tissues. In tissues, the *RASSF1A* gene was the most differentially methylated, but for it and for all other genes, no difference in methylation levels was found between tumor tissues and paired conditionally normal tissues. Correlation analysis of the expression of these genes, their methylation and clinical and pathological characteristics of patients with PCa revealed a negative correlation between the level of methylation of *KRT18* and the Gleason score in prostate adenocarcinomas. We also found that the levels of methylation of *RASSF1A* were higher in the group with a *TMPRSS2: ERG* fusion transcript.

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

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

We analyzed the relative expression of Aurora kinase genes in adenoma, adenocarcinoma, and paired adjacent prostate cancer tissues. We found a statistically significant difference in the relative expression of the *AURKA* gene in malignant tumors and adenomas ($p = 0.047$) with lower expression in malignant neoplasms. Evaluating the correlation of the studied genes with each other and with other genes previously studied on these samples in our department, we found a positive correlation of the relative expression levels of the *AURKA* and *AURKB* genes, the correlation of the expression of these genes with *MKI67*, *NKX3.1* gene. *AURKA* expression positively correlated with *ARisofl* expression and *AURKC* expression positively correlated with expression of *CYP17A1*.

In urine-precipitated cells, Aurora A kinase gene expression was significantly higher in patients with prostate cancer than in non-cancer patients. The expression of *BRAF* in patients

with PCa strongly correlates with the expression of the *AURKC*, and in the urine cells of people without cancer - with the expression of *AURKA* and *AURKB*.

The results of bioinformatics analysis using various algorithms and databases revealed that PANDAR lncRNA can interact with a number of miRNAs involved in the regulation of oncogene expression. In the LNCaP cell line, the level of PANDAR in cells was the highest among other cell lines, while the lowest relative expression of PANDAR was in PC3 cells, which, at the same time, demonstrated the highest levels of circulation PANDAR in the conditioned medium of these cells. We did not find a statistically significant difference in the levels of PANDAR lncRNA in the cell-free urine of patients with PCa and relatively healthy individuals. When analyzing the levels of PANDAR lncRNA in the urine of patients with bladder cancer, we found a statistically significant difference between cancer patients and relatively healthy individuals. After analyzing the correlation of Aurora kinase genes expression in urine cells and PANDAR lncRNA levels in cell-free urine of the same patients, we found positive correlations between PANDAR levels and *AURKC* and *BRAF* expression in cells from these samples.

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

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